

УДК 631.147:633.11.111

СКРИНИНГ РЕЗИСТЕНТНЫХ КАЛЛУСОВ ГОРОХА (*PISUM SATIVUM L.*) НА СЕЛЕКТИВНЫХ СРЕДАХ С КУЛЬТУРАЛЬНЫМ ФИЛЬТРАТОМ *FUSARIUM OXYSPORUM L.*

Д.С. Тагиманова, Ж.А. Рашиденова, О.Н. Хапилина

Национальный центр биотехнологии, Астана, Казахстан.
oksfur@mail.ru

Горох является ведущей зернобобовой культурой, широко возделываемой в Республике Казахстан. Для создания новых сортов, отличающихся высокой урожайностью, устойчивостью к болезням, необходимо использовать методы биотехнологии, в том числе и клеточную селекцию, при которой в условиях *in vitro* проводят отбор клеточных популяций, устойчивых к селективному фактору, и затем регенерируют целые растения.

Возделывание гороха в регионе связано с высокой поражаемостью гороха грибными болезнями и вредителями на фоне чередующихся засух. Потери урожая гороха от вредителей и болезней могут достигать более 30-50%. Из болезней гороха наиболее опасны корневые гнили, аскохитоз, пероноспороз, серая гниль, мучнистая роса, фузариоз, ржавчина, бактериоз. В условиях Северного Казахстана, фузариоз наиболее опасен, поскольку возделывание гороха усугубляется еще и недостатком влаги.

Целью проводимых исследований являлось выделение типового штамма грибов рода *Fusarium* и оптимизация условий каллусообразования гороха на селективных средах, содержащих культуральный фильтрат патогена.

В качестве объектов исследований использовали зрелые семена гороха сорта Омский неосыпающийся и перспективных гибридных линий селекции НПЦ ЗХ им. А.И. Бараева. При оптимизации условий культивирования *in vitro* определяли влияние экзогенных гормонов, концентрации культурального фильтрата на каллусообразующую способность и массу каллусов.

В результате исследований был выделен штамм гриба *Fusarium oxysporum* FG-4, токсичный культуральный фильтрат которого использован при проведении скрининга *in vitro* устойчивых каллусов гороха. Определены оптимальные концентрации культурального фильтрата в среде для индукции каллусогенеза гороха. Выявлено, что наиболее оптимальной концентрацией для каллусообразования в селективных условиях является содержание 5-10% культурального фильтрата, при этом частота каллусообразования составляет 40-65%, что позволяет в дальнейшем получить морфогенные структуры и индуцировать органогенез.

Ключевые слова: горох, *Fusarium oxysporum*, культуральный фильтрат, клеточная селекция, каллусная ткань, резистентность.

ВВЕДЕНИЕ

Зерновые бобовые культуры являются, наряду с зерновыми, основой для развития сельскохозяйственного производства в мире, а также основным фактором стабильности сельского хозяйства ввиду их уникальной способности усваивать атмосферный азот в симбиозе с почвенными бактериями. В мире ежегодно бобовыми культурами усваивается от 40 до 60 млн. тонн азота, что позволяет экономить на удобрениях более 10 млрд. долларов [1]. Основными бобовыми культурами являются горох, нут, чечевица, фасоль, соя. Горох, по данным CGIAR (Consultative Group on International Agricultural Research), среди зернобобовых культур занимает одно из лидирующих мест как по занимаемой площади – более 37% от площади возделывания зернобобовых, так и по питательной ценности (<http://singer.cgiar.org>) [2].

Горох является важным источником растительного белка, содержание которого достигает 21-32%, используется как зеленый овощ (в виде целых стручков или незрелых бобов) в странах Азии и в виде сухих семян в Европе, Австралии, Америке [3].

Несмотря на столь важное значение этой культуры, в Казахстане горох не достаточно широко используется. Площадь, занятая под горохом, в 2009 г. составила около 43,5 тыс. га, в 2010 г. – 13,5 тыс. га. Основные площади, занятые под горохом, сосредоточены в Костанайской, Северо-Казахстанской и Восточно-Казахстанской областях. По данным FAO, в 2010 г. сортовые посевы гороха составили менее 0,1 тыс. га, при этом было получено всего 10000,0 тонн семян, что явно не достаточно для самообеспечения качественным семенным материалом. В основном, это вызвано тем, что урожайность гороха в Казахстане

составляет около 11,1 ц/га, что в 4-5 раз ниже среднемирового уровня. Например, в засушливых условиях Канады урожайность составляет около 23,2 ц/га, а в США – 45,5 ц/га [4]. Также следует учесть, что ассортимент сортов, возделываемых в Северном Казахстане, небольшой, состоит всего из 4 сортов зарубежной селекции [5].

Возделывание гороха в регионе связано с высокой поражаемостью гороха грибными болезнями и вредителями на фоне чередующихся засух. Потери урожая гороха от вредителей и болезней могут достигать более 30-50%. Из болезней гороха наиболее опасны корневые гнили, аскохитоз, пероноспороз, серая гниль, мучнистая роса, фузариоз, ржавчина, бактериоз. В условиях Северного Казахстана фузариоз наиболее опасен, поскольку возделывание гороха усугубляется еще и недостатком влаги.

