

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ПОЛІСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Агрономічний факультет  
Кафедра здоров'я фітоценозів і трофології

Кваліфікаційна робота  
на правах рукопису

**БІЛЯВСЬКИЙ ІВАН ВАЛЕНТИНОВИЧ**

УДК 633.4:633.854.78:632.952

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

**ВИДІЛЕННЯ СТІЙКИХ ФОРМ КАРТОПЛІ ДО ФУЗАРІОЗНОЇ ГНИЛІ  
В УМОВАХ IN VITRO**

Спеціальність 202 «Захист і карантин рослин»

Подається на здобуття освітнього ступеня **бакалавр**

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень.  
Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на  
відповідне джерело

І. В. Білявський

Керівник роботи  
Іващенко Ірина Вікторівна  
к. б. н., доцент кафедри  
здоров'я фітоценозів і трофології

## АНОТАЦІЯ

Білявський І. В. Виділення стійких форм картоплі до фузаріозної гнилі в умовах *in vitro*. – Кваліфікаційна робота на правах рукопису.

Кваліфікаційна робота на здобуття освітнього ступеня бакалавра за спеціальністю 202 – захист і карантин рослин. – Поліський національний університет, Житомир, 2024.

Згідно проведеної фітопатологічної експертизи бульб під час зберігання, встановлено, що суха фузаріозна гниль картоплі поширена в усіх обстежених господарствах приватного сектору Житомирської області. Показники поширення хвороби варіювали від 2 до 5%. В результаті вивчення патогенних, культуральних, морфологічних властивостей грибів, виділених із уражених сухою гниллю зразків картоплі, відібраних в зоні Полісся України, ідентифіковано збудники захворювання: *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*. Виділені патогенні штами: *Fusarium oxysporum* – 26н, 5в, 13а та *Fusarium solani* – 47д, 19о, 17ф, які можуть бути використані для цілеспрямованої селекції картоплі на стійкість до сухої фузаріозної гнилі. В роботі представлено результати досліджень щодо використання біотехнологічних методів в селекції картоплі на стійкість до сухої фузаріозної гнилі. На основі методу культури тканин розроблена селективна система для отримання відносно стійких генотипів картоплі до збудника *Fusarium oxysporum*, яка включає поетапну селекцію калусної культури в умовах *in vitro* на поживному середовищі з фактором стресу – культуральним фільтратом 10–14 даної культури гриба *Fusarium oxysporum*, вирощеного на рідкому середовищі Чапека при оптимальних умовах, в сублетальній концентрації 35 мг/л і вище, яка встановлюється індивідуально для кожного генотипа.

**Ключові слова:** суха фузаріозна гниль, картопля, *Fusarium oxysporum*, збудник, метод культури тканин, *in vitro*.

## ABSTRACT

Bilyavskiy I.V. Isolation of resistant forms of potato to fusarium head rot in vitro.  
– Qualification work on manuscript rights.

Qualification work for obtaining a bachelor's degree in specialty 202 – protection and quarantine of plants. – Polissia National University, Zhytomyr, 2024.

According to the carried out phytopathological examination of tubers during storage, it was established that fusarium dry rot of potatoes is common in all examined farms of the private sector of the Zhytomyr region. Disease prevalence rates ranged from 2 to 5%. As a result of the study of pathogenic, cultural, morphological properties of fungi isolated from potato samples affected by dry rot, selected in the Polissia zone of Ukraine, the causative agents of the disease were identified: *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*. Isolated pathogenic strains: *Fusarium oxysporum* – 26n, 5b, 13a and *Fusarium solani* – 47d, 19o, 17f, which can be used for purposeful selection of potatoes for resistance to *Fusarium* dry rot.

The paper presents the results of research on the use of biotechnological methods in the selection of potatoes for resistance to fusarium dry rot. Based on the tissue culture method, a selective system for obtaining relatively resistant genotypes of potatoes to *Fusarium oxysporum* was developed, which includes stepwise selection of callus culture in vitro on a nutrient medium with a stress factor - culture filtrate 10–14 of this culture of the fungus *Fusarium oxysporum*, grown on liquid in Chapek's medium under optimal conditions, at a sublethal concentration of 35 mg/l and above, which is set individually for each genotype.

