

# СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И МИКОЛОГИЯ / AGRICULTURAL MICROBIOLOGY AND MYCOLOGY

<https://doi.org/10.30766/2072-9081.2025.26.1.129-140>  
УДК 633.113:631.52:57.085.23:632.4



## Влияние фильтрата культуральной жидкости *Fusarium sporotrichioides* на каллусную культуру пшеницы

© 2025. В. Ю. Ступко✉, С. Ю. Луговцова, Н. А. Нешумаева

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», Красноярский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, г. Красноярск, Российская Федерация

Культивирование каллусов на средах с фильтратами культуральной жидкости (ФКЖ) грибов рода *Fusarium* применяется в селекции на устойчивость к данным патогенам у различных видов растений. Ключевым этапом работы является определение реакции культуры тканей растения на различные концентрации (20 и 40 %) ФКЖ. Проведена оценка динамики параметров роста и развития каллусной культуры (КК) яровой мягкой пшеницы сорта Красноярская 12 при имитации поражения *Fusarium sporotrichioides* при длительном культивировании (до 119 суток). Каллусогенез индуцировали в культуре зародышей на среде Мурасиге-Скуга (МС) с 2,4-Д (1 и 4 мг/л для незрелых и зрелых зародышей соответственно). Каллусы затем помещали на среды с теми же концентрациями 2,4-Д с добавлением ФКЖ (20 и 40 %) и контрольную среду МС без селективного агента. Реакция КК на ФКЖ была заметна уже к 14-му дню культивирования. Признаки некроза отмечали у 10–15 % образцов на средах с ФКЖ. Доля каллусов с хлорофиллсодержащими областями (ХСО) на этом сроке была вдвое меньше на средах с ФКЖ в сравнении с МС. К 28-му дню доля каллусов с ХСО на среде с 20 % ФКЖ отличалась в меньшую сторону от МС в 2–3 раза, 40 % ФКЖ – в 5–7 раз. Размеры каллусов оказались мало информативны в анализе реакции КК на ФКЖ. После 42-го дня на средах с ФКЖ наблюдали возобновление роста КК, замедление некроза, активацию синтеза хлорофилла. На среде МС прогрессировало старение КК, увеличивалась частота некроза каллусов. Аналогичный эксперимент, но включавший пассирование на 14-й день на свежие среды того же состава, не выявил усиления селективного давления. Результаты были либо близки к образцам с непрерывным культивированием (ХСО, некроз), либо превышали их (размер каллусов). Таким образом, использованные уровни ФКЖ обеспечивали отбор устойчивых к токсинам *F. sporotrichioides* клеточных линий пшеницы в пределах 28 суток культивирования. Имеется потенциал увеличения селективирующего давления.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum* L., культуральный фильтрат, клеточная селекция, соматическая изменчивость

**Благодарности:** работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ в рамках Государственного задания ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (тема № 124012900555-6).

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку данной работы.

**Конфликт интересов:** авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования:** Ступко В. Ю., Луговцова С. Ю., Нешумаева Н. А. Влияние фильтрата культуральной жидкости *Fusarium sporotrichioides* на каллусную культуру пшеницы. *Аграрная наука Евро-Северо-Востока*. 2025;26(1):129–140. DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2025.26.1.129-140>

Поступила: 16.08.2024 Принята к публикации: 03.02.2025 Опубликовано онлайн: 26.02.2025

## Effect of culture filtrates of *Fusarium sporotrichioides* on wheat callus culture

© 2025. Valentina Yu. Stupko✉, Svetlana Yu. Lugovtsova,  
Nadezhda A. Neshumaeva

Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences”, Krasnoyarsk Research Institute of Agriculture, Krasnoyarsk, Russian Federation

Cultivation of calli on media with culture filtrates (CF) of fungi of the genus *Fusarium* is used in breeding for the resistance to these pathogens of somaclonal lines of many plant species. The key is to determine the response of plant tissue

culture to different concentrations (20 and 40 %) of CF. The dynamics of the growth and development parameters of spring soft wheat callus culture (CC) was assessed under simulating *F. sporotrichioides* infection in vitro in long-term cultivation (up to 119 days). Callusogenesis was induced in the culture of embryos on Murashige-Skoog (MS) medium with 2,4-D (1 mg/L for immature embryos, 4 mg/L for mature embryos). Calli were then cultured on media with the same levels of 2,4-D under different levels of CF (20 % and 40 %). The response of CC to CF was noticeable already by the 14th day of cultivation. Signs of necrosis were observed in 10–15 % of samples on media with CF. The proportion of calli with chlorophyll containing areas (CCA) at this period was half as much on media with CF compared to MS. By day 28, the medium with 20 % of CF had CCA quantity less than MS by 2–3 times, medium with 40 % of CF – had CCA quantity less by 5–7 times. The size of calli turned out to be less informative in the analysis of the response of CC to CF. After the 42<sup>nd</sup> day, media with CF showed the resumption of CC growth, slowing down of necrosis, and activation of chlorophyll synthesis. On the MS medium, the senescence of CC progressed, the frequency of calli necrosis increased. The same experiment but including passaging calli on the 14th day onto fresh media of the same composition did not reveal the increase in selective pressure. The results were either close to (CCA, necrosis) or higher (callus size) than those of the samples under continuous cultivation. Thus, the levels of CF used ensure the selection of wheat cell lines resistant to *F. sporotrichioides* toxins within 28 days of cultivation. There is a potential to increase selection pressure.

**Keywords:** *Triticum aestivum* L., culture filtrate, cell selection, somaclonal variation

**Acknowledgments:** the research was carried out under the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the state assignment of Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences” (theme No. 124012900555-6).

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

**Conflict of interest:** the authors stated that there was no conflict of interest.

**For citations:** Stupko V. Yu., Lugovtsova S. Yu., Neshumaeva N. A. Effect of culture filtrates of *Fusarium sporotrichioides* on wheat callus culture. *Agrarnaya nauka Euro-Severo-Vostoka* = Agricultural Science Euro-North-East. 2025;26(1):129–140. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2025.26.1.129-140>

Received: 16.08.2024

Accepted for publication: 03.02.2025

Published online: 26.02.2025

Фузариоз колоса и зерна – широко распространенное заболевание пшеницы, эпифитотии которого зафиксированы в разных регионах Российской Федерации. Последствием вспышек заболеваний явились контаминация зерна микотоксинами (до 100 %), высокая степень поражения колоса и зараженности зерна пшеницы (до 80 %) [1]. Вспышки заболевания периодически наблюдаются на Дальнем Востоке, в Краснодарском и Ставропольском краях, в Ростовской области [2, 3].

Проблема создания устойчивых к фузариозам сортов пшеницы для условий Восточной Сибири является актуальной. Как показывают недавние исследования фитосанитарного состояния зерна [4], виды *Fusarium graminearum* Schwabe и *F. sporotrichioides* Sherb. встречаются в зерне пшеницы намного чаще в Восточной Сибири, чем на Урале и в районе Волги. Данные количественных и качественных анализов ДНК *F. sporotrichioides* свидетельствуют о высокой зараженности зерна (более 70 % образцов), в частности максимальном уровне этого патогена в зерне из Красноярского края. Отмечено значительное загрязнение зерна ДОН и Т-2/НТ-2 токсинами.

Современные методы маркер-ассоциированной селекции позволили создать в Китае и Канаде ряд сортов пшеницы с устойчивостью к фузариозу колоса. Данные современных генетических исследований открывают все новые

маркеры, сцепленные с устойчивостью, но в то же время требуют дополнительных исследований и пока далеки от внедрения в практическую селекцию. Из-за комплексности генов, кодирующих устойчивость к данному патогену, имеются сложности объединения локуса количественных признаков (ЛКП / Quantitative Trait Loci – QTL) и взаимодействия отдельных генов устойчивости к фузариозам [5].

Одним из методов создания устойчивых генотипов является клеточная биотехнология. В работах с зерновыми используются как каллусные культуры [6, 7], так и культуры пыльников [8, 9, 10, 11]. При создании сортов методом клеточного отбора основным механизмом устойчивости становится снижение аккумуляции токсинов и устойчивость к их высоким концентрациям [12]. Помимо химически чистых препаратов микотоксинов для создания селективного давления [9, 10] используется также фильтрат культуральной жидкости (ФКЖ) гриба [13, 14]. Ключевым моментом в данной технологии является обеспечение достаточного селективного давления, создающего условия для отбора устойчивых линий, не вызывая при этом 100%-ной гибели клеточной популяции. В исследовании [14] уровень ФКЖ *F. oxysporum* в 35 % приводил к 100%-ной гибели каллусов томата. Авторы указывают на зависимость оптимального уровня ФКЖ как от типа патогена, так и вида растения. Так, например, для

клеточной селекции лилии была задействована концентрация ФКЖ *F. oxysporum* 80 % [13]. В работе с куркумой [15] достаточным оказался 7%-ный уровень *F. oxysporum*. В исследованиях на каллусах гороха [16] выявлена зависимость процента выживаемости каллусов и частоты морфогенеза от изначальной устойчивости генотипа к *F. oxysporum*, а оптимальной признана концентрация ФКЖ – 5 % от объема питательной среды.

**Цель исследования** – оценка реакции каллусной культуры яровой мягкой пшеницы сорта Красноярская 12 на различные концентрации (20 и 40 %) ФКЖ *F. sporotrichioides* в питательной среде при одноэтапной селекции на этапе пролиферации.

**Научная новизна** – в ходе длительного культивирования (более 30 суток) каллусов пшеницы на средах с ФКЖ *F. sporotrichioides* выявлено снижение селективирующего давления в процессе культивирования, установлена малоинформативность объемных параметров каллусов для оценки реакции КК на стресс.

**Материал и методы.** Исследования проводили в 2023-2024 гг. Объектом исследования служила яровая мягкая пшеница сорта Красноярская 12. Из сортов селекции Красноярского НИИСХ он наиболее востребован в Восточной Сибири. Рекомендован для возделывания в Красноярском и Забайкальском регионах, республиках Бурятия, Хакасия и Тыва. Обладает высокой устойчивостью к фузариозу по зараженности зерна (до 5 %).

Для получения ФКЖ использовали штамм F37 вида *F. sporotrichioides*, выделенный в 2021 году из зерна пшеницы сорта Новосибирская 15 (Участок сельскохозяйственного производства «Минино») и показавший высокую степень фитотоксичности в отношении семян и проростков зерновых культур. Штамм *F. sporotrichioides* F37 культивировали на жидкой среде Чапека в течение 21 суток при 23 °С в темноте. Затем КЖ отделяли от биомассы с помощью бумажных фильтров и дробно стерилизовали методом тиндализации.

Схема опыта включала два эксперимента: в первом – для получения каллусной культуры использовали незрелые зародыши (молочно-восковая спелость), во втором – зрелые. Зародыши помещали на среду Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением 2,4-Д (1 и 4 мг/л для незрелых и зрелых зародышей соответственно).

Спустя 30 суток культивирования каллусы, образовавшиеся в культуре незрелых зародышей,

случайным образом отбирали на среды пролиферации (МС + 1 мг/л 2,4-Д), содержащие ФКЖ гриба *F. sporotrichioides* в концентрациях 20 и 40 %, и контрольную среду МС без добавления селективного агента ( $n = 4$ ,  $N = 160$ , где  $n$  – число биологических повторностей,  $N$  – общее число образцов).

В случае с культурой зрелых зародышей, спустя 30 суток, на каждый вариант среды пролиферации (МС + 4 мг/л 2,4-Д; 20 или 40 % ФКЖ) высаживали по 20 каллусов, отобранных случайным образом ( $n = 4$ ,  $N = 80$ ). Через 2 недели культивирования половину каллусов с каждой среды пассировали на свежую среду того же состава.

В ходе культивирования раз в неделю с момента пассирования на среду пролиферации фиксировали размер и цвет каллусов, отмечали появление признаков некроза, хлорофиллсодержащих областей (ХСО). Объем каллуса рассчитывали по формуле:

$$V = a \cdot b, \quad (1)$$

где  $a$  – диаметр каллуса, мм;

$b$  – высота каллуса, мм.

Статистическую обработку проводили с использованием статистического пакета R 4.0.4 в среде разработки RStudio 1.4.1103 (2009-2024 RStudio, PBC). Для оценки достоверности влияния концентрации ФКЖ в питательной среде на размер каллусов применяли тест Краскелла-Уоллеса. Данные представлены в виде медианных значений (Me). Планки погрешности на графиках представляют собой интерквартильный размах [25%/75%]. Для сравнения частоты проявления признаков «некроз каллуса» и «наличие ХСО» при различных концентрациях ФКЖ использовали  $\chi^2$  Йейтса с поправкой Бонферони-Холма для множественных сравнений по каждому дню наблюдений.

**Результаты и их обсуждение.** Оценку динамики роста и развития каллусной культуры пшеницы проводили в ходе культивирования на среде с ФКЖ наиболее агрессивного из имеющихся в коллекции КрасНИИСХ штаммов *F. sporotrichioides*. Использование ФКЖ, а не фузариевой кислоты, основного элиситора грибов рода *Fusarium*, обосновывается ее низкой селективной эффективностью. По данным [17], требуется присутствие других компонентов ФКЖ, для того чтобы фузариевая кислота проявляла себя как селективный агент.

В первом эксперименте в связи с высокой токсичностью *F. sporotrichioides* и чувстви-

тельностью пшеницы, как культуры, были выбраны концентрации ФКЖ 20 и 40 %. Работы с овсом в этом же направлении велись ранее на концентрациях вплоть до 50 % [7].

Одним из критериев отбора устойчивых соматональных линий на средах с ФКЖ является сохранение способности каллусных клеток к пролиферации [14]. На средах с ФКЖ *F. sporotrichioides* наблюдали замедление темпов увеличения объема каллуса вплоть до 42 суток культивирования (табл. 1). В сравнении с активной пролиферацией тканей на среде МС без ФКЖ рост каллусов на остальных средах почти остановился. Однако в промежутке между 42-м

и 70-м днем культивирования процессы деления клеток возобновились как на среде, содержащей 20 % ФКЖ, так и при большем уровне селективного давления. Рост части каллусов на среде с 40 % ФКЖ продолжился. И хотя более половины из культивируемых в этих условиях каллусов остановились в развитии, остальная часть возобновила пролиферацию и к 119 суткам частоты значительно сместились в сторону более крупных каллусов, что видно из увеличения интерквартильного размаха (табл.) и снижения размеров каллусов на средах с ФКЖ, в то время как на контрольной среде рост продолжился.

*Таблица – Динамика роста каллусов яровой пшеницы сорта Красноярская 12 на средах с различным содержанием фильтрата культуральной жидкости гриба F. sporotrichioides, мм<sup>3</sup> (медиана±[25/75]) / Table – Dynamics of ‘Krasnoyarskaya 12’ cultivar spring wheat calluses growth on the media with different concentration of culture filtrate of F. sporotrichioides, mm<sup>3</sup> (median±[25/75])*

Период культивирования, сутки / Cultivation period, days	Концентрация ФКЖ в питательной среде, % / Concentration of culture filtrate in the medium, %		
	0	20	40
28	39,0[18,0/101,0] <sup>a</sup>	40,75[101,0/22,9] <sup>ab</sup>	30,0[22,9/85,3] <sup>b</sup>
42	87,0[55,0/81,0] <sup>a</sup>	45,0[81,0/25,8] <sup>b</sup>	33,0[25,8/99,0] <sup>b</sup>
70	463,0[274,0/347,0] <sup>a</sup>	216,0[347,0/141,0] <sup>b</sup>	175,0[141,0/378,0] <sup>b</sup>
119	571,5[462,5/328,5] <sup>a</sup>	204,0[328,5/141,6] <sup>b</sup>	93,0[141,6/516,0] <sup>c</sup>

Примечание. Одинаковыми буквами отмечены значения, не отличающиеся при  $p < 0,05$  в пределах одних суток / Note. The same letters indicate values that do not differ within one day at  $p < 0.05$

В каллусной культуре пшеницы, как показано ранее, активно идут процессы формирования ХСО [18], что также является показателем жизнеспособности и морфогенетического потенциала каллусов. Этот параметр активно изменяется под действием стрессоров. В контрольных условиях ХСО образовывались наиболее активно, и на 14-е сутки доля образцов с ХСО на среде МС уже в два раза превышала таковую на средах с ФКЖ (рис. 1). Параллельно с увеличением доли ХСО в контроле происходила деградация ХСО на среде с 40% ФКЖ. На 21-й день различия со средой с меньшей концентрацией ФКЖ стали статистически значимыми.

На фоне активизации роста каллусов после 42 суток культивирования на среде с 20 % ФКЖ наблюдали рост доли каллусов с ХСО, которая значительно выросла к 70-м суткам в сравнении с уровнем, зафиксированным на 42-е сутки (рис. 1).

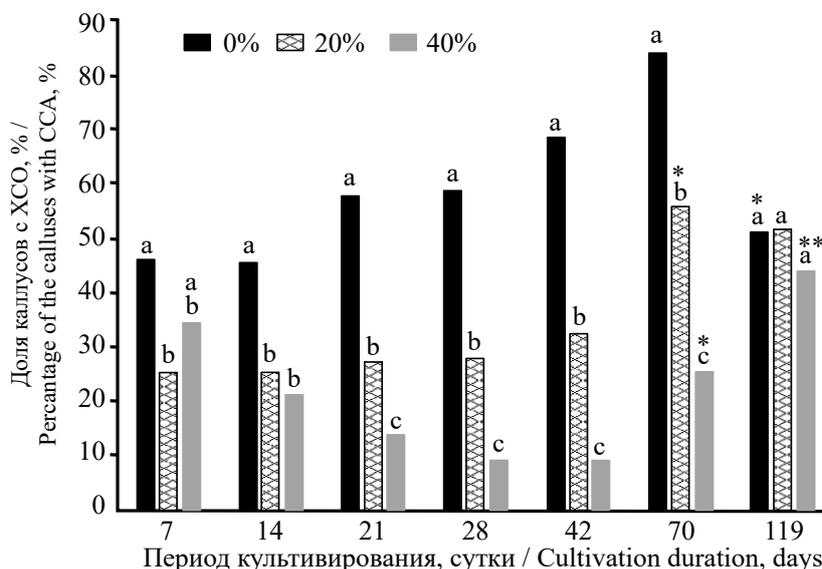
Аналогичный процесс отмечен и в отношении каллусов на среде с 40 % ФКЖ – доля

образцов с ХСО увеличилась вдвое в период с 42 до 70 суток наблюдения (рис. 1). Увеличение доли каллусов с ХСО на среде с 40 % ФКЖ продолжилось и далее, и к 119-м суткам этот показатель сравнялся на всех средах. В контрольных условиях это произошло за счёт старения культуры и некроза тканей (рис. 2). Несмотря на присутствие процессов старения и некроза и на средах с ФКЖ, формирование ХСО после 42 суток, таким образом, свидетельствует об активизации процессов органогенеза на средах с 20 и 40 % ФКЖ.

Важным критерием эффективности отбора устойчивых соматональных вариантов считается доля некроза в каллусной культуре [14, 19]. Признаками некроза тканей в настоящем исследовании считали появление оранжево-коричневой окраски и окрашивание среды вокруг каллуса в оранжевый цвет. Эти процессы связаны со старением культуры и выделением в среду фенольных соединений, что происходит при культивировании многих видов растительных тканей *in vitro* [20], а также со стрес-

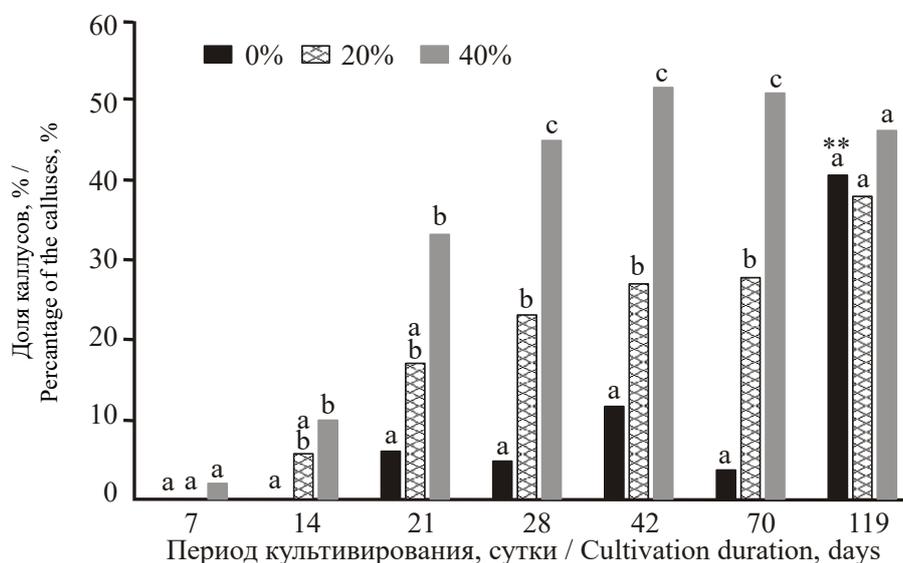
совыми условиями культивирования. В настоящей работе такими факторами выступали элиситоры *F. sporotrichioides*, содержащиеся в ФКЖ. Процессы некроза на среде с 40 %

ФКЖ развились к концу второй недели. С 28–70-е сутки культивирования отмечали достоверные отличия доли каллусов с некрозами на всех исследованных средах при  $p < 0,05$ .



**Рис. 1. Формирование хлорофиллсодержащих областей (ХСО) в каллусной культуре незрелых зародышей яровой пшеницы сорта Красноярская 12 на средах с различным содержанием ФКЖ гриба *F. sporotrichioides*.** Одинаковыми буквами здесь и на рис. 2–5 отмечены значения, не отличающиеся при  $p < 0,05$  в пределах одних суток. Достоверные отличия в сравнении с данными, полученными на 42-е сутки на этой же среде при \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  /

**Fig. 1. Development of chlorophyll containing areas (CCA) in callus culture of immature embryos of 'Krasnoyarskaya 12' spring wheat cultivar on the media with different levels of CF of *F. sporotrichioides*.** The same letters here and further on fig. 2–5 indicate values that do not differ within one day at  $p < 0.05$ ; statistically significant difference compared to data obtained on the 42th day on the same medium at \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$



**Рис. 2. Динамика некроза каллусов яровой пшеницы сорта Красноярская 12 на средах с различным содержанием ФКЖ гриба *F. sporotrichioides*.** Достоверные отличия в сравнении с данными, полученными при предыдущем измерении на этой же среде при \*\* $p < 0,01$  /

**Fig. 2. Dynamics of callus necrosis of 'Krasnoyarskaya 12' spring wheat cultivar on the media with different concentrations of CF of *F. sporotrichioides*.** Statistically significant difference compared to data obtained by previous measuring on the same medium at \*\* $p < 0.01$

На фоне роста каллусов на обеих средах с ФКЖ, описанного выше (табл. 1), наблюдали

остановку процессов некроза на среде с 20 % ФКЖ уже на 42-е сутки, и на среде с 40 %

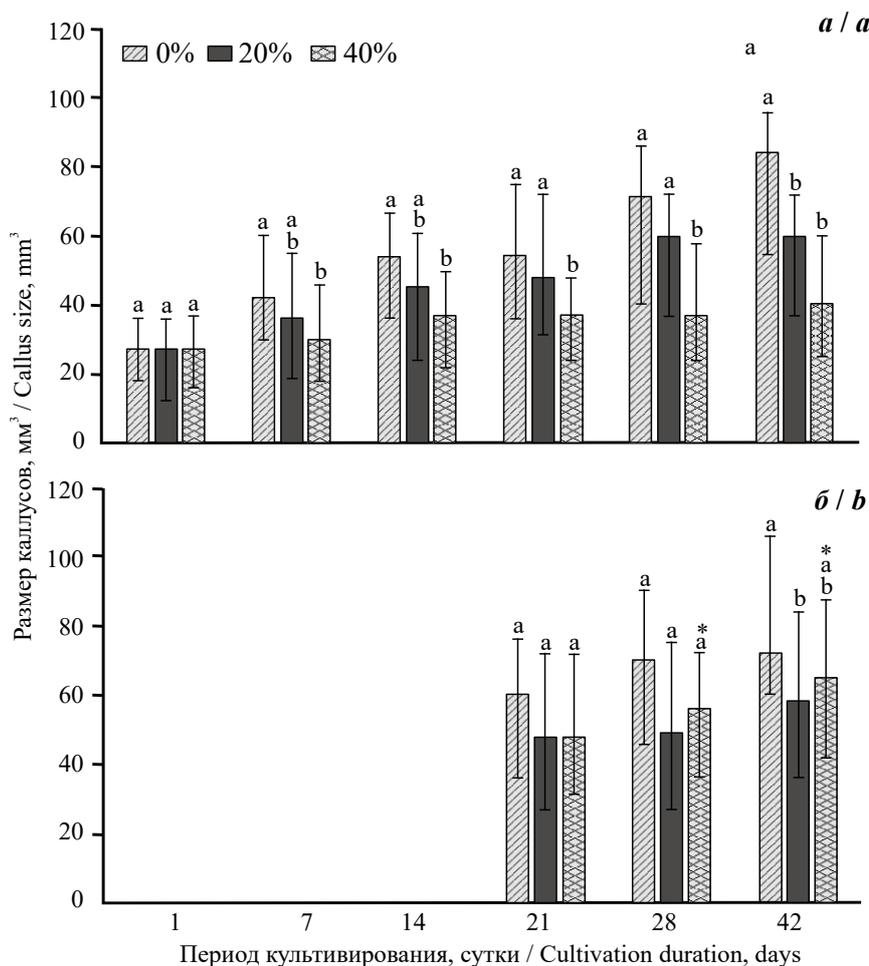
ФКЖ – на 70-е сутки культивирования. На 119-е сутки заметно снижение доли каллусов с некрозом на среде с 40 % ФКЖ из-за возобновления роста культуры и формирования пролиферирующих областей на каллусах, имевших до этого признаки 100%-го некроза тканей. В то время как на контрольной среде доля каллусов с некрозом достигла уровня, сопоставимого со стрессовыми условиями на фоне продолжающегося старения культуры. На среде без ФКЖ не выявлено случаев возобновления пролиферации тканей.

Описанное явление возобновления роста культуры, по всей видимости, связано с деградацией токсинов в питательной среде со временем, что позволяет клеткам, сохранившим жизнеспособность, перейти к пролиферации: на среде с 20 % ФКЖ это происходит раньше, чем на среде с 40 % ФКЖ. Образцы, возобно-

вившие рост, можно при этом считать прошедшими селективный отбор – это те единичные клетки в массе клеток, не обладающие устойчивостью, которые выжили и при снижении селективного давления начали пролиферировать.

Для уточнения характера процессов, происходящих в питательной среде в ходе культивирования каллусов, проведен следующий эксперимент, где часть каллусов пересаживали на свежие среды в конце второй недели культивирования. Предполагалось, что культивирование каллусов на свежеприготовленных средах с ФКЖ позволит поддерживать уровень стрессового давления.

После пассирования на свежую среду активизировался рост каллусов на среде с 40 % ФКЖ (рис. 3), где размер каллуса был больше на четверть, чем у образцов без пересадки.



**Рис. 3.** Рост каллусов в культуре зародышей яровой пшеницы сорта Красноярская 12 на средах с различным содержанием ФКЖ в ходе непрерывного культивирования (а) и после пассирования на свежую среду (б) (медиана±[25/75]). Здесь и на рис. 5 \* – статистически значимое различие в размерах каллусов на этой же среде при непрерывном культивировании при  $p < 0,05$  /

**Fig. 3.** Callus growth in embryos culture of ‘Krasnoyarskaya 12’ spring wheat cultivar on the media with different levels of CF under continuous cultivation (a) and after passaging to a fresh medium (b) (median±[25/75]). Here and on fig. 5 \* – statistically significant difference in callus size on the same medium under continuous cultivation at  $p < 0.05$

По разнице в характере распределения (интерквартильный размах) хорошо заметно, что варианты с пересадкой имели распределение размеров каллусов на 42-е сутки, схожее с данными предыдущего эксперимента (табл. 1). Достоверные различия в медианном размере этих каллусов в зависимости от среды культивирования появились только на 35-е сутки (рис. 3). При этом на среде с 40 % ФКЖ каллусы имели размер близкий к таковому в контрольных условиях вплоть до 35 суток наблюдения. Также размеры этих каллусов на 28-е и 42-е сутки были значительно больше, чем

образцов в варианте с непрерывным культивированием в эти же сроки.

Активный рост каллусов на свежих средах с токсинами после пересадки подтверждается и формированием ХСО, в результате чего доля их на стрессовых средах к 21-м суткам стала близкой к контролю (рис. 4). Далее различия с контрольной средой стали статистически значимы, однако, к 35-м суткам доля каллусов с ХСО на среде с 20 % ФКЖ оставалась на уровне 21-х суток и изменялась в пределах погрешности вплоть до 42 суток наблюдения.

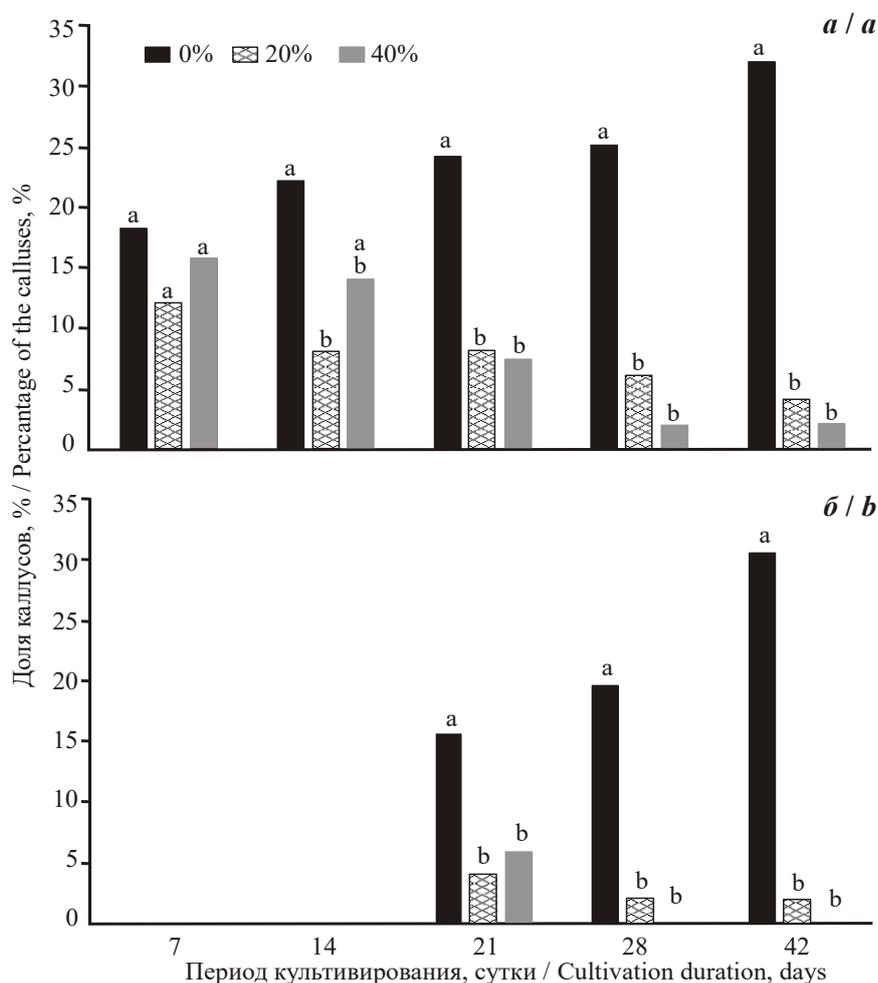


Рис. 4. Формирование хлорофиллсодержащих областей (ХСО) в каллусной культуре яровой пшеницы сорта Красноярская 12 на средах с различным содержанием ФКЖ при непрерывном культивировании (а) и после пассирования на свежие среды (б) /

Fig. 4. Development of chlorophyll containing areas (CCA) in callus culture of 'Krasnoyarskaya 12' spring wheat cultivar on the media with different concentration of CF under continuous cultivation (a) and after passaging to fresh media (b)

При сравнении каллусов без пересадки и с пересадкой не было обнаружено различий в доле образцов с ХСО в рамках одних условий. Необходимо отметить, что видимую остановку

роста на средах с ФКЖ как в первом, так и во втором экспериментах (табл. 1, рис. 3) наблюдали ближе к концу четвертой недели культивирования.

В отличие от процесса увеличения размера каллуса, процессы некроза однозначно указывали на реакцию каллусов на присутствие ФКЖ (рис. 2). Однако после пассирования на свежую среду с ФКЖ некроз каллуса не

только не ускорился в сравнении с вариантом с непрерывным культивированием, но и, судя по доле каллусов с признаками некроза на среде с 40 % ФКЖ на 28-е сутки, пересадка на свежую среду замедлила этот процесс (рис. 5).

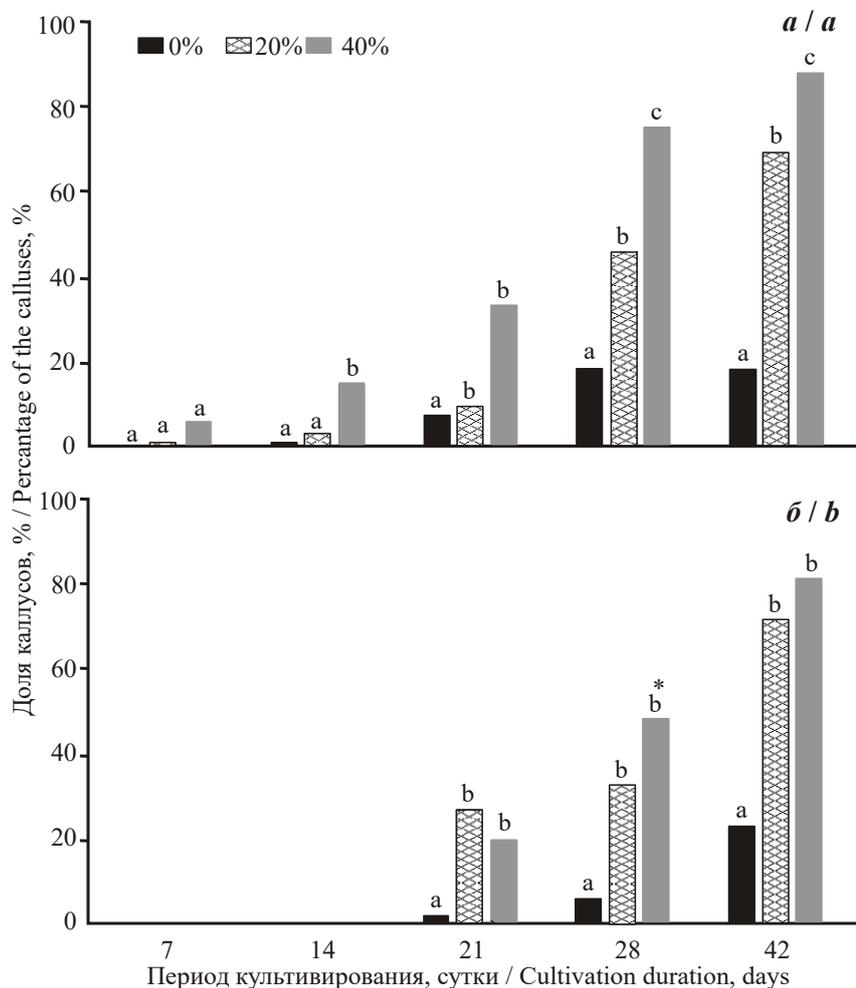


Рис. 5. Некроз каллусных тканей в культуре яровой пшеницы сорта Красноярская 12 на средах с различным содержанием ФКЖ при непрерывном культивировании (а) и после пассирования на свежие среды (б) /

Fig. 5. Necrosis of callus tissue in the culture of 'Krasnoyarskaya 12' spring wheat cultivar on the media with different level of CF under continuous cultivation (a) and after passaging to a fresh medium (b)

Однако к 42-м суткам варианты культивирования сравнивались по указанному параметру. Следует отметить и отсутствие различий в доли каллусов с некрозом после пассирования между средами с разной концентрацией ФЖК, хотя при непрерывном культивировании их отмечали.

Необходимо учесть, что признаки, указывающие на деградацию токсинов – возобновление пролиферации каллуса в областях некроза – проявились в первом эксперименте в сроки больше, чем 42 суток.

Таким образом, пассирование на свежие среды с ФКЖ не только не усиливало селек-

тивное давление этих условий, но и поддерживало рост каллусной культуры вплоть до темпов, наблюдаемых в контрольных условиях.

По всей видимости это происходило за счёт повышения уровня питательных веществ в среде. В то время как при непрерывном культивировании давление селективных факторов идет параллельно с исчерпанием питательных элементов в ближайшем окружении каллусных тканей, что снижает их способность сопротивляться токсическому воздействию ФКЖ.

Во многих работах по селекции *in vitro* на устойчивость к фузариозам используется

многоступенчатый принцип отбора, когда клеточные линии культивируются либо несколько раз на средах с одинаковой концентрацией ФКЖ [14], либо последовательно пассируются на среды со всё более повышающимся уровнем селективного агента [15, 19].

Продолжительность каждого пассажа обычно равна в этом случае 30 суткам, что, вероятно, соответствует периоду сохранения активной концентрации селектирующего агента. Наблюдаемое возобновление роста культуры пшеницы в текущем эксперименте после 42 суток подтверждает эту гипотезу. Однако нигде в упоминаемых работах не указывается на такое обоснование продолжительности циклов культивирования. В свою очередь проявляющиеся к концу третьей недели признаки некроза, даже в отсутствии ФКЖ, говорят о совмещении на этом временном отрезке процессов старения с воздействием селектирующего давления. В результате отобранные по признаку устойчивости к ФКЖ клеточные линии могут быть отбракованы из-за некроза вследствие старения культуры.

В свою очередь повторный отбор, по всей видимости, происходит в отношении клеточных линий, сформировавшихся в результате пролиферации на свежей среде. Об этом свидетельствует наблюдаемый в настоящем эксперименте активный рост культуры пшеницы в присутствии высоких концентраций ФКЖ при пассировании на новую питательную среду.

Возобновление активного роста каллусов пшеницы на средах с ФКЖ при пересадке в конце второй недели культивирования свидетельствует в пользу произошедшего отбора устойчивых клеточных линий в первые две недели. Исходя из данных других исследователей, описанных выше, это вряд ли повысит эффективность отбора, но может способствовать появлению всё более отличных от исходного генотипа соматоклональных вариаций.

**Заключение.** Реакция каллусной культуры яровой пшеницы сорта Красноярская 12 на ФКЖ штамма гриба *F. sporotrichioides* F37 прослеживается по снижению уровня синтеза хлорофилла и ускорению процессов синтеза фенольных соединений с выделением их в окружающую питательную среду в сравнении с контрольными условиями культивирования. Разница при этом достигает 2-3-кратного уровня уже при концентрации ФКЖ 20 %. Судя по данным, полученным на среде с содержанием 40 % ФКЖ, пределы жизнеспособности культуры каллусов не достигнуты и имеется потенциал увеличения эффективности отбора соматоклональных линий за счёт повышения селектирующего давления. Следует учесть при этом, что выход устойчивых линий снизится, однако, будут отбираться наиболее устойчивые варианты. Возобновление роста на фоне вероятной деградации токсинов в среде свидетельствует о присутствии отдельных клеточных линий, сохранивших жизнеспособность в условиях селективного давления на фоне большого объема некротизации тканей. Что делает исследованные уровни ФКЖ пригодными для селекции клеточных линий по признаку толерантности к токсинам *F. sporotrichioides*. Размер каллуса при этом, по всей видимости, не является достаточно информативным критерием реакции культуры на стрессовые условия в случае работы с пшеницей и данным селективным агентом. Уровень с содержанием 40 % ФКЖ является достаточным, поскольку к 28-м суткам культивирования приводит к полному некрозу почти 50 % образцов в культуре незрелых зародышей пшеницы, и близкой – к 80 % в культуре зрелых зародышей, с сохранением уровня ХСО в пределах 10 %. Дополнительный цикл отбора в этом случае не является необходимым. Период культивирования в пределах 21–28 суток является достаточным и приводит к отбору устойчивых клеточных линий.

#### Список литературы

1. Костерина Н. А. Анализ современного состояния проблемы фузариоза колоса и зерна пшеницы в Российской Федерации. *Аграрный вестник Урала*. 2023;23(5):49–60.  
DOI: <https://doi.org/10.32417/1997-4868-2023-234-05-49-60> EDN: LQLAOZ
2. Гагкаева Т. Ю., Гаврилова О. П., Орина А. С., Гогина Н. Н. Чрезвычайная ситуация 2019 г. и болезни зерна в Амурской области. *Защита и карантин растений*. 2020;(8):19–21.  
Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=43459556> EDN: VPTQZH

3. Кремнева О. Ю., Кудинова О. А., Волкова Г. В. Эффективность фунгицида «Фалькон», КЭ против фузариоза колоса пшеницы в условиях Краснодарского края. Современные подходы и методы в защите растений: мат-лы Всеросс. научн.-практ. конф. с междунар. участием. Екатеринбург: Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, 2018. С. 29–31. Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=39109155> EDN: DPEOYO
4. Gagkaeva T., Gavrilova O., Orina A., Lebedin Y., Shanin I., Petukhov P., Eremin S. Analysis of toxigenic *Fusarium* species associated with wheat grain from three regions of Russia: Volga, Ural, and West Siberia. *Toxins*. 2019;11(5):252. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins11050252>
5. Fernando D., Oghenekaro A. O., Tucker J. R., Badea A. Building on a foundation: advances in epidemiology, resistance breeding, and forecasting research for reducing the impact of *Fusarium* head blight in wheat and barley. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2021;43(8):495–526. DOI: <https://doi.org/10.1080/07060661.2020.1861102>
6. Yao J., Ma H., Lu W. Progress on inheritance and breeding for wheat scab resistance in JAAS. *Cereal Research Communications*. 2008;36:189–191.
7. Луговцова С. Ю., Ступко В. Ю., Нешумаева Н. А. Влияние культуральных фильтратов грибов рода *Fusarium* на каллусные культуры овса. *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. 2023;53(10):15–22. DOI: <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2023-10-2> EDN: NAVHBS
8. Eudes F., Badea A., Laroche A., Gaudet D., Graf R., Sadasivaiah S. In vitro selection and molecular markers for early screening of *Fusarium* head blight resistance wheat. In: Xu Z., Li J., Xue Y., Yang W. (eds) *Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and Beyond*. Springer, Dordrecht, 2007. pp. 349–352. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6635-1\\_56](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6635-1_56)
9. Legge W. G., Tucker J. R., Bizimungu B., Tekauz A., Noll J. S., Fetch Jr. T. G., et al. Norman barley. *Canadian Journal of Plant Science*. 2011;91(6):1105–1113. DOI: <https://doi.org/10.4141/cjps2010-020>
10. Legge W. G., Tucker J. R., Bizimungu B., Tekauz A., Fetch Jr. T. G., Haber S., et al. Taylor barley. *Canadian Journal of Plant Science*. 2013;93(5):969–977. DOI: <https://doi.org/10.4141/cjps2013-126>
11. Ryabova D., Randhawa H. S., Kathiria P., Jiang F., Spaner D., Hucl P., et al. Development of new wheat varieties resistant to FHB through microspore *in vitro* selection technology. *National Fusarium Head Blight Forum: proceedings*. St. Louis MO, United States, 2016. pp. 92.
12. Gosman N., Chandler E., Thomsett M., Draeger R., Nicholson P. Analysis of the relationship between parameters of resistance to *Fusarium* head blight and *in vitro* tolerance to deoxynivalenol of the winter wheat cultivar WEK0609. *European Journal Plant Pathology*. 2005;111(1):57–66. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-004-2733-8>
13. Zhang Y. P., Jiang S., Qu S. P., Yang X. M., Wang X. N., Ma L. L., et al. In vitro selection for *Fusarium* resistant oriental lily mutants using culture filtrate of the fungal agent. *Acta Horticulturae*. 2014;1027:205–212. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1027.22>
14. Shaunak I., Sharma R., Sharma P., Gupta M., Bhardwaj R. K. Developing resistance against soil-borne *Fusarium* pathogen causing tomato wilt through *in vitro* cell line selection. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2023;153:91–104. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02446-1>
15. Kuanar A., Nayak P. K., Subudhi E., Nayak S. In vitro selection of turmeric somaclone resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Zingiberi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. 2014;84:1077–1082. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40011-013-0295-2>
16. Тагиманова Д. С., Рашиденова Ж. А., Хапилина О. Н. Скрининг резистентных каллусов гороха (*Pisum sativum* L.) на селективных средах с культуральным фильтратом *Fusarium oxysporum* L. *Биотехнология. Теория и практика*. 2013;(3):55–60. Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=25612905> EDN: VOMRDH
17. Borrás O., Bermudez R. S. The pineapple-*Fusarium* subglutinans interaction: an early selection system for disease resistance. In Book: *Mass screening techniques for selecting crops resistant to disease*. FAO/IAEA (eds). Vienna: International Atomic Energy Agency, 2010. pp. 159–172.
18. Терлецкая Н. В., Ступко В. Ю., Исакова А. Б., Зобова Н. В., Гаевский Н. А. Фотоморфогенез эмбриогенных каллусов пшеницы в условиях эдафических стрессов. *Известия Уфимского научного центра РАН*. 2018;(3-5):43–51. Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=36293992> EDN: VJYVJJ
19. Yezhebayeva R. S., Abekova A. M., Bersimbaeva G. H., Konysbekov K. T., Bastaubaeva S. O., Roik N. V., Urazaliev K. R. *In Vitro* Cell Selection of Sugar Beet for Resistance to Culture Filtrate of the Fungus *Fusarium oxysporum*. *Cytology and Genetics*. 2019;53:307–314. DOI: <https://doi.org/10.3103/S0095452719040042>
20. Баймухаметова Э. А., Кулуев Б. Р. Потемнение растительных тканей при культивировании *in vitro* и способы его предотвращения. *Биотехнология*. 2020;36(2):26–42. DOI: <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-2-26-42> EDN: ZBGVAO

*References*

1. Kosterina N. A. Analysis of the current state of the problem of fusarium ear and grain of wheat in the Russian Federation. *Agrarnyy vestnik Urala = Agrarian Bulletin of the Urals*. 2023;23(5):49–60. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.32417/1997-4868-2023-234-05-49-60>
2. Gagkaeva T. Yu., Gavrilova O. P., Orina A. S., Gogina N. N. Emergency situation in 2019 and grain diseases in the Amur region. *Zashchita i karantin rasteniy*. 2020;(8):19–21. (In Russ.). URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=43459556>
3. Kremneva O. Yu., Kudinova O. A., Volkova G. V. The effectiveness of the fungicide "Falcon", CE against fusarium of wheat ears in the Krasnodar territory. Modern approaches and methods in plant protection: Proceedings of the All-Russian scientific and practical conference with international participation. Ekaterinburg: *Ural'skiy federal'nyy universitet imeni pervogo Prezidenta Rossii B. N. El'tsina*, 2018. pp. 29–31. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=39109155>
4. Gagkaeva T., Gavrilova O., Orina A., Lebedin Y., Shanin I., Petukhov P., Eremin S. Analysis of toxigenic *Fusarium* species associated with wheat grain from three regions of Russia: Volga, Ural, and West Siberia. *Toxins*. 2019;11(5):252. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins11050252>
5. Fernando D., Oghenekaro A. O., Tucker J. R., Badea A. Building on a foundation: advances in epidemiology, resistance breeding, and forecasting research for reducing the impact of Fusarium head blight in wheat and barley. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2021;43(8):495–526. DOI: <https://doi.org/10.1080/07060661.2020.1861102>
6. Yao J., Ma H., Lu W. Progress on inheritance and breeding for wheat scab resistance in JAAS. *Cereal Research Communications*. 2008;36:189–191.
7. Lugovtsova S. Yu., Stupko V. Yu., Neshumaeva N. A. Effect of culture filtrates of *Fusarium* fungi on oat callus cultures. *Sibirskiy vestnik sel'skokhozyaystvennoy nauki = Siberian Herald of Agricultural Science*. 2023;53(10):15–22. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2023-10-2>
8. Eudes F., Badea A., Laroche A., Gaudet D., Graf R., Sadasivaiah S. In vitro selection and molecular markers for early screening of Fusarium head blight resistance wheat. In: Xu Z., Li J., Xue Y., Yang W. (eds) *Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and Beyond*. Springer, Dordrecht, 2007. pp. 349–352. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6635-1\\_56](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6635-1_56)
9. Legge W. G., Tucker J. R., Bizimungu B., Tekauz A., Noll J. S., Fetch Jr. T. G., et al. Norman barley. *Canadian Journal of Plant Science*. 2011;91(6):1105–1113. DOI: <https://doi.org/10.4141/cjps2010-020>
10. Legge W. G., Tucker J. R., Bizimungu B., Tekauz A., Fetch Jr. T. G., Haber S., et al. Taylor barley. *Canadian Journal of Plant Science*. 2013;93(5):969–977. DOI: <https://doi.org/10.4141/cjps2013-126>
11. Ryabova D., Randhawa H. S., Kathiria P., Jiang F., Spaner D., Hucl P., et al. Development of new wheat varieties resistant to FHB through microspore *in vitro* selection technology. *National Fusarium Head Blight Forum: proceedings*. St. Louis MO, United States, 2016. pp. 92.
12. Gosman N., Chandler E., Thomsett M., Draeger R., Nicholson P. Analysis of the relationship between parameters of resistance to Fusarium head blight and in vitro tolerance to deoxynivalenol of the winter wheat cultivar WEK0609. *European Journal Plant Pathology*. 2005;111(1):57–66. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-004-2733-8>
13. Zhang Y. P., Jiang S., Qu S. P., Yang X. M., Wang X. N., Ma L. L., et al. In vitro selection for *Fusarium* resistant oriental lily mutants using culture filtrate of the fungal agent. *Acta Horticulturae*. 2014;1027:205–212. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1027.22>
14. Shaunak I., Sharma R., Sharma P., Gupta M., Bhardwaj R. K. Developing resistance against soil-borne *Fusarium* pathogen causing tomato wilt through in vitro cell line selection. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2023;153:91–104. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02446-1>
15. Kuanar A., Nayak P. K., Subudhi E., Nayak S. In vitro selection of turmeric somaclone resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Zingiberi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. 2014;84:1077–1082. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40011-013-0295-2>
16. Tagimanova D. S., Rashidenova Zh. A., Khapilina O. N. Screening of the resistant pea callus (*Pisum sativum* L.) selective media, containing *Fusarium oxysporum* L. culture filtrate. *Biotehnologiya. Teoriya i praktika*. 2013;(3):55–60. (In Russ.). URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=25612905>
17. Borrás O., Bermudez R. S. The pineapple-Fusarium subglutinans interaction: an early selection system for disease resistance. In Book: *Mass screening techniques for selecting crops resistant to disease*. FAO/IAEA (eds). Vienna: International Atomic Energy Agency, 2010. pp. 159–172.
18. Terletskaya N. V., Stupko V. Yu., Iskakova A. B., Zobova N. V., Gaevskiy N. A. Photomorphogenesis of wheat embryogenic calli under edaphic stress conditions. *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN = Proceedings of the RAS Ufa Scientific Centre*. 2018;(3-5):43–51. (In Russ.). URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=36293992>

**ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ: СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И МИКОЛОГИЯ / ORIGINAL SCIENTIFIC ARTICLES: AGRICULTURAL MICROBIOLOGY AND MYCOLOGY**

---

19. Yerzhebayeva R. S., Abekova A. M., Bersimbaeva G. H., Konysbekov K. T., Bastaubaeva S. O., Roik N. V., Urazaliev K. R. *In Vitro* Cell Selection of Sugar Beet for Resistance to Culture Filtrate of the Fungus *Fusarium oxysporum*. *Cytology and Genetics*. 2019;53:307–314. DOI: <https://doi.org/10.3103/S0095452719040042>

20. Baymukhametova E. A., Kuluev B. R. Darkening of plant tissues during *in vitro* cultivation and methods for its prevention. *Biotekhnologiya*. 2020;36(2):26–42. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-2-26-42>

**Сведения об авторах**

✉ **Ступко Валентина Юрьевна**, кандидат с.-х. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и биотехнологии, Красноярский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», проспект Свободный, д. 66, г. Красноярск, Российская Федерация, 660041, e-mail: [fic@ksc.krasn.ru](mailto:fic@ksc.krasn.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4430-2719>, e-mail: [stupko@list.ru](mailto:stupko@list.ru)

**Луговцова Светлана Юрьевна**, старший научный сотрудник лаборатории физиологии и биотехнологии, Красноярский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», проспект Свободный, д. 66, г. Красноярск, Российская Федерация, 660041, e-mail: [fic@ksc.krasn.ru](mailto:fic@ksc.krasn.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4185-9455>

**Нешумаева Надежда Алексеевна**, кандидат биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и биотехнологии, Красноярский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», проспект Свободный, д. 66, г. Красноярск, Российская Федерация, 660041, e-mail: [fic@ksc.krasn.ru](mailto:fic@ksc.krasn.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7314-9418>

**Information about the authors**

✉ **Valentina Yu. Stupko**, PhD in Agricultural Science, leading researcher, the Laboratory of Physiology and Biotechnology, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences”, Krasnoyarsk Research Institute of Agriculture, Svobodny prospect, 66, Krasnoyarsk, Russian Federation, 660041, e-mail: [fic@ksc.krasn.ru](mailto:fic@ksc.krasn.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4430-2719>, e-mail: [stupko@list.ru](mailto:stupko@list.ru)

**Svetlana Yu. Lugovtsova**, senior researcher, the Laboratory of Physiology and Biotechnology, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences”, Krasnoyarsk Research Institute of Agriculture, Svobodny prospect, 66, Krasnoyarsk, Russian Federation, 660041, e-mail: [fic@ksc.krasn.ru](mailto:fic@ksc.krasn.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4185-9455>

**Nadezhda A. Neshumaeva**, PhD in Biological Science, leading researcher, the Laboratory of Physiology and Biotechnology, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences”, Krasnoyarsk Research Institute of Agriculture, Svobodny prospect, 66, Krasnoyarsk, Russian Federation, 660041, e-mail: [fic@ksc.krasn.ru](mailto:fic@ksc.krasn.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7314-9418>

✉ – Для контактов / Corresponding author