По данным мониторинговых исследований установлено, что около 85% образцов гороха инфицированы грибами рода *Fusarium spp.*, причем в засушливый год количество пораженных фузариозом растений увеличилось до 98,4%, фузариоз был диагностирован даже на листьях. Основные возбудители фузариоза – виды *F. oxysporum* и *F. solani* значительно снижают кормовую ценность зерна гороха вследствие поражения главного стебля, корневой системы, что приводит в дальнейшем к некрозу и увяданию листьев, опадению завязей, в конечном счете снижается азотонакопительная способность растений [6, 7].

В засушливых условиях Казахстана вредоносность фузариоза может достигать 30-50%. Заболевание проявляется в гибели корневой шейки проростков до выхода их на поверхность почвы. Пораженные растения остаются недоразвитыми, низкими и карликовыми. Корневая система чернеет и отмирает, часто поражается основание стебля. В дальнейшем пораженные растения вначале приобретают хлоротичность, отстают в росте, потом желтеют, увядают и засыхают [5]. Поражение фузариозной корневой гнилью происходит в различные фазы вегетации растений гороха, однако, наиболее восприимчивы к воздействию патогена фаза всходов, поскольку поражение главного корня наносит ощутимый вред в последующем. Корневые фузариозные гнили обычно повреждают проростки зернобобовых культур, вызывая выпревание, гниль и гибель корней и нижней части стебля [8, 9].

Для создания болезнестойчивых сортов необходим поиск и привлечение современных достижений науки, ускоряющих и повышающих результативность селекционного процесса. Одним из наиболее динамично развивающихся направлений, ориентированных на создание нового исходного материала для селекции, является использование биотехнологических методов.

В исследованиях Kostukova G.P. et al. были изучены вопросы каллусообразования из незрелых зародышей гороха при культивировании на питательных средах с добавлением культурального фильтрата *Ascohyta pisi Lib* в концентрациях 20-40%. Авторами доказано использование культурального фильтрата возбудителя аскохитоза для получения растений гороха, устойчивых к этому патогену. В результате аналогичных исследований была разработана модель *in vitro* для создания биотического стресса для отбора клеточных линий, обладающих высокой устойчивостью к *Phoma medicaginis var. Pinodella* [10].

В клеточной селекции растений довольно часто используют токсины, продуцируемые фитопатогенными грибами. Например, фитотоксины, продуцируемые грибами рода *Fusarium* (фузариевая кислота, кульмомаразмин, ликомаразмин, мартицин), были использованы в клеточной селекции томатов и картофеля, вызывая симптомы, аналогичные при непосредственном (прямом) контакте с патогеном [11]. На бобовых культурах Huang Y.H., Hartman G.L. (1998) для получения болезнестойчивых форм использовали культуральный фильтрат токсигенного штамма *F. solani f. sp. glycines* [12]. Один из токсинов, продуцируемых грибами рода *Fusarium*, является фузариевая кислота, который проявляет умеренную токсичность в отношении животных, но вызывает симптомы фузариоза на растениях [13]. Фузариевая кислота была использована для создания толерантных к фузариозу растений банана (*Musa acuminata*), гладиолуса (*Gladiolus communis*), томата (*Solanum lycopersicum*) [14, 15]. На горохе (*Pisum sativum L.*) методы клеточной селекции на устойчивость к фузариозу были описаны в работах [14, 16].

Существуют различные схемы селекции *in vitro* высших растений на устойчивость к стрессовым факторам. В основном, используют позитивную (прямую) селекцию (выживает лишь определенный мутантный тип), тотальную селекцию (индивидуальное тестирование всех клеточных клонов), негативную (происходит избирательная гибель делящихся клеток дикого типа и выживание метаболически неактивных клеток) [17].

Прямая селекция используется для выделения мутантов устойчивости к антиметаболитам (антибиотикам, токсинам, гербицидам). При этом концентрация токсических веществ не должна значительно превышать пороговую величину, когда полностью ингибируется рост тканей. Возможен ступенчатый вариант прямой селекции, при котором концентрация токсина в среде увеличивается. Негативная селекция широко применяется для получения условно-летальных мутантов (ауксотрофных, температурочувствительных). Тотальная селекция может быть использована для получения любого типа мутантов.

Большинство токсинов имеют единственную мишень в клетках хозяина, и признак устойчивости находится под простым генетическим контролем. Это подтверждает целесообразность применения схем селекции *in vitro*, используемых при отборе вариантов, устойчивых к другим антиметаболитам, в частности, антибиотикам, применительно и к патотоксинам [14].

В последнее время в исследованиях по изучению ответной реакции растений на разного рода стрессоры исследуются онтогенетические аспекты. В частности, существует предположение, что неспецифическая устойчивость высших растений к абиотическому стрессу значительно выше на ранних этапах онтогенеза [18]. В работе Švábová и Lebeda (2005) исследованы вопросы устойчивости гороха к фузариозу в культуре *in vitro*, при этом изучали как тип селективного агента (токсин/культуральный фильтрат), так и тип экспланта (сочетание различных типов растительной ткани) при использовании различных схем селекции. В результате было установлено, что индуцирование устойчивости к воздействию гриба *F. oxysporum* наиболее часто происходило при скрининге мутантных клонов гороха, которые были получены путем каллусогенеза на селективных средах. При отборе соматоклональных вариантов (когда происходит скрининг устойчивых каллусных культур) большое значение имела устойчивость или восприимчивость исходного материала [19].

Экспланты растений, в процессе изоляции в условия *in vitro*, часто механически травмируются, кроме того, стрессовые агенты (осмотики, соли, патотоксины и пр.) вызывают реакции окислительного стресса, что может привести к возникновению спонтанных мутаций, в частности, к гипер- или гипометилированию, полиплоидии или анеуплоидии, хромосомным абберациям, активации транспозонов [19]. Многие авторы указывают, что индукция каллусогенеза в присутствии селективного агента увеличивает частоту возникновения мутаций. Генетически стабильные мутанты, возникающие именно на этапе дедифференциации клеток, являются ценным источником повышенной генетической изменчивости [20, 21].

Таким образом, вопросы индукции каллусогенеза гороха на селективных средах с культуральным фильтратом и получения устойчивых растений регенерантов гороха являются актуальными. В связи с этим целью настоящей работы являлось выделение типового штамма грибов рода *Fusarium* и оптимизация условий каллусообразования гороха на селективных средах, содержащих культуральный фильтрат патогена.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение фитопатогенных грибов рода *Fusarium*

Выделение из поверхностно стерилизованных растительных тканей проводили с использованием высева на картофельный агар или среду Чапека, с последующим выделением в чистую культуру. Для выделения использовали семена гороха Омский неосыпающийся. Определение родов микромицетов проводилось по наиболее распространенным определителям [22, 23].

Выбор штамма для селекции *in vitro*

Выбор штамма для проведения селекции *in vitro* проводили по результатам оценки фитотоксичных и фитопатогенных свойств изолятов. Патогенные свойства изолятов относительно растений гороха изучали с использованием поверхностно стерилизованных семян гороха в сосудах со стерильной почвой. В опытном варианте на глубину заделки семян вносили инокулюм гриба, который получали из 15-дневной культуры, выращенной на среде из зерна пшеницы. Опытный и контрольный варианты культивировали в течение 7 дней после появления всходов при обычной освещенности, температуре 26°C. Почву равномерно увлажняли равным объемом стерильной воды. Учитывали всхожесть, массу корней проростков гороха, визуально определяли наличие симптомов заболевания. После чего здоровые и инфицированные проростки гороха были помещены на среду Чапека с целью выявления возбудителя заболевания (Попкова К.В., 1979).

Для оценки фитотоксичных свойств грибов стерилизованные семена гороха проращивали в культуральном фильтрате. В контрольном варианте семена проращивали в водопроводной воде и среде Чапека. Проращивание вели в течение 7 дней. При определении токсичности культурального фильтрата определяли всхожесть семян (%), массу ростков и корешков (мг, % по отношению к контролю) [24].

Получение культурального фильтрата гриба *Fusarium oxysporum*

Культуральный фильтрат получали методом суспензионного культивирования на качалке шейкерного типа, культивирование осуществляли в течение 7 суток при температуре 26°C. В качестве субстрата использовали жидкую среду Гамборга В5, используемую при культивировании каллусных тканей гороха. По истечении времени культивирования проводили фильтрование фильтрата через бумажный фильтр, затем через мембранный фильтр. Культуральный фильтрат хранили в холодильнике [3].

Культура гороха *in vitro*

В качестве исходного материала были использованы гибриды гороха посевного (*Pisum sativum* L.), любезно предоставленные отделом селекции зернобобовых культур Научно-производственного центра им. А.И. Бараева. Семена гибридов были использованы для введения в культуру *in vitro*. Семена были поверхностно стерилизованы, протокол стерилизации включал промывку в растворе детергента, обработку 10%-ным раствором гипохлорита натрия с последующей 3-кратной промывкой в стерильной воде, затем помещены на среду ½ состава минеральных солей Мурасиге и Скуга (Murashige, T., Skoog, F., 1962). Семядольные листья и междоузлия 5-7-дневных стерильных проростков были использованы для индукции каллусогенеза. Экспланты разделяли на сегменты размером 0,5-1 см и помещали на поверхность индукционной среды. Для индукции каллусогенеза использовали среду на основе прописей Гамборга В5 (Gamborg et al., 1968), содержащих различные концентрации фитогормонов. Скрининг в культуре *in vitro*

был проведен на аналогичной среде с добавлением культурального фильтрата гриба *F. oxysporum*. Культивирование проводили в климатической камере при температуре культивирования 26-28°C. Длительность культивирования составляла 8-10 недель. Морфогенетический потенциал генотипов оценивали отношением количества морфогенных каллусов к общему числу каллусов (%). После этого сформировавшиеся морфогенные каллусы пассировали на среду для индукции органогенеза. Культивирование проводили в условиях фитотрона при 6 ч. фотопериоде, освещенности 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{сек}$, температуре 22°C и влажности 80% [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для успешного проведения клеточной селекции на устойчивость к фитопатогенным микроорганизмам необходимо иметь в наличии штамм, обладающий патогенностью в сочетании с высокой фитотоксичной активностью, чтобы в условиях отбора *in vitro* на пораженных растениях имелись те же симптомы, что и при непосредственном контакте патогена и растения. Патогенность и токсичность – это наиболее главные критерии для отбора штаммов фитопатогенных грибов и их последующего использования в клеточной селекции.