**Key words:** *Fusarium* dry rot, potato, *Fusarium oxysporum*, pathogen, tissue culture method, in vitro.

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. СУХА ФУЗАРІОЗНА ГНИЛЬ КАРТОПЛІ.....	7
1.1. Біологічні особливості збудників сухої фузаріозної гнилі картоплі.....	7
1.2. Селекція рослин на стійкість до збудників хвороб методом культури тканин в умовах in vitro.....	10
РОЗДІЛ 2. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	12
РОЗДІЛ 3. ВИДІЛЕННЯ СТІЙКИХ ГЕНОТИПІВ КАРТОПЛІ ДО ТОКСИНІВ ГРИБА <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> .....	19
3.1. Поширення сухої фузаріозної гнилі в господарствах Житомирської області.....	19
3. 2. Ідентифікація збудників сухої фузаріозної гнилі. ....	21
3. 3. Виділення стійких генотипів картоплі до токсинів гриба <i>Fusarium oxysporum</i> .....	22
ВИСНОВКИ.....	28
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	29

## ВСТУП

Картопля відноситься до основних продовольчих культур в Україні [13, 17, 19]. Переміщення площ картоплі за останні роки в дрібні приватні господарства спричинило ряд негативних наслідків, зокрема погіршення фітосанітарного стану умов вирощування. Втрати від шкідників і хвороб різної етіології можуть сягати майже третини урожаю картоплі. Значної шкоди картоплярству завдають гриби роду *Fusarium spp.*: *F. sambucinum* Fuck., *F. solani* (Mart.) Sacc., *F. oxysporum* (Schl.) Snyd. et Hans., *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., які спричиняють суху фузаріозну гниль [4, 5, 14]. Втрати бульб від фузаріозу становлять 7–11%, іноді сягають 30–50%.

Найбільш раціональний екологічно безпечний спосіб зниження втрат урожаю картоплі від фузаріозу – селекція по створенню нових сортів. Пошук нових джерел стійкості, оснований на використанні біотехнології, сприятиме успіху селекції при виведені стійких сортів картоплі. Ця проблематика цілком підтверджує актуальність роботи.

**Мета досліджень.** Метою досліджень було виділення стійких генотипів картоплі до токсинів збудника сухої фузаріозної гнилі біотехнологічними методами в умовах *in vitro*.

Завдання:

1. вивчення поширення сухої фузаріозної гнилизни в господарствах приватного сектору Житомирської області;
2. виділення збудників сухої фузаріозної гнилі картоплі, їх ідентифікація;
3. отримання калусної культури картоплі в умовах *in vitro*;
4. отримання культурального фільтрату гриба *Fusarium oxysporum*;
5. біотехнологічними методами, на основі селекції калусної культури в умовах *in vitro*, отримати відносно стійкі лінії картоплі до культурального фільтрату збудника *Fusarium oxysporum*.

**Об`єкт досліджень** – уражені хворобами бульби картоплі, збудники сухої фузаріозної гнилизни картоплі, рослини картоплі в умовах *in vitro*,

калусна культура картоплі, культуральний фільтрат гриба *Fusarium oxysporum*.

**Предмет досліджень** – поширення сухої фузаріозної гнилизни в господарствах Житомирської області, визначення збудників сухої фузаріозної гнилизни, селекція калусної культури картоплі в умовах *in vitro* до збудника фузаріозної гнилі картоплі.

**Методи дослідження.** При виконанні кваліфікаційної роботи використовували загальнонаукові та спеціальні методи досліджень: польовий (визначення поширення сухої фузаріозної гнилі), мікробіологічні (методи виділення в чисту культуру та ідентифікація збудників), біотехнологічні (методи культури тканин).

Перелік публікацій автора за темою дослідження:

1. Білявський І. В. Суха фузаріозна гниль картоплі в умовах Полісся України. Інтенсифікація еколого-біологічного рослинництва: збірник тез доповідей науково-практичної конференції студентів агрономічного факультету (м. Житомир, 15 листопада 2023р.), Житомир: Поліський національний університ. С. 100–101.
2. Іващенко І., Білявський І., Оханська А. Хвороби серпю увінчаного в умовах Полісся України. Матеріали Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Тенденції та перспективи розвитку науки і освіти в умовах глобалізації»: Зб. наук.праць. Переяслав, 2023. Вип. 98. С. 6-8.ст. 2023. 102–103с.

