

••• ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН •••

УДК: 633.16:632.4:631.52

**Калюсогенез зернового та овочевого гороху в умовах біотичного стресу
О.А.Задорожна, Л.Л.Юшкіна, Т.В.Сокол***Інститут рослинництва імені В.Я.Юр'єва УАН (Харків, Україна)
olzador@mail.ru*

Проведено дослідження калюсогенезу зернового та овочевого гороху (*Pisum sativum* L.) на живильних середовищах з додаванням культуральних фільтратів збудників темно-плямистого аскохітозу *Mycosphaerella pinodes* (Berk. et Blox) Vest. та блідо-плямистого аскохітозу – *Ascochyta pisi* Lib. Встановлено стимулюючий ефект фільтратів фітопатогенних грибів у використаних концентраціях. Для створення селективних середовищ з метою добору стійких до аскохітозу форм рекомендовано збільшити концентрацію фітопатогена у живильному середовищі.

Ключові слова: *горох, аскохітоз, in vitro, калюс, біотичний стрес.*

Вступ

Аскохітоз є однією з найпоширеніших хвороб гороху (*Pisum sativum* L.), що спричиняється грибами роду *Ascochyta*. Збудником темно-плямистого аскохітозу є *Mycosphaerella pinodes* (Berk. et Blox) Vest., конідиальна стадія *Ascochyta pinodes* L.K.Jones, блідо-плямистого аскохітозу – *Ascochyta pisi* Lib. Шкодочинність аскохітозу проявляється у зниженні схожості ураженого насіння (на 10–30 %), загніванні кореневої шийки та коренів рослин, зрідженні сходів, затримці розвитку рослин та дозрівання насіння. Ця хвороба гороху призводить також до значних втрат врожаю. За умови сильного ураження втрати урожаю насіння досягають 50–70 % (Михеева, 1976). У зв'язку з цим, актуальним завданням селекції гороху є створення форм, стійких до аскохітозу. За допомогою біотехнології цей процес значно прискорюється.

Відомо, що культивування та калюсогенез *in vitro* призводить до підвищення генетичної варіабельності клітин або соматоклональної мінливості. Генетичні відмінності у регенерантів підтверджені за допомогою RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) та ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) методів (Кузнецова и др., 2005). На цьому явищі соматоклональної мінливості базується метод клітинної селекції. Цей метод часто використовується для створення нових форм, стійких до абіотичних та біотичних чинників навколишнього середовища (Соболева, Лаханов, 2006; Мазур, Игнатова, 2006 та ін.). Відомо, що методи клітинної селекції використовувались для створення стійких до патогенів форм таких сільськогосподарських культур, як пшениця, ячмінь, картопля, горох (Шаяхметов, Асфандиярова, 1991; Карпухина и др., 1999; Chawla, Wenzel, 1987; Kosturkova et al., 1998, 2003).

В роботах, присвячених клітинній селекції гороху, вивчено (Соболева, Лаханов, 2006) культивування калюсів гороху, які являють собою специфічну біологічну популяцію соматичних клітин, з метою можливого відбору соматоклональних варіантів. Доведено, що практична значущість використання соматоклональних варіантів значно підвищується, якщо відбір генотипів ведеться на селективному середовищі. Так, авторами проведено відбір клітинних ліній, стійких до водного стресу, який базується на культивуванні рослинних клітин в модельних умовах на живильних середовищах з осмотично активними речовинами, зокрема поліетиленгліколем. В іншій роботі (Kosturkova et al., 1998) досліджено незрілі зародки гороху при культивуванні на живильному середовищі з додаванням культурального фільтрату *A. pisi* в концентраціях 20–40 %. Спостерігали різний вплив культурального фільтрату в залежності від концентрації. Автори визначили вплив фільтрату *A. pisi* як селективного агента з метою відбору рослин, стійких до цього патогена. В інших роботах цих авторів (Kosturkova et al., 2003) вивчено стресову відповідь рослинних тканин гороху на селективному середовищі для відбору більш стійких форм. В якості селективного фактора був використаний фітопатогенний фільтрат *Phoma medicaginis* var. *pinodella*, який містив фітотоксини та інші речовини. За результатами запропоновано використовувати як модель *in vitro* для вивчення біотичного стресу та забезпечення відбору *in vitro* клітинних ліній з високою стійкістю до патогена.

Проведені дослідження відображають значну актуальність проблеми культивування гороху *in vitro* з метою обґрунтування та розробки методів клітинної селекції цієї культури на стійкість до біотичних та абіотичних факторів.

Метою даної роботи було вивчення калюсогенезу сортів зернового і овочевого гороху в умовах біотичного стресу, а саме на живильних середовищах, до складу яких входили фільтрати фітопатогенних грибів *Mycosphaerella pinodes* та *Ascochyta pisi*.

Об'єкти та методи досліджень

Матеріалом для досліджень були калюси гороху посівного (*Pisum sativum*) сортів Інтенсивний-92 (UD0100669) зернового напрямку використання та Адагумський (UD0100567) овочевого напрямку використання. Насіння гороху, з якого отримували паростки для одержання експлантів, відповідало вимогам до посівних якостей (ГОСТ 20592-86).

Для отримання калюсів в якості експлантів використовували міжвузля і листки паростків гороху, які вирощували з насіння в умовах *in vitro* на половинній нормі безгормонального живильного середовища В5 (Gamborg et al., 1968). Для індукції калюсогенезу застосовували живильне середовище В5 з додаванням 0,8 г/л NH_4NO_3 , 0,3 г/л гідролізату казеїну, 0,1 г/л мезоінозиту, 2 мг/л нафтилоцтової кислоти (НОК), 1 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП), 30 г/л сахарози, 8 г/л агару (середовище I). Калюси потім пересаджували на інше середовище В5 з додаванням 5 мг/л БАП, 0,2 мг/л НОК, 0,2 г/л казеїну, 8 г/л агару та 30 г/л сахарози (Ежова и др., 1985) (середовище II). Умови біотичного стресу створювали на основі середовища II шляхом додавання до нього культуральних фільтратів фітопатогенних грибів у концентрації 50% та 10% за об'ємом. Культивування *in vitro* проводили при освітленні 4000 лк, світловому періоді 16 годин на добу та температурі $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Стан калюсогенезу зернового та овочевого гороху на середовищі з додаванням фітопатогенних фільтратів грибів визначався за приростом калюсної маси.

Для виготовлення фільтратів фітопатогенних грибів використовували культури *M. pinodes* та *A. pisi*, які вирощували на рідкому картопляному середовищі (Оршанская, 1960). Після розвитку гриба до пікнідіальної стадії послідовно проводили гомогенізацію та виготовлення фільтрату.

Варіанти досліду наступні: 1 – живильне середовище II (контроль 1); 2 – живильне середовище II з додаванням рідкого картопляного середовища, на якому вирощувались фітопатогенні гриби у концентрації за об'ємом 50% (контроль 2); 3 – живильне середовище II з додаванням 50% фільтрату *M. pinodes*; 4 – живильне середовище II з додаванням 10% фільтрату *M. pinodes*; 5 – живильне середовище II з додаванням 50% *A. pisi*; 6 – живильне середовище II з додаванням 10% фільтрату *A. pisi*. Обробка результатів проводилась за допомогою методів варіаційної статистики, що застосовуються для кількісних та якісних ознак (Лакин, 1990).

Результати та обговорення

За результатами проведених досліджень встановлено, що інтенсивність калюсогенезу зернового та овочевого сортів гороху залежала від генотипу, типу експланту та інтенсивності дії фільтрату фітопатогенів. Загальний приріст калюсної маси овочевого гороху перевищував за цим показником приріст зернового (рис. 1, 2). Калюси з експлантів-листіків виявили більшу чутливість до негативного впливу середовища або фільтратів фітопатогенів. Як в овочевого, так і в зернового гороху спостерігали пригнічення приросту калюсів у варіанті 2. У зернового гороху в цьому варіанті відбувалось зниження приросту калюсної маси у експлантів-міжвузль – на 80%. У овочевого гороху таке зниження складало відповідно 20% для експлантів-листіків та 60% для експлантів-міжвузль.

У зернового гороху вплив фітопатогенних фільтратів у варіантах 3, 4, 5, де експлантами були листки, не викликав приросту калюсів. Приріст калюсів був позитивний на цьому ж типі експланту у варіантах 2, 6 і складав відповідно 7 мг (100%) та 12%, у порівнянні з контролем 2. Приріст калюсів, утворених експлантами-міжвузлями у варіантах 3, 4, тобто з додаванням фільтрату *M. pinodes*, був більшим у порівнянні з контролем 2 у 4 та 3 рази. У варіантах 5, 6, тобто на середовищах з додаванням фільтрату *A. pisi*, спостерігали відповідно збільшення у 2 рази інтенсивності калюсогенезу та відсутність достовірних змін у порівнянні з контролем 2. Наведені дані свідчать про тенденцію до зменшення негативної дії фільтрату на калюсогенез при концентрації 10% у порівнянні з 50%. Такий факт може бути пояснено тим, що використана менша концентрація фільтрату у меншій мірі призводить до стимулюючого ефекту калюсогенезу.

У овочевого гороху визначили зниження приросту калюсної маси, яка була утворена листками, у варіанті 2. У решті варіантів для цього типу експланту не відзначали відмін від контролю 2 за приростом калюсної маси. Калюсогенез на експлантах-міжвузлях в усіх дослідних варіантах був приблизно на 30% інтенсивніший, ніж у контролі 2. Відсутність різниці за калюсогенезом у варіантах досліду при різних концентраціях фільтрату, що додавався у живильне середовище, можна пояснити генотиповими особливостями зразків, реакція яких на фітопатоген у фільтраті не виявила пропорційної залежності від концентрацій, які не перевищували порогові значення.

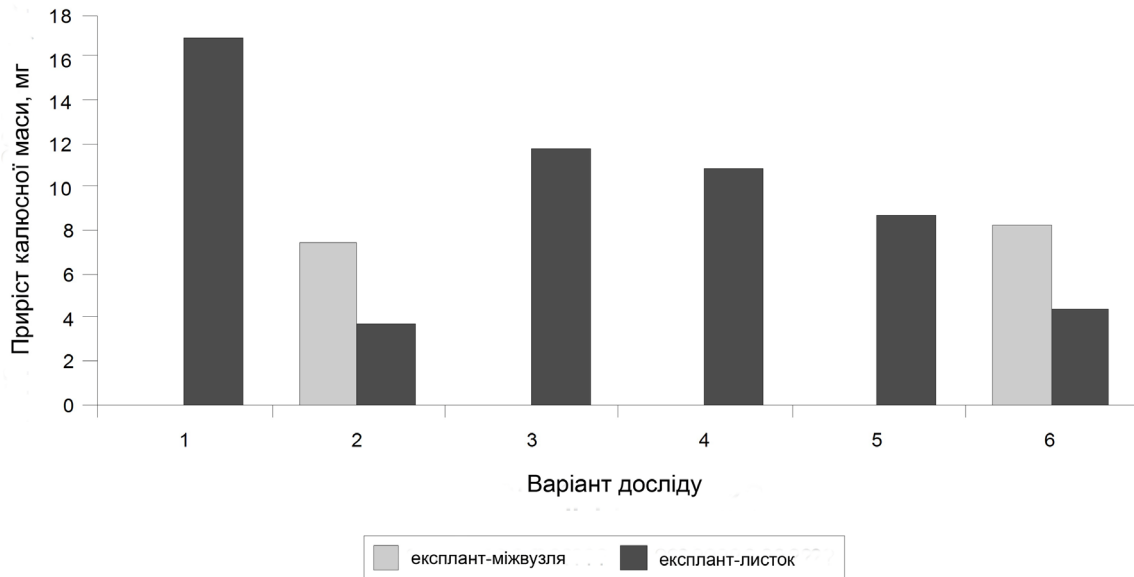


Рис. 1. Вплив культурального фільтрату *Mycosphaerella pinodes* та *Ascochyta pisi* на калюсогенез зернового гороху

1 – живильне середовище II (контроль 1); 2 – живильне середовище II з додаванням рідкого картопляного середовища у концентрації за об'ємом 50% (контроль 2); 3 – живильне середовище II з додаванням 50% фільтрату *M. pinodes*; 4 – живильне середовище II з додаванням 10% фільтрату *M. pinodes*; 5 – живильне середовище II з додаванням 50% *A. pisi*; 6 – живильне середовище II з додаванням 10% фільтрату *A. pisi*.

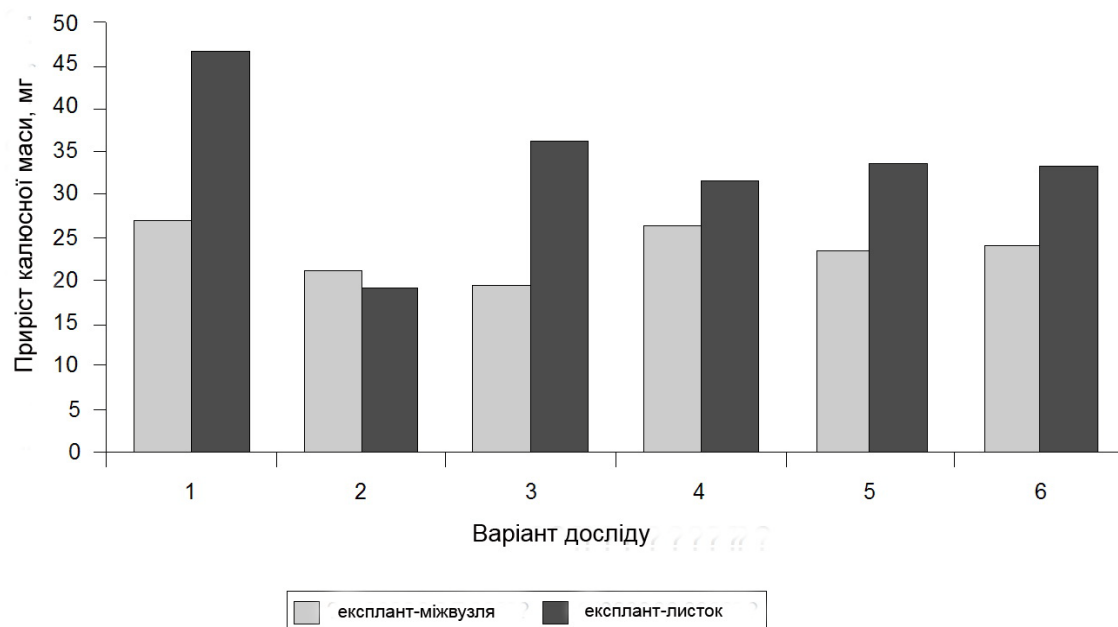


Рис. 2. Вплив культурального фільтрату *Mycosphaerella pinodes* та *Ascochyta pisi* на калюсогенез овочевого гороху

1 – живильне середовище II (контроль 1); 2 – живильне середовище II з додаванням рідкого картопляного середовища у концентрації за об'ємом 50% (контроль 2); 3 – живильне середовище II з додаванням 50% фільтрату *M. pinodes*; 4 – живильне середовище II з додаванням 10% фільтрату *M. pinodes*; 5 – живильне середовище II з додаванням 50% *A. pisi*; 6 – живильне середовище II з додаванням 10% фільтрату *A. pisi*.

Таким чином, встановлено вплив культуральних фільтратів *M. pinodes* та *A. pisi* на калюсогенез використаних сортів гороху. Аналіз одержаних даних показав, що використані концентрації фільтратів патогенних грибів *M. pinodes* та *A. pisi* у більшості випадків чинили не пригнічення, а стимулюючу дію на калюсогенез зернового та овочевого гороху, що частіше спостерігається при незначному впливі стресових факторів. Для проведення клітинної селекції та створення рослин, стійких до аскохітозу, необхідно підібрати таку концентрацію фітопатогена у живильному середовищі, яка спричиняє відбір клітин, здатних до адаптації в умовах біотичного стресу під час калюсогенезу.

Висновки

Інтенсивність калюсогенезу зернового та овочевого гороху в умовах біотичного стресу, створеного додаванням до живильного середовища фільтратів збудників темно-плямистого аскохітозу *Mycosphaerella pinodes* та блідо-плямистого аскохітозу *Ascochyta pisi*, залежить від генотипу зразка, типу експланта та концентрації фітопатогенного фільтрату у живильному середовищі.

Список літератури

- Ежова Т.А., Багрова А.М., Гостимский С.А. Побегообразование в каллусах из верхушек стеблей, эпикотилей, междоузлий и листьев различных генотипов гороха // Физиология растений. – 1985. – Т.32. – Вып.3. – С. 513–520.
- Карпухина А.М., Долгова Е.М., Юшкина Л.Л., Кузьмина Н.Н. Разработка селективных сред для повышения устойчивости к грибным заболеваниям у ярового ячменя // Физиология и биохимия культурных растений. – 1999. – Т.31, №5. – С. 382–386.
- Кузнецова О.И., Аш О.А., Хартина Г.А., Гостимский С.А. Исследование растений-регенерантов гороха (*Pisum sativum* L.) с помощью молекулярных маркеров RAPD- и ISSR-маркеров // Генетика. – 2005. – Т.41, №1. – С. 71–77.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352с.
- Мазур А.Л., Игнатова С.А. Определение сублетальных концентраций филтраты *Fusarium graminearum* Schwabe для получения устойчивых форм мягкой пшеницы в культуре *in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. / Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І.Вавилова / За ред. М.В.Роїка. – К.: Логос, 2006. – Т.3. – С. 484–489.
- Михеева Р.И. Аскохитоз гороха. – Л.: «Колос», 1976. – 53с.
- Оршанская В.Н. Обработка семян токсинами фитопатогенных грибов как метод отбора растений, устойчивых к грибным заболеваниям // Агробиология. – 1960. – Т.124, №4. – С. 573–578.
- Соболева Г.В., Лаханов А.П. Разработка методов отбора соматоклональных вариантов гороха (*Pisum sativum* L.), устойчивых к действию осмотического стресса // Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной памяти профессора Анатолия Петровича Лаханова «Регуляция продукционного процесса сельскохозяйственных растений». Ч.2. – Орел: Всероссийский научно-исследовательский институт зернобобовых и крупяных культур, 2006. – С. 177–184.
- Шаяхметов И.Ф., Асфандиярова Р.Р. Влияние фитотоксичных метаболитов *Bipolaris sorokiana* (Sacc.) Sh. на рост каллусной ткани и регенерацию растений пшеницы // Физиология растений. – 1991. – Т.3. – Вып.2. – С. 399–405.
- Chawla H.S., Wenzel G. In vitro selection of barley and wheat for resistance against *Helminthosporium sativum* // Theor. Appl. Genet. – 1987. – Vol.74, №6. – P. 841–845.
- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // Exp. Cell. Res. – 1968. – Vol.50, №1. – P. 151–158.
- Kosturkova G., Angelov G., Rodeva R. et al. In vitro modeling of biotic stress higher resistance of pea cultures to *Phoma medicaginis* var. *pinodella* culture filtrates // Proceedings Vth Int. Symposium "BioProcesses'03". – Sofia, 2003. – P. 186–189.
- Kosturkova G.P., Rodeva R., Mehandjiev A. In vitro resistance of pea (*Pisum sativum*) to *Ascochyta pisi* // 3rd European conference on grain legumes "Opportunities for high quality, healthy and added-value crops to meet European demands". – Valladoild, Spain: European Association for Grain Legume Research, INRA Station d'Amelioration des Plantes, France, 1998. – P.482.

**Каллусогенез зернового и овощного гороха в условиях биотического стресса
О.А.Задорожная, Л.Л.Юшкина, Т.В.Сокол**

Проведено исследование каллусогенеза зернового и овощного гороха (*Pisum sativum* L.) на питательных средах с добавлением культурального фильтрата возбудителей темно-пятнистого аскохитоза *Mycosphaerella pinodes* (Berk. et Blox) Vest. и светло-пятнистого аскохитоза *Ascochyta pisi* Lib. Установлен стимулирующий эффект фильтратов фитопатогенных грибов в использованной концентрации. Для создания селективных сред с целью отбора устойчивых к аскохитозу форм рекомендовано увеличить концентрацию фитопатогенов в питательной среде.

Ключевые слова: *горох, аскохитоз, in vitro, каллус, биотический стресс.*

**Callusogenesis of grain and vegetable pea under the biotic stress conditions
O.A.Zadorozhna, L.L.Yushkina, T.V.Sokol**

The study of callusogenesis of grain and vegetable pea (*Pisum sativum* L.) on medium with phytopathogenic fungies *Mycosphaerella pinodes* (Berk. et Blox) Vest. and *Ascochyta pisi* Lib has been carried out. The positive effect of phytopathogenic fungies filtrate has been determined. It is recommended to increase the phytopathogene filtrate in the medium for creation of selective medium for the selection of resistant to these fungies forms.

Key words: *pea, Mycosphaerella, Ascochyta, in vitro, callus, biotic stress.*

**Представлено П.Ю.Монтвідом
Рекомендовано до друку В.В.Жмурком**