В чистую культуру из семян было выделено 4 изолята грибов рода *Fusarium*. Идентификационными признаками для выделения в чистую культуру являлись форма колоний, окраска и структура воздушного мицелия, а также наличие макро- и микроконидий, характерных для видов этого рода (рисунок 1).



Рис. 1. Выделение грибов рода *Fusarium* из семян гороха

Выделенные изоляты отличались плотностью и интенсивностью роста мицелия. Так, изоляты FG-4 и FG-5 отличались от других изолятов интенсивным ростом мицелия, при этом у изолята FG-4 колонии были рыхлыми, воздушный мицелий шерстистый, насыщенного сиреневого оттенка, приподнят по краям, обратная сторона – ярко-малинового цвета. В отличие от него изолят FG-5 формировал плотные колонии белого цвета, с обратной стороны имеющие светло-розовый оттенок.

Микроскопический анализ препаратов грибов, выполненный с использованием микроскопа *Micros* (Австрия), выявил наличие макро- и микроконидий, образование конидиеносцев на гифах воздушного мицелия. Микроконидии большей частью одноклеточные, овальной или цилиндрической, макроконидии веретеновидно-серповидной формы, иногда с отчетливой ножкой, обычно с 3 перегородками, у некоторых изолятов с 1-5 перегородками. Макроконидии с 3 перегородками имеют размеры 20-31x4,2-5,0 мк, с 5 перегородками 35-60x3,0-5,0 мк. В мицелии наблюдали обильные хламидоспоры, интеркалярные или терминальные, одиночные или в коротких цепочках. Подобные морфологические признаки имели штаммы FG-4, FG-5.

У штаммов FG-4-1 и FG-4-2, отличающихся более плотными колониями, медленным темпом роста, отмечали наличие конидиеносцев, собранных в фиаллиды. Макроконидии были в основном серповидной формы, более широкую имели в середине, часть конидий имела ножку. Количество перегородок было 3-5, макроконидии имели размер 27-50x4,2-6,0 мк. Микроконидии в массе своей одноклеточные, овальные, или почти цилиндрические, размеры около 8-11x3,2-4,0 мк. Макроконидии в основном обнаруживаются в воздушном мицелии и в коричневатых пионоттах. Хламидоспоры в основном одиночные интеркалярные или терминальные. На основании изучения классификации микромицетов рода *Fusarium*, представленной в используемых определителях, штаммы FG-4 и FG-5 были отнесены к виду *F. oxysporum*, а штаммы FG-4-1 и FG-4-2 были отнесены к виду *F. solani*.

Изучение фитотоксичных и фитопатогенных свойств выявило различия в степени их проявления, в частности, учитывали всхожесть, массу корней проростков гороха, визуально определяли наличие симптомов корневой гнили. На проростках гороха сорта Омский неосыпающийся визуально наблюдали первичные симптомы поражения корневой гнилью - некротизацию, бурые пятна, на листьях – пожелтение, скручивание кончиков, некроз, потерю тургора.

Штаммы FG-4 и FG-5 вызывали изъязвления по всей поверхности колеоптиле, его гниль. У всех проростков гороха на вариантах инфекционного фона с этими штаммами отмечали наиболее сильное поражение корневой системы, в отдельных случаях ее полное недоразвитие.

Оценка фитотоксичных свойств, проведенная методом биопроб, показала, что наибольшее ингибирование развития проростков гороха наблюдали на вариантах с использованием культурального фильтрата штамма FG-4. Культуральный фильтрат штамма FG-4 более, чем на 50% ингибировал рост проростков гороха. По результатам проведенного скрининга штамм FG-4 был выделен для дальнейших исследований и использования в селекции гороха *in vitro*. Патогенность данного штамма составила 58%, токсичность культурального фильтрата 58,47-80%.

Несмотря на то, что горох является одним из старейших объектов генетики, а также довольно давно введен в культуру *in vitro*, общепринятых методик, воспроизводимых в различных условиях, все еще нет. Анализ литературы показывает, что частота индукции каллусогенеза гороха определяется несколькими факторами, в числе которых генотип, тканевая специфичность, минеральная основа среды и ее гормональный статус. В основном для индукции каллусогенеза гороха используется среда Гамборга B5 [49, 50]. Многообразие используемых регуляторов роста, их концентраций делают результаты опубликованных работ порой несопоставимыми, кроме того, отработка параметров культивирования гороха проводится в основном на местных сортах, поэтому определенные элементы технологии не всегда пригодны для исследований с другими генотипами.

В этой связи нами были проведены исследования, направленные на оптимизацию методики индуцирования каллусогенеза, в т.ч. и на селективных средах. В ряде работ показано, что для *Dicotyledones* сочетание ауксинов с цитокининами является наиболее оптимальным для дедифференциации эксплантов. Низкие концентрации этих двух важнейших типов экзогенных фитогормонов не вызывают токсического действия и способствуют инициации каллусообразования. Нами использовалось несколько вариантов среды Гамборга B5, отличающихся соотношением БАП и НУК (таблица 1). Данные фитогормоны являются наиболее активными и экономичными, что связано с их относительно большей стабильностью в клетке, обусловленной меньшим сродством их к ферментам дезактивации гормонов. Состав селективных сред был аналогичным, но с добавлением культурального фильтрата штамма FG-4.

В качестве эксплантов рассматривались сегменты семядольных листьев, стеблей и корней. Независимо от состава среды первичная каллусная ткань возникала на раневых поверхностях эксплантов. Интенсивность роста первичного каллуса во многих случаях была различной. Чаще всего через 7-10 дней после изолирования визуально обнаруживали новообразования. Практически все экспланты обладали способностью к инициации каллусов, однако из верхушек побегов каллусы образовывались чаще, чем из семядолей (рисунок 2).



Рис. 2. Инициация каллусообразования из стеблевых эксплантов гороха сорта Омский неосыпающийся

Критериями отбора среды являлись показатели каллусообразования и массы каллусов (таблица 1).

По результатам исследований установлено, что наиболее высокие показатели каллусообразования получены на вариантах сред, содержащих 0,6 мг/л БАП и 2,0 мг/л НУК, при этом сформировавшиеся первичные каллусные ткани имели наибольшую массу на всех используемых эксплантах.

Таблица 1. Каллусообразующая способность гороха (сорт Омский неосыпающийся) на различных по составу средах

Вариант среды	Соотношение фитогормонов	Тип экспланта	Каллусообразующая способность, %	Масса первичной каллусной ткани, мг
B5-1	0,6 мг/л БАП 1,2 мг/л НУК	Лист	61,5	32,6±1,3
		Стебель	55,6	18,7±4,5
		Корень	25,0	43,2±1,7
		Среднее	47,3	37,7±2,5
B5-2	0,6 мг/л БАП	Лист	63,6	112,3±6,5

	2,0 мг/л НУК	Стебель	50,0	66,2±2,4
		Корень	40,0	87,5±4,9
		Среднее	51,2	88,7±4,6
B5-3	0,6 мг/л БАП 4,0 мг/л НУК	Лист	60,0	32,4±2,4
		Стебель	50,0	15,3±1,1
		Корень	9,1	18,7±1,4
		Среднее	39,7	66,4±1,6

Если оценивать используемые экспланты, то очевидно, что листовые и стеблевые сегменты обладают большим потенциалом в отличие от корневых эксплантов.

Следующая серия экспериментов заключалась в подборе оптимальной концентрации культурального фильтрата гриба *F. oxysporum* для скрининга резистентных каллусов. Важным условием для успешного проведения скрининга *in vitro* является наличие адекватной реакции клеточных культур на действие селективных факторов. Для этого необходимо установить оптимальные концентрации селективного агента в среде культивирования каллусов.

Важно, чтобы при проведении селекции часть каллусов погибала при воздействии селективного агента, и чтобы выжившие каллусы сохраняли свой морфогенетический потенциал. При выборе оптимальной концентрации также оценивали каллусообразующую способность и массу каллусов. Количество культурального фильтрата патогена составляло 5-50% от объема среды. В качестве эксплантов использовали сегменты семядольных листьев гороха сорта Омский неосыпающийся и гибрида 831/1.

По результатам данного эксперимента было выявлено, что реакция на воздействие токсичных метаболитов патогена была одинаковой для обоих генотипов, так, каллусообразующая способность наиболее высокая была на средах, содержащих 5-10% культурального фильтрата гриба *F. oxysporum*. Повышение концентрации культурального фильтрата до 50% способствовало снижению интенсивности каллусообразования и формированию каллусов с меньшей массой. Наблюдения за ростом каллусов показали, что рост биомассы наблюдается только на среде, содержащей 5% культурального фильтрата патогена. На вариантах сред, содержащих 30% фильтрата и выше, в процессе культивирования наблюдали остановку роста каллусов и изменение их цвета, впоследствии происходило усыхание и гибель каллусов. Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что наиболее оптимальной концентрацией для индукции каллусогенеза гороха в селективных условиях является содержание 5% культурального фильтрата в среде, при этом частота каллусообразования составляет 40-55%, что позволяет в дальнейшем получить морфогенные структуры и индуцировать органогенез (таблица 2).

Таблица 2. Определение оптимальных концентраций культурального фильтрата *F.oxysporum* в среде для индукции каллусогенеза гороха

Генотип	Среда культивирования	Каллусообразование, %	Средняя масса каллуса, мг
Омский неосыпающийся	Гамборга B5 (контроль)	61,5	112,3±6,5
	Гамборга B5+5% КФ	40,3	67,8±2,3
	Гамборга B5+10% КФ	38,5	48,7±2,2
	Гамборга B5+30% КФ	16,7	40,0±3,4
	Гамборга B5+50% КФ	6,7	12,2±2,9
Гибрид 831/1	Гамборга B5 (контроль)	58,5	157,9±6,0
	Гамборга B5+5% КФ	53,7	79,3±3,6
	Гамборга B5+10% КФ	50,0	48,7±2,7
	Гамборга B5+30% КФ	25,0	40,0±2,8
	Гамборга B5+50% КФ	5,0	22,3±2,1

Определенные нами оптимальные концентрации культурального фильтрата *F. oxysporum* в среде для индукции каллусогенеза позволили провести скрининг устойчивых каллусов у нескольких перспективных гибридов гороха селекции НИЦ ЗХ им. А.И. Бараева. Результаты исследований показали различную реакцию генотипов гороха на воздействие токсичных метаболитов культурального фильтрата гриба (таблица 3).

Так, очевидно, что в присутствии токсичных метаболитов гриба *F. oxysporum* происходит снижение интенсивности каллусообразования на 10,3-71,5%, а также уменьшение каллусной массы на 23,6-66,7 мг в

зависимости от генотипа. На отдельных эксплантах формируются каллусные ткани значительно меньших размеров, часто каллусы вообще не образуются.

Также наблюдали формирование проростков из адвентивных почек, без образования каллусной ткани, такие экспланты мы перенесли на среду для морфогенеза с добавлением культурального фильтрата патогена (10% к объему).

Таблица 3. Оценка каллусообразующей способности гороха на селективной среде с культуральным фильтратом *F.oxysporum*

Генотип	Каллусо-образование, %	Каллусо-образование в сравнении с контролем, %	Масса каллусов, мг	Масса каллусов в сравнении с контролем, мг	Способность к морфогенезу, %
Линия 771-1	54,5	-37,5	86,2	-34,6	21,3
Линия 822-1	58,4	-21,5	90,4	-24,3	22,1
Линия 834-1	33,5	-10,3	76,6	-23,6	66,7
Линия 836-3	51,3	-64,7	89,5	-42,5	23,6
Линия 837-1	32,2	-18,7	106,0	-25,0	23,7
Линия 837-3	45,7	-33,5	92,3	-23,7	14,3
Линия 838-3	12,5	-71,5	97,4	-66,7	24,5
Линия 838-4	34,5	-33,3	71,7	-64,7	17,6
<i>Среднее</i>	40,3	-36,4	88,7	-38,1	26,7

В процессе исследований выяснилось, что наиболее проблематичным этапом в разработке биотехнологии гороха является получение морфогенных каллусов и индукция органогенеза, а также использование методов клеточной селекции для получения растений регенерантов, устойчивых к стрессовым факторам среды.

Индукция морфогенеза у отобранных на селективном фоне линий является одной из основных проблем при разработке методов клеточной селекции, так как имеются данные о том, что у резистентных линий может снижаться регенерационная способность, а также жизнеспособность полученных растений [19, 26].

В наших экспериментах морфогенетический потенциал каллусных тканей, культивируемых в селективных условиях, был незначительным практически у всех генотипов, за исключением линии 834-1, у которой этот показатель составил 66,7%. Возможно, это связано с некоторой устойчивостью данного генотипа к токсичным метаболитам патогена. Тем не менее, из морфогенных каллусов гороха было выделено несколько устойчивых линий, которые после стресса хорошо росли на среде для органогенеза в присутствии культурального фильтрата, и в дальнейшем в каллусах происходило развитие адвентивных почек. Следует отметить, что на данном этапе регенерация полноценных растений была возможна только из морфогенных линий, отобранных на среде для органогенеза, содержащей культуральный фильтрат гриба *F. oxysporum* в концентрации не выше 10%. Поэтому, несмотря на возможность получения устойчивых линий гороха на фоне 5-10%-ного культурального фильтрата, для дальнейшей клеточной селекции целесообразно использовать для отбора *in vitro* 5%-ную концентрацию селективного фактора, поскольку это максимальная доза, при которой можно успешно проводить регенерацию растений.

В результате отбора *in vitro* на дальнейший этап – среду для индукции морфогенеза было пассировано около 200 каллусов, из которых индуцировано 123 регенерантных побега. Ризогенез был индуцирован только у 28 побегов, в почву высажено 16 растений регенерантов.

Работа выполнена в рамках проекта «Создание нового исходного материала гороха (*Pisum sativum* L.), устойчивого к абиотическим и биотическим стрессам, методами биотехнологии и молекулярной биологии» в рамках программы Грантового финансирования МОН РК на 2012-2014 гг.

ЛИТЕРАТУРА

1. Konovalov F., Toshchakova E. and Gostimsky S. A CAPS marker set for mapping in linkage group III of pea (*Pisum sativum* L.) // *Cell. Mol. Biol. Lett.* – 2005. - Vol. 10 (1). – P. 163-171.
2. CGIAR (2009) *An integrated approach to genetic resources in support of the CGIAR0s mission. A position paper developed by the Inter-Centre Working Group on Genetic Resources.* assessed on 27 Jan, 2011.
3. Sharma A., Rathour R., Plaha P., Katoch V., Khalsa G. S., Patial V., Singh Yud., Pathania N.K. Induction of Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. pisi) resistance in garden pea using induced mutagenesis and *in vitro* selection techniques // *Euphytica.* - 2010. - Vol. 173. – P. 345–356.
4. data accessed on Feb 4, 2011; <http://www.faostat.fao.org>.

5. Каскарбаев Ж.А., Чуркина Г.Н., Похоруков Ю.А., Ибраева А.Т., Заболотских В.В., Девяткина Г.В. Минимальная и нулевая технология возделывания гороха в Акмолинской области: методические рекомендации по возделыванию. - Астана, 2010. - 45 с.
6. Pflüghöft O., Merker C., Tiedemann A., Schäfer B.C. Zur Verbreitung und Bedeutung von Pilzkrankheiten in Körnerfüttererböen (*Pisum sativum* L.) in Deutschland // *Gesunde Pflanzen*. – 2012. – Vol. 64. – P. 39–48.
7. Брежнева В.И. Горох – необходимая культура в севообороте // *Защита растений в Краснодарском крае. Региональное приложение*. – 2007. - №11. – С. 1-3.
8. Muehlbauer F.J., Cho S., Sarker A., McPhee K.E., Coyne C.J., Rajesh P.N., Ford R. Application of biotechnology in breeding lentil for resistance to biotic and abiotic stress // *Euphytica*. – 2006. – Vol. 147. – P.149–165.
9. Kraft J.M., Boge W. Root characteristics in pea in relation to compaction and *Fusarium* root rot // *Plant disease*. – 2001. - №9. - Vol. 85. – P. 936-940.
10. 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 Vth International Symposium "Bioprocess Systems 2003 – BioPS'03"*. - Sofia, 2003. – P. 186-189.
11. Naef-Roth S. Production and bioassay of phytotoxins. In «*Phytotoxins in plant diseases*». Eds Wood RKS, Ballio A, Graniti A). - Academic Press: New York. - 1972. – P. 49–69.
12. Huang Y.H., Hartman G.L. Reaction of selected soybean genotypes to isolates of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* and their culture filtrates // *Plant Disease*. – 1998. - Vol. 82. - P. 999–1002.
13. Bacon C.W., Porter J.K., Norred W.P., Leslie F.J. Production of fusaric acid by *Fusarium* species // *Appl. environ. Microbiol.* – 1996. – Vol. 62. – P. 4039-4043.
14. Švábová L., Lebeda, A. In vitro selection for improved resistance to toxin-producing pathogens. // *Journal Phytopathology*. – 2005. - Vol. 153. – P. 52-64.
15. Kuzniak E. Effect of fusaric acid on reactive oxygen species and antioxidants in tomato cell cultures // *Journal Phytopathology*. – 2001. – Vol. 149. – P. 575-582.
16. Smykal P., Valledor L., Rodríguez R., Griga M. Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term in vitro shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.) // *Plant Cell*. - 2007. - Rep. 26. – P. 1985-1998.
17. Лутова Л.А. Биотехнология высших растений: Учебник. – СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2003. – 228 с.
18. Jiang S., Ma Z., Ramachandran S. Evolutionary History and Stress Regulation of the Lectin Superfamily in Higher Plants // *BMC. Evol. Biol.* - 2010. - Vol. 10. - P. 79-103.
19. Lebeda A., Švábová L. In vitro screening methods for assessing plant disease resistance // *Mass Screening Techniques For Selection Crops Resistant to diseases. Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture*. – Vienna. – 2010. – P. 12-47.
20. Kharabian A., Darabi A. Characterization of some chromosomal aberrations in regenerated rice plants (*Oryza sativa*) // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 2005. – Vol. 83. – P. 161-168.
21. Jain S.M. Major mutation-assisted plant breeding programs supported by FAO/IAEA // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 2005. - Vol. 82. – P. 113-123.
22. Блаш В.И., Курбацкая З.А. *Определитель токсинообразующих микромицетов*. - Киев: Наукова думка, 1990. - 234 с.
23. Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. *Определитель патогенных и условно-патогенных грибов*. – М.: Мир, 2001. – 486 с.
24. Попкова К.В. *Учение об иммунитете растений*. – М., 1979. – 272 с.
25. Мазур А.Л., Игнатова С.А. *Определение сублетальных концентраций филтратов Fusarium graminearum Schwabe для получения устойчивых форм мягкой пшеницы в культуре in vitro // Факториал експериментальної еволюції організмів / под. ред М.В. Роїка*. – Киев: Логос, 2006. – Т. 3. – С. 484-489.
26. Hossain Z., Kalam A., Mandal A., Subodh K.D., Biswas A.K. Development of NaCl-tolerant line in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. through shoot organogenesis of selected callus line // *Journal of Biotechnology*. – 2007. – Vol. 129, №4. – P. 658-667.

FUSARIUM OXYSPORUM L. КУЛЬТУРАЛЬДЫҚ СУЗІНДІСІМЕН СЕЛЕКТИВТІ ОРТАЛАРДА АСБҰРШАҚТЫҢ РЕЗИСТЕНТТІК ШОРЛАНУЛАРЫНЫҢ (*PISUM SATIVUM L.*) СКРИНИНГІ

Д.С. Тагиманова, Ж.А. Рашиденова, О.Н. Хапилина

Ұлттық биотехнология орталығы, Астана, Қазақстан

ТҮЙІН

Асбұршақ Қазақстан Республикасында мол егілетін дақылдардың бірі болып табылады. Ауруға төзімді, жоғары өнім бере алатын жаңа сорттарды жасау үшін биотехнология, оның ішінде, жасушалық селекция

әдістерін пайдалану керек. Жасушалық селекция әдістері кезінде *in vitro* жағдайында селективті факторға төзімді жасушалар популяциялар сұрыпталады да одан тұтас өсімдіктер регенерацияланады.

Аймақта егілетін асбұршақ саңырауқұлақтар мен зиянкестер тудыратын аурулармен жиі зақымдалады. Аурулар мен зиянкестер әсерінен асбұршақ өнімділігінің шығыны 30-50% дейін жетуі мүмкін. Асбұршақ ауруларының ішінде ең қауіптілері тамыр шірігі, аскохитоз, пероноспороз, ақ ұнтақ, фузариоз, бактериоз болып табылады. Солтүстік Қазақстан жағдайында фузариоз ең қауіпті ауру болып табылады, өйткені асбұршақты егу ылғалдың жеткіліксіздігімен де күшейтіледі.

Жүргізілген зерттеу мақсаты *Fusarium* туысына жататын саңырауқұлақтың типтік штамын бөліп алу мен селективті ортада асбұршақтың каллус түзу қабілеті шарттарын оңтайландыру болып табылады.

Зерттеу объектілері ретінде Омский неосыпающийся мен А.И. Бараев атындағы ГЗО селекциясының гибриді линиялары пайдаланылды. *In vitro* жағдайында өсіру жағдайларын оңтайландыру кезінде экзогенді гормондардың, культуралды филтраттың концентрациясының асбұршақтың каллус түзу қабілеті мен каллустар массасына әсерін анықтадық.

Жүргізілген зерттеу нәтижесінде *Fusarium oxysporum* FG-4 саңырауқұлағының штамы бөлініп алынды, токсинді культуралды филтрат *in vitro* жағдайында төзімді асбұршақ каллустарына скрининг жүргізу кезінде пайдаланылды. Асбұршақтың каллус индукциясы үшін қоректік ортадағы культуралды филтраттың оңтайлы концентрациялары анықталды. Нәтижесінде селективті ортада каллус түзу үшін оңтайлы концентрация 5-10% болатыны анықталды, ол кезде каллус түзу жиілігі 40-65% құрады, мұндай жағдайда морфогенді құрылымдар алу мен органогенезді индукциялауға болады.

Негізгі сөздер: асбұршақ, *Fusarium oxysporum*, культуралды филтрат, жасушалық селекция, каллус ұлпасы, резистенттілік.

SCREENING OF THE RESISTANT PEA CALLUS (*PISUM SATIVUM L.*) SELECTIVE MEDIA, CONTAINING *FUSARIUM OXYSPORUM L.* CULTURE FILTRATE

D.S. Tagimanova, Zh.A. Rashidenova, O.N. Khapilina

National Center for Biotechnology, the Science Committee, Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, Astana, Kazakhstan
oksfur@mail.ru

ABSTRACT

Pea is the main legumes, which is widely cultivated in the Republic of Kazakhstan. To create new diseases-resistant and productive varieties, there should be applied methods of biotechnology, including the cell selection. In the selection process, which is carried out *in vitro*, there is conducted selection of cell populations that are resistant to the selective factor and then the whole plants are regenerated.

The cultivation of peas in the region is associated with high affection by fungi and pests on the background of alternating droughts. Pea crop losses from pests and diseases can reach more than 30-50%. Root rot, ascochyta-leaf spot, false mildew, gray mold, powdery mildew, *Fusarium* blight, rust and bacterial blight are the most dangerous diseases for peas in Kazakhstan. *Fusarium* is dangerous in particular, because its injury is reinforced by the drought.

The aim of the research is isolation of a typical strain of fungi of the *Fusarium* genus and optimization of pea callus on selective media containing culture filtrate of the pathogen. As the objects of the study the mature seeds of Омский Неосыпающийся pea varieties and promising hybrid breeding lines AI Бараев SPC of GF are used.

The impact of exogenous hormones and concentration of the culture filtrate on callus- formed ability and a weight of calluses was determined by optimization of culture conditions *in vitro*. As a result, the strain of the fungus *Fusarium oxysporum* FG-4 was isolated. Culture filtrate of this strain was added to the medium to induce callus formation and used for carrying out screening *in vitro* resistant callus peas. The optimal concentration of the filtrate in selective medium for formation of the calli of pea was determined.

It was revealed that the optimal concentration for callus formation in selective conditions is the content of 5-10% of the culture filtrate, and the frequency of callus formation is 40-65%, which in the future to get morphogenic structures and induce organogenesis.

Keywords: peas, *Fusarium oxysporum*, culture filtrate, cell selection, callus tissue resistance.