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблена на основі біотехнологічних методів селективна система для отримання відносно стійких генотипів картоплі проти збудника *Fusarium oxysporum* може бути використана в селекційних центрах по картоплі.

**Структура та обсяг роботи.** Кваліфікаційна робота викладена на 32 сторінках, містить шість таблиць та десять рисунків. Структура роботи: вступ, три розділи, висновки, список використаних джерел.

## РОЗДІЛ 1. СУХА ФУЗАРІОЗНА ГНИЛЬ КАРТОПЛІ

### 1.1. Біологічні особливості збудників сухої фузаріозної гнилі картоплі

Збудники захворювання – гриби роду *Fusarium*. Фузаріози вивчалися багатьма дослідниками різних країн світу [14, 15]. Особливо захворювання небезпечне при зберіганні картоплі. В залежності від пошкоджень, ураження сухою гниллю може скласти 4–60% [5]. По шкідливості вона займає друге місце після фітофтори. Посадка бульб, уражених гниллю, призводить до значного зниження схожості, погіршення росту і розвитку рослин, зменшення крохмалу [33, 34].

Проявляється хвороба в основному в період зберігання бульб. На поверхні бульб виникають сірувато – білі вдавнені плями, під яким тканина буріє, зморщується. Утворюються порожнини із міцелієм гриба. На ураженій поверхні з'являються невеликі сірувато–білі, рідше жовтуваті або рожеві, подушечки. В сухому сховищі бульби можуть повністю муміфікуватись.

Гриби поширюються конідіями і грибницею. На бульби попадають з ґрунтом в перенхіму через механічні пошкодження шкірки. В період зберігання хвороба практично не розповсюджується при зіткненні здорових та хворих бульб. Первинне зараження проходить в полі, під час збирання урожаю. В уражених бульбах утворюються подушечки з конідіальним спороношенням у вигляді коротких конідієносців з серповидними конідіями. В залежності від виду збудника конідії можуть мати різноманітну зігнутість, колір і кількість перетинок.

*F. solani* і *F. sulphureum* поширюються в рослині міжклітинно, потрапляючи через продихи, вічки і пересуваючись головним чином в перенхімній тканині. При цьому вони руйнують оболонку клітини та цитоплазму, незруйнованими лишаються крохмальні зерна. Після відмирання тканини гриб проникає і розростається в середині клітин, а живлення відбувається за рахунок відмерлих клітин, що характерно для сапрофітів. Для

такого типу живлення обов'язковою умовою є здатність мікроорганізмів синтезувати високотоксичні речовини і екстрацелюлярні ферменти для деструкції клітинних структур господаря [38]. Найбільш важливими ферментами є пектинтреселіміназа і амілаза, утворення яких встановлено для багатьох видів роду *Fusarium*.

Оптимальні умови для розвитку збудників сухої гнилі: температура повітря 17–25° С, відносна вологість 70%, вільний доступ кисню до місця ураження [17, 29]. Вапнування ґрунту, внесення сульфату цинку, калійних добрив знижує чутливість бульб до зараження [9]. Перед закладанням на зберігання бульби необхідно добре просушувати, прогрівати. Велике значення має обеззараження картоплесховищ, з оптимальною температурою 1–3° С і вентиляванням, вологістю 85 – 90 % [35].

Сушу фузаріозну гниль викликають види грибів *Fusarium*: *F. sulphureum*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. avenaceum* [5, 23, 31]. Видовий склад фузаріїв – збудників гнилі досить різномірний і не стабільний за роками, географічними зонами. В Україні головними збудниками фузаріозу є: *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. sambveinum*, *F. avenaceum* [ 23 ].

Заразний початок збудника *F. solani* [5] – макроконідії веретеноподібно-серпоподібною форми, еліптично зігнуті, іноді прямі, з короткою звуженою і тупою верхівкою. Клітини мають 3–5 перетинок. Конідії з трьома перетинками розміром 30–45x4,5–5,5 мкм. На хворих бульбах повітряний міцелій кремовато – жовтого, синьо – зеленого, або коричнево-білого забарвлення.

