УДК 635.656:576.53

РЕАКЦІЯ ЗЕРНОВОГО, ОВОЧЕВОГО ТА УКІСНОГО ГОРОХУ НА БІОТИЧНИЙ СТРЕС В МОДЕЛЬНИХ УМОВАХ IN VITRO

О.А. ЗАДОРОЖНА, Т.В. СОКОЛ, Л.Л. ЮШКІНА

Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва Української академії аграрних наук 61060 Харків, Московський просп., 142

Досліджено особливості культивування in vitro зернового, овочевого, укісного гороху (*Pisum sativum* L.) в модельних умовах біотичного стресу, викликаного фільтратом *Ascochyta pisi* Lib. Встановлено різну реакцію на біотичний стрес зернового та овочевого гороху.

Ключові слова: *Pisum sativum* L., *Ascochyta pisi* Lib., овочевий, зерновий, укісний горох, стійкість, біотичний стрес, модельні умови.

Аскохітоз — найшкідливіше й найпоширеніше у світі захворювання гороху (*Pisum sativum* L.). Серед його збудників у зоні Північного Лісостепу України провідним є *Ascochyta pisi* Lib., що викликає блідо-плямистий аскохітоз. Ця хвороба виявляється комплексом патологічних процесів, які відбуваються в рослині під впливом гриба *A. pisi*, зокрема зменшенням кількості рослин на одиниці площі на момент збирання внаслідок зниження польової схожості, загибеллю паростків і молодих рослин, зменшенням асиміляційної поверхні листків та інтенсивності фотосинтезу, обпаданням зав'язі, зниженням врожайності [6].

Тестування сільськогосподарських рослин на стійкість до фітопатогенів проводять в умовах інфекційного фону, в сучасній науці — часто на моделях. Матеріалом слугують різні рослинні тканини. Для моделювання умов впливу фітопатогену використовують поживне середовище з додаванням чистого токсину або фільтрату культуральної рідини (ФКР) патогенного гриба. Так, досліджено реакцію пилку на фітотоксини як тест-систему оцінювання стійкості сої до фузаріозу [7]. Вивчено реакцію калюсів на метаболіти фітопатогенів пшениці [8, 9] та ячменю [3]. Проведено одиничні дослідження з вивчення в модельних умовах реакції гороху на збудник аскохітозу [2, 11]. Досліджувати стійкість рослин до біотичного й абіотичного стресів у модельних умовах зручно з використанням калюсів як рослинного матеріалу.

Культура клітин in vitro — штучно створена біологічна система, клітини якої вийшли з-під контролю регуляції організмом. Таку систему вважають популяцією, в якій здійснюються популяційні механізми контролю розвитку, тобто їм притаманна висока генетична і фізіологічна варіабельність. Якщо подібні процеси відбуваються на селективному середовищі, то стає можливим добір клітинних ліній із цікавими для селекції властивостями. Саме на цьому явищі ґрунтуються методи клітинної селекції.

© О.А. ЗАДОРОЖНА, Т.В. СОКОЛ, Л.Л. ЮШКІНА, 2009

Дані щодо тестування рослин гороху на стійкість до аскохітозу обмежені. Практично не досліджена відмінність у сприйнятті до цієї хвороби гороху різних напрямів господарського використання [2], хоча ця проблема має важливе селекційне значення.

У зв'язку з цим метою нашої роботи було з'ясування реакції зернових, овочевих та укісних сортів гороху в модельних умовах біотичного стресу in vitro, спричиненого дією токсинів *Ascochyta pisi* Lib.

Методика

Матеріалом для досліджень було насіння гороху (*Pisum sativum* L.) зернового — сортів Норд (UD0100434), Sonata (UD0101735) Зубр (UD0100193), овочевого — Совершенство 52 (UD0101375), Dunav (UD0102062), Asterix (UD0102065), Пегас (UD0101387), укісного — Алла (UD0101728), P.S. Afganistan (UD0101461) напрямів використання з колекції Національного центру генетичних ресурсів рослин України.

Насіння стерилізували за стандартною методикою: спочатку його промивали розчином детергента, потім обробляли 96 %-м розчином етанолу (30 с), 50 %-м розчином комерційного засобу «Доместос», що містив гіпохлорит (20 хв), і тричі промивали стерильною дистильованою водою. Стерильне насіння висівали на штучне поживне середовище, яке містило 50 % макро- і мікросолей, вітамінів середовища B5 [10], 1 % сахарози, 8 г/л агару. Як експлантати використовували верхівкові бруньки, сім'ядольні вузли, гіпокотилі, епікотилі. Їх висаджували на калюсогенне поживне середовище на основі середовища B5.

Після культивування експлантатів на калюсогенному середовищі упродовж 3—4 тижнів калюси переносили на середовище, яке містило макро- і мікросолі MC [12] та вітаміни середовища B5 із додаванням 5 мг/л БАП, 0,2 мг/л НОК, 30 г/л сахарози, 7 г/л агару. Культивування in vitro проводили за освітлення 4000 лк, світлового періоду 16 год на добу й температури 24 ± 2 °C.

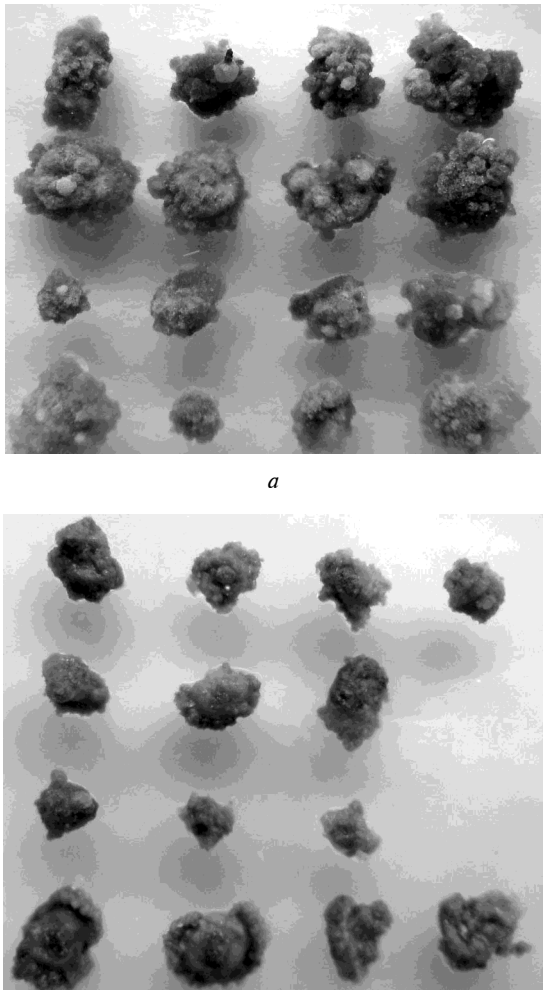
Для створення умов біотичного стресу на селективному середовищі використовували збудник блідо-плямистого аскохітозу *A. pisi*, вирощений на рідкому картопляному середовищі [5]. Після розвитку гриба до пікнідіальної стадії проводили гомогенізацію й виготовляли фільтрат культуральної рідини (ФКР), який додавали до морфогенного середовища у кількості 50 % за об'ємом.

Експлантати в умовах біотичного стресу оцінювали за кольором калюсів і частотою пагоноутворення. На дослідному й контрольному середовищах підраховували кількість бурих калюсів відносно загальної їх кількості. Частоту пагоноутворення визначали за відношенням кількості експлантатів, які утворили пагони, до загальної кількості висаджених. Загальна кількість висаджених експлантатів для зернового гороху становила 163, для овочевого — 443, для укісного — 96 шт.

Аналізували показники методами варіаційної статистики [1].

Результати та обговорення

Через 11 діб культивування на селективному середовищі в дослідних варіантах спостерігали вірогідне збільшення кількості бурих калюсів (рис. 1) в овочевого й зернового гороху, в укісного — лише тенденцію до їх збільшення (рис. 2, *а*). За модельних умов кількість бурих калюсів



а

б

Рис. 1. Калюсогенез гороху за контрольних (*а*) та дослідних (*б*) умов

порівняно з контролем у зернового гороху збільшувалась на 56, в овочевого — на 36, в укісного — лише на 10 % (абс.).

Через 28 діб культивування реакції на стрес зернового й овочевого гороху майже не відрізнялись і виявились у збільшенні кількості бурих калюсів у дослідних варіантах приблизно на 40 % порівняно з контролем, в укісного гороху кількість бурих калюсів майже не змінювалась і в дослідному варіанті перевищувала контроль на 12 % (див. рис. 2, *б*).

Відомо, що важливу роль у захисті рослин від абіотичних і біотичних стресових чинників відіграють майже всі класи вторинних метаболітів [4]. У культурі клітин також інтенсифікується вторинний метаболізм під впливом сигналів, які регулюють вторинний метаболізм в інтактній рослині чи за моделювання відповідних умов.

Як показник реакції на біотичний стрес ми вивчали також частоту пагоноутворення (рис. 3). Через 11 діб культивування в дослідних варіантах гороху пагони взагалі не утворились, на відміну від контрольних, де спостерігався їх ріст (рис. 4, *а*).

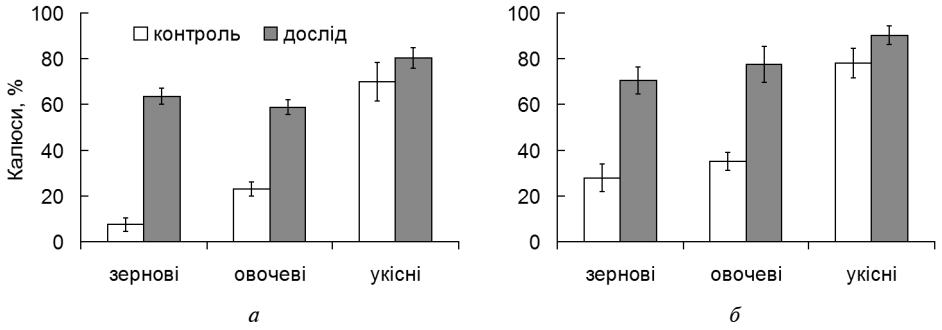
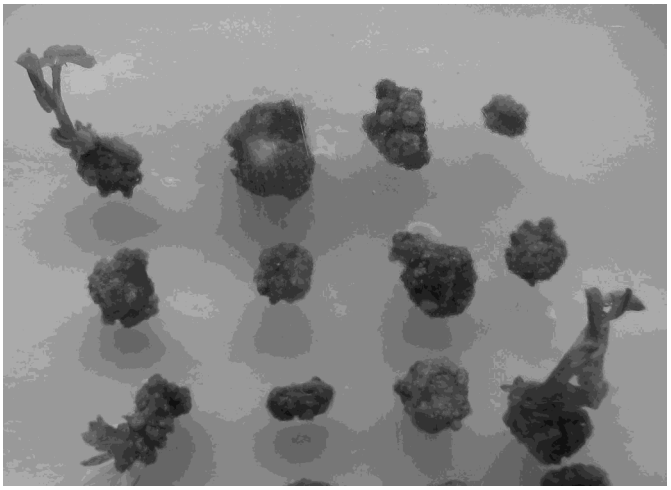


Рис. 2. Кількість бурих калюсів у гороху після 11 (*а*) та 28 (*б*) діб культивування

Через 28 діб культивування спостерігали майже втричі меншу кількість пагонів у дослідному варіанті овочевого гороху, ніж у контрольному. У зернового й укісного гороху кількості пагонів у дослідному і контрольному варіантах вірогідно не відрізнялись, хоча в дослідному варіанті спостерігалась тенденція до зменшення кількості пагонів у зернового гороху та її збільшення — в укісного (див. рис. 4, *б*). Можна узагальнити, що в овочевого гороху в дослідному варіанті вірогідно збільшувалась кількість бурих калюсів і зменшувалась кількість пагонів. У зернового гороху в дослідних і контрольних варіантах зафіксовано найбільшу різницю за кількістю бурих калюсів через 11 діб культивування і тенденцію до зменшення кількості пагонів. Це може означати, що найсильніша реакція на біотичний стрес у подальшому призвела до слабкого пригнічення пагоноутворення. В укісного гороху спостерігали відсутність реакції на біотичний стрес за побурінням калюсів і тенденцію до збільшення кількості пагонів. Можливо це пов'язано з тим, що в зернових сортів виявляються ознаки стійкості до токсинів аскохітозу, а в укісних — ознаки несприйнятливості, тобто імунності. Отже, справедливе припущення, що стресова реакція, яка виявляється в побурінні калюсів через 11 діб

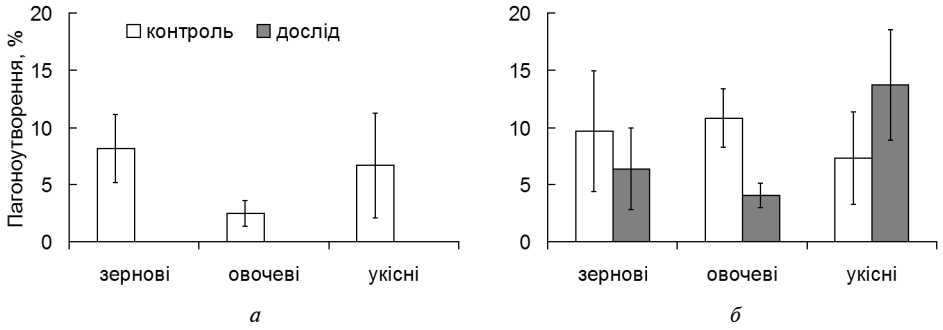
а

Закінчення рис.3 див. на наступній сторінці



б

Рис. 3. Пагоноутворення в гороху контрольних (*а*) і дослідних (*б*) варіантів



а *б*

Рис. 4. Частота пагоноутворення в гороху після 11 (*а*) і 28 (*б*) діб культивування

культивування, є ознакою подальшої стійкості рослини до конкретного патогену.

За результатами досліджень, проведених у модельних умовах, визначено, що на перших етапах впливу стресових чинників овочеві сорти гороху реагують слабкіше, ніж зернові, а подальший їх вплив супроводжується зниженням рівня пагоноутворення.

Для зернових сортів гороху характерна найінтенсивніша реакція на стрес на початкових етапах культивування, в подальшому спостерігалась лише тенденція до зниження рівня пагоноутворення. У досліджених укісних сортів гороху не виявлено істотної реакції на біотичний стрес, тобто в модельних умовах на біотичний стрес реагують зерновий та овочевий горох і не реагує укісний.

1. *Вольф В.Г.* Статистическая обработка опытных данных. — М.: Колос, 1966. — 255 с.
2. *Задорожна О.А., Юшкіна Л.Л., Сокол Т.В.* Калюсогенез зернового та овочевого гороху в умовах біотичного стресу // Вісн. Харків. ун-ту. Сер. Біологія. — 2007. — Вип. 6 (№ 788). — С. 177—181.
3. *Карпухина А.М., Долгова Е.М., Юшкина Л.Л., Кульмина Н.Н.* Разработка селективных сред для повышения устойчивости к грибным заболеваниям у ярового ячменя // Физиология и биохимия культ. растений. — 1999. — **31**, № 5. — С. 382—386.
4. *Носов А.М.* Функции вторичных метаболитов растений in vivo и in vitro // Физиология растений. — 1994. — **41**, № 6. — С. 873—878.

5. *Оршанская В.Н.* Обработка семян токсинами фитопатогенных грибов как метод отбора растений, устойчивых к грибным заболеваниям // Агробиология. — 1960. — **124**, № 4. — С. 573—578.
6. *Петренкова В.П., Маркова Т.Ю., Сокол Т.В.* Хвороби та шкідники гороху. — Харків: Ін-т рослинництва ім. В.Я. Юр'єва УААН, 2005. — 40 с.
7. *Простакова Ж.Г., Бронштейн А.И., Балашова Н.Н.* Реакция пыльцы на токсин как тест-система оценки устойчивости сои к фузариозу // С.-х. биология. — 1993. — № 3. — С. 32—37.
8. *Шаяхметов И.Ф., Асфандиярова Р.Р.* Влияние фитотоксичных метаболитов *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Sh. на рост каллусной ткани и регенерацию растений пшеницы // Физиология растений. — 1991. — **3**, вып. 2. — С. 399—405.
9. *Шевелуха В.С., Рогинская В.А., Хижняк С.В.* Перспективы использования токсинов возбудителя обыкновенной корневой гнили зерновых в клеточной селекции // С.-х. биология. — 1992. — № 2. — С. 45—51.
10. *Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K.* Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // Exp. Cell Res. — 1968. — **50**, N 1. — P. 151—158.
11. *Kosturkova G.P., Rodeva R., Mehandjiev A.* In vitro resistance of pea (*Pisum sativum*) to *Ascochyta pisi* // Opportunities for High Quality, Healthy and Added-Value Crops to Meet European Demands: 3rd European Conf. on Grain Legumes (Nov. 14—19, 1998). — Valladoild, Spain: European Association for Grain Legume Research, INRA Station d'Amelioration des Plantes, France. — 1998. — P. 482.
12. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. — 1962. — **15**. — P. 473—497.

Отримано 02.02.2009

РЕАКЦИЯ ЗЕРНОВОГО, ОВОЩНОГО И УКОСНОГО ГОРОХА НА БИОТИЧЕСКИЙ СТРЕСС В МОДЕЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ IN VITRO

О.А. Задорожная, Т.В. Сокол, Л.Л. Юшкина

Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева Украинской академии аграрных наук, Харьков

Исследованы особенности культивирования in vitro зернового, овощного, укосного гороха (*Pisum sativum* L.) в модельных условиях биотического стресса, вызванного *Ascochyta pisi* Lib. Установлена разная реакция на биотический стресс зернового и овощного гороха.

GRAIN, VEGETABLE AND HAY HARVEST PEA REACTION ON BIOTIC STRESS UNDER MODEL CONDITIONS IN VITRO

O.A. Zadorozhna, T.V. Sokol, L.L. Yushkina

Ya. Yuriev Plant Production Institute, Ukrainian Academy of Agricultural Sciences
142 Moskovskiy pr., Kharkiv, 61060, Ukraine

Peculiarities of grain, vegetable and hay harvest pea (*Pisum sativum* L.) in vitro cultivation under model conditions of biotic stress, induced by *Ascochyta pisi* Lib. has been investigated. Different reaction on biotic stress for grain and vegetable pea was determined.

Key words: *Pisum sativum* L., *Ascochyta pisi* Lib., grain, vegetable, hay harvest pea, resistance, biotic stress, model conditions.