

УДК: 635.656:576.53

## КУЛЬТИВУВАННЯ ГОРОХУ (*PISUM SATIVUM L.*) В УМОВАХ БІОТИЧНОГО СТРЕСУ

О.А.Задорожна, Л.Л.Юшкіна, Т.В.Сокол  
Інститут рослинництва ім.В.Я.Юр'єва

Досліджено особливості культивування каллусів 8 сортів гороху *Pisum sativum L.* на селективних середовищах з вмістом фільтрату культуральної рідини *Ascochyta pisi Lib.* Виявлені особливості реакції різних генотипів гороху на біотичний стрес за зміною кольору каллусу та частотою пагоноутворення.

**Ключові слова:** культивування, горох, біотичний стрес.

**Вступ.** Під час вегетації сільськогосподарські рослини часто піддаються впливу багаточисельних негативних біотичних та абіотичних факторів, що може спричинити зниження урожайності та втрати насінням необхідних показників якості. В умовах *in vitro* можна змоделювати біотичні та абіотичні стреси, що полегшує прогнозування поведінки рослин *in vivo* та дає змогу тестування на стійкість до цих факторів та можливість отримання стійких форм рослин завдяки методам клітинної селекції.

Для такої важливої сільськогосподарської культури як горох (*Pisum sativum L.*) моделювання умов біотичного та абіотичного стресу, добір стійких форм за допомогою клітинної селекції є дуже актуальним питанням. Досліджень цього напрямку дуже мало [1-3]. В роботі Г.В.Соболевої та А.П.Лаханова [1] проведено відбір клітинних ліній, стійких до водного стресу, який базується на культивуванні рослинних клітин в модельних умовах на поживних середовищах з осмотично активними речовинами, зокрема поліетиленгліколем. В роботах G.Kosturkova at al. [2] вивчено стресову відповідь при культивуванні незрілих зародків гороху на поживному середовищі з додаванням культурального фільтрату *Ascochyta pisi Lib.* В іншій роботі [3] вивчено культивування рослинних тканин гороху на селективному середовищі для відбору більш стійких форм до *Phoma medicaginis var. pinodella*. За результатами досліджень запропоновано використовувати для вивчення біотичного стресу та забезпечення відбору клітинних ліній з високою стійкістю до патогену моделі *in vitro*. Таким чином, питання розроблено недостатньо і потребує подальшого вивчення.

Метою даної роботи було встановити порівняльну здатність до каллусогенезу та регенерації гороху *in vitro* в умовах біотичного стресу, спричиненого токсинами *A. pisi*.

**Матеріал і методи досліджень.** Матеріалом для досліджень були сорти гороху (*Pisum sativum L.*) (таб.1).

Насіння стерилізували за стандартною методикою. Експланти одержували з асептичних паростків. Експланти висаджували на два калусогенні поживні середовища. Обидва середовища містили макро-, мікросолі і вітаміни середовища В5 [4], 30 г/л сахарози, 7 г/л агару. В перше калусогенне середовище додавали 0,1 мг/л БАП, 5 мг/л НОК [5]. В друге калусогенне

Таблиця 1

### Сорти гороху, використані у дослідженнях

№з/п	Назва сорту	№ Націон. каталогу	Країна походження
1	Норд	UD0100434	Росія

2	Зубр	UD0100193	Росія
3	Совершенство 52	UD0101375	Росія
4	Dunav	UD0102062	Сербія/Чорногорія
5	Asterix	UD0102065	Нідерланди
6	Пегас	UD0101387	Україна
7	Алла	UD0101728	Росія
8	P.S. Afganistan	UD0101461	Великобританія

середовище додавали 0,1 мг/л БАП, 0,2 мг/л НОК, 0,8 г/л  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1 г/л казеїну [6].

Культивували експланти на каллусогенному середовищі на протязі 3-4 тижнів. Каллуси переносили на середовище, що вміщувало макро- і мікросолі MS [6] і вітаміни середовища B5 [3] з додаванням 5 мг/л БАП, 0,2 мг/л НОК, 30 г/л сахарози, 7 г/л агару.

Для створення селективного середовища використовували збудник блідо-плямистого аскохітозу *A. pisi*, який вирощували на рідкому картопляному середовищі [8]. Після розвитку гриба до пікнідіальної стадії проводили гомогенізацію та виготовляли фільтрат культуральної рідини (ФКР). Виготовлений ФКР додавали до морфогенного середовища у кількості 50% за об'ємом.

Оцінка матеріалу проводилась на контрольному та селективному середовищі за кольором каллусів і частотою пагоноутворення. Частоту бурих каллусів визначали за відношенням кількості бурих каллусів до загальної кількості каллусів. Частоту пагоноутворення визначали за відношенням кількості експлантів, які утворили пагони до загальної кількості висаджених експлантів.

Аналіз показників проводився за допомогою методів вараційної статистики [9].

**Результати досліджень.** За результатами досліджень культивування різних сортів гороху на селективному та контрольному середовищі встановлено, що каллусогенез вивчених сортів гороху на різних середовищах істотно не відрізнявся. Утворення пагонів спостерігали на експлантах з верхівкових бруньок та сім'ядольного вузла. Кількість пагонів на першому та другому середовищі становила для сортів Asterix - 0 та 16%, Пегас 0 та 19%, Алла 13 та 30% відповідно. Для сортів Зубр та Dunav різниці за цим показником в залежності від середовища не спостерігалось та складала для сорту Зубр 17%, Dunav – 19%. Одержані дані свідчать про те, що на другому каллусогенному середовищі частота пагоноутворення була вищою у сортів Asterix, Пегас та Алла. Середня частота пагоноутворення для вивчених сортів становила 1 пагін на експлант.

Отримані пагони видалялись і експланти переносились на морфогенні контрольні та селективні середовища. Через 10 діб культивування у деяких сортів спостерігали поступову зміну кольору каллусу – з зеленого на бурий. Така зміна кольору спостерігалась у сортів Норд і складала у контрольному та дослідному варіанті відповідно 0% та 100%, Зубр 23% та 56%, Совершенство 52 - 0% та 94%, Dunav – 3% та 30%, Asterix – 19% та 40%, Sonata 0% та 88%, Пегас – 23% та 88%, Алла – 70% та 72%. Тобто кількість бурих каллусів на селективних середовищах була вищою, ніж на звичайних (рис.1., таб.1). Одержані дані свідчать, що реакція на біотичний стрес залежить від генотипу зразка. Для більшості сортів спостерігали достовірні збільшення кількості бурих каллусів на селективному середовищі.

При культивуванні на селективних середовищах впродовж 10 діб на експлантах спостерігали утворення пагонів як на селективному середовищі, так і в контрольних варіантах. Пагоноутворення складало для сорту Норд – 0% (контроль 20%), для сорту Зубр – 0% (контроль

8%), для сорту Совершенство 52 – 13% (контроль 0%), Дунав – 5% (контроль 3%), Пегас – 7% (0%), Алла – 20% (0%) (рис.2).

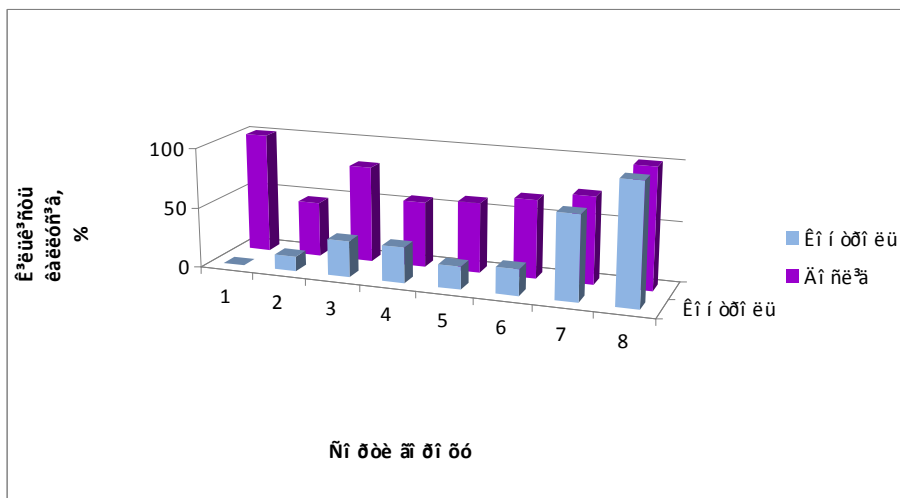


Рис.1. Кількість бурих каллусів через 10 днів культивування, %

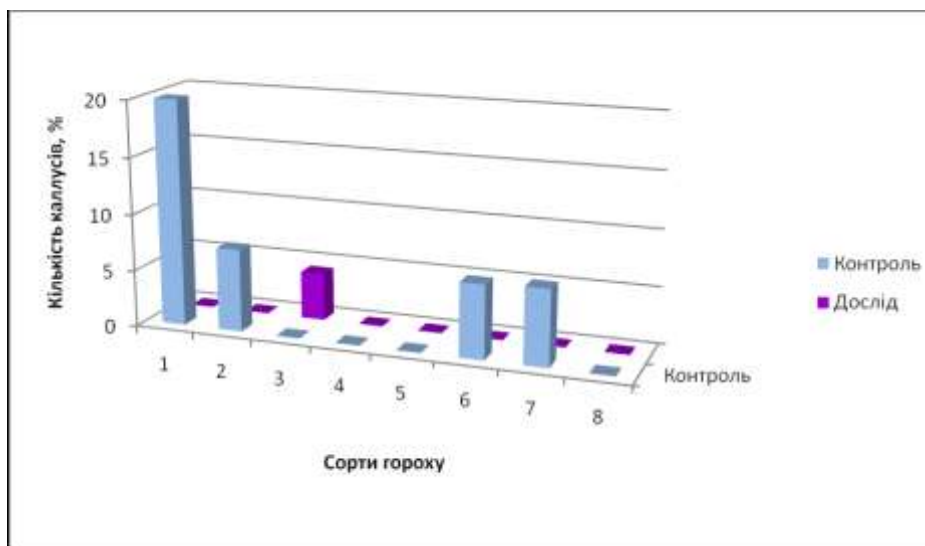


Рис.2. Кількість пагонів через 10 днів культивування, %

При подальшому культивуванні відсоток бурих каллусів збільшувався. В усіх вивчених зразків на селективному середовищі спостерігали більшу кількість бурих каллусів (рис.3) та у більшості випадків меншу кількість пагонів (рис.4). Тобто спостерігали погіршення морфогенних процесів на селективному середовищі. Це може пояснюватись негативним впливом на цей процес термостабільних мікотоксинів *A. pisi Lib.*

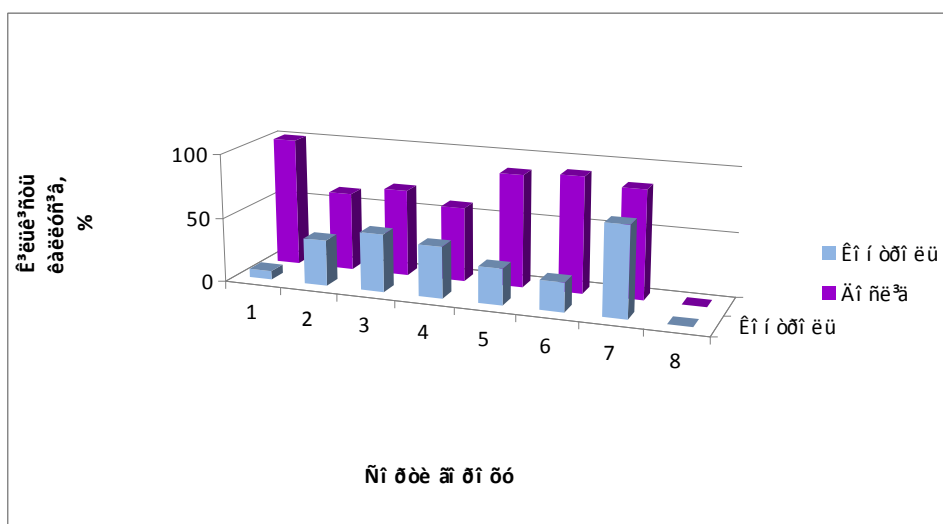


Рис.3. Кількість брухих каллусів через 28 днів культивування,%

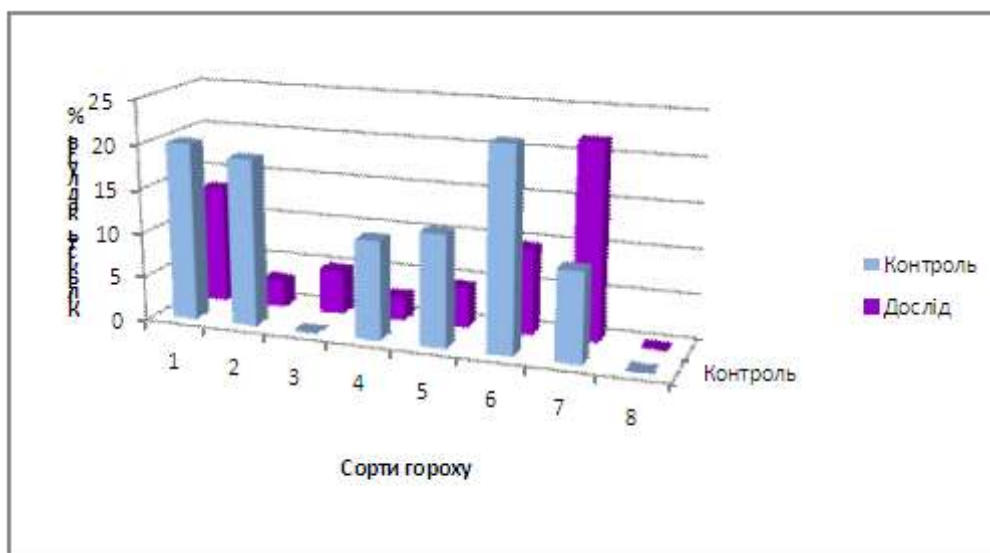


Рис.4. Кількість пагонів через 28 днів культивування, %

## Висновки

Таким чином, визначено, що культивування гороху на селективному середовищі з фільтратом *A. pisi* Lib., тобто в модельних умовах біотичного стресу, проходив зі збільшенням частоти брухих каллусів і зменшенням частоти пагоноутворення на експлантах у порівнянні з контролем. Виявлені особливості реакції різних генотипів гороху на біотичний стрес за зміною кольору каллусу та частотою пагоноутворення. Отримані дані свідчать про можливість тестування форм гороху на стійкість до біотичного стресу в умовах *in vitro* та подальший добір стійких форм.

## Література

1. *Соболева Г.В., Лаханов А.П.* Разработка методов отбора соматоклональных вариантов гороха (*Pisum sativum* L.), устойчивых к действию осмотического стресса // Регуляция продукционного процесса сельскохозяйственных растений: Материалы Всероссийской НПК, посвященной памяти А.П. Лаханова (октябрь 2005 г.), ч.2. -Орел: Всероссийский научно-исследовательский институт зернобобовых и крупяных культур, 2006. –С.177–184.

2. Kosturkova G., Angelov G., Rodeva R., Tchorbadjieva M., Mehandjiev A. In vitro modelling of biotic stress-higher Resistance of pea cultures to *Phoma medicaginis* var. *pinodella* culture filtrates//Proceedings V<sup>th</sup> Int.Symposium "BioProcesses'03", Sofia. –2003. –P.186–189.
3. Kosturkova G.P., Rodeva R., Mehandjiev A. In vitro resistance of pea (*Pisum sativum*) to *Ascochyta pisi* // 3<sup>rd</sup> 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.
4. Соболева Г.В., Зеленов А.Н. Морфогенез и регенерация растений в длительно-пассируемой каллусной культуре гороха посевного (*Pisum sativum* L.) //Научное обеспечение производства зернобобовых и крупяных культур. – Орел, 2004. –С.213–219.
5. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K.. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // Exp.Cell. Res. -1968. -50. -№1. -P.151-158.
6. Кузнецова О.И., Аш О.А., Хартина Г.А. и др. Исследование растений-регенерантов гороха (*Pisum sativum* L.) с помощью молекулярных маркеров RAPD- и ISSR- маркеров // Генетика.- 2005.-Т.41.-№1.-С.71-77.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. -1962. -15. -P.473-497.
8. Оршанская В.Н. Обработка семян токсинами фитопатогенных грибов как метод отбора растений, устойчивых к грибным заболеваниям //Агробиология.-1960.-124.-4.-С.573-578.
9. Вольф В.Г. Статистическая обработка опытных данных.-1966.-М. Колос.-255с.

**О.А.Задорожная, Л.Л.Юшкина, Т.В.Сокол. Культивирование гороха (PISUM SATIVUM L.) в условиях биотического стресса**

*Изучены особенности культивирования каллусов 8 сортов гороха Pisum sativum L. на селективных средах с добавлением фильтрата культуральной жидкости Ascochyta pisi Lib. Выявлены особенности реакции разных генотипов гороха на биотический стресс по изменению цвета каллуса и частоты побегообразования.*

**Ключевые слова:** культивирование, горох, биотический стресс.

**O.A.Zadorozhna, L.L.Yushkina, T.V.Sokol. Pea (PISUM SATIVUM L.) cultivation under biotic stress condition**

*It has been studied specialities of Pisum sativum L. callus cultivation of selective medium with culture filtrate of Ascochyta pisi Lib. It is established reaction of different pea genotypes under biotic stress by change of callus colour and frequency of shoot formation.*

**Keywords:** cultivation, Pea, under biotic stress.