У *F. sambucinum* Fekl. макроконідії утворюються в повітряному міцелії спородохіях. Конідії веретеноподібно-серпоподібною форми, еліптично – зігнуті, розміром 25 – 60 x 3,5 – 6 мкм, мають 5, а іноді 3 перетинки. В основі конідій чітко виражена ніжка. На ураженій тканині повітряний міцелій білий, рожевий, сильно пухнастий.

Макроконідії *F. avenaceum* Sacc. також в спородохіях, піонотах чи в повітряному міцелії, ниткоподібні, прямі, до основи і верхівки звужені, в основному з 5–7 перетинками. Конідії з 5 перетинками розміром 32–90x3–4,5 мкм, верхня клітина ниткоподібно-видовжена, з добре вираженою ніжкою біля основи, в масі оранжеві, цегляно-червоні. Строма жовта, цегляно-червона. Хламідоспори відсутні.

У збудника *F. oxysporum* макроконідії утворюються в повітряному міцелії, рідше в спородохіях чи піонотах, веретеноподібні, еліптично зігнуті або зовсім прямі з рівним діаметром по всій довжині, з тонкою оболонкою, з ясно вираженою ніжкою чи сосочком, 3–5 перетинками. Конідії з 5 перетинками 20–65x3–5 мкм. Мікроконідій багато. Хламідоспори проміжні і верхівкові, утворюються багато. Повітряний міцелій пливчато-павутинний, як і строма, в різні відтінки рожевого кольору, рідше світло-жовтий чи білий.

Гриби роду *Fusarium* можуть використовувати як джерело живлення і енергії різноманітні органічні сполуки – вуглеводи, білки, жири і багато інших органічних сполук. Вони здатні синтезувати різної хімічної природи метаболіти з високою біологічною активністю: фузарієву кислоту, лікомаразмін, нівеїн, явеніцин, гібберелін, фузаріотоксин, спорофузаріогенін, поефузаріогенін, диацетооксиссарпенол, сцирпентриол, утеротоксин та ін. [38].

Фузарієва кислота є природним похідним нікотинової кислоти (SH-бутил піридин-2 карбонова кислота –  $C_{10}H_{13}O_2$ ) [7, 38]. Ця сполука в низьких концентраціях інгібує дихання, ріст, цитохромоксилазу, окислювальне фосфорилування в протопластах. Фузарієва кислота продукується різними видами *Fusarium* [38]. Вперше ізольована із *F. moniliform*, згодом – *F. oxysporum*. Визначення здатності до токсикоутворення у найбільш типових для України грибів роду *Fusarium* (*F. sambucinum*., *F. solani*., *F. culmorum*) показало, що фільтрати всіх досліджуваних культур мають фітотоксичну активність по відношенню до паростків картоплі. Фузарії утворюють значну

кількість ферментів: пектинази, целюлази, ксиланази. Ферментативний апарат у різних видів лабільний і залежить від умов середовища.

## **1.2. Селекція рослин на стійкість до збудників хвороб методом культури тканин в умовах *in vitro***

Для збільшення продуктивності рослин, які використовуються як продукти харчування, економічно важливим являється захист рослин від хвороб і шкідників. Важливість вказаної проблеми, перш за все, обумовлена великими втратами (25%), які несе сільське господарство від фітопатогенів [23, 31].

В наш час розроблені і широко застосовуються на практиці хімічні засоби захисту рослин від хвороб, однак ці методи не завжди дозволяють отримати бажаний результат, а часто приводять до забруднення навколишнього середовища і самої продукції [28]. Найбільш ефективним методом захисту сільськогосподарських рослин від хвороб і шкідників є селекція. В якості селективного агенту зазвичай використовують патотоксини, культуральний фільтрат і безпосередньо сам патоген. В таблиці 1.1 наведені деякі данні по використанню методів клітинної селекції для отримання форм рослин, стійких до біотичних факторів [6, 32, 37]. Одним із актуальних напрямів в селекції сільськогосподарських культур на стійкість до хвороб є використання методу культури тканин [1, 20, 24, 30, 36]. За культивування рослин в умовах *in vitro* може виникати соматоклональна мінливість [16, 18]. Результати генетичних досліджень на пшениці, томатах, рисі показали, що більша частина соматоклональних варіацій обумовлена стабільними генетичними змінам, тобто мутаціями. Аналіз мейозу регенерантів показав такі інтенсивні перебудови хромосом, як транслокації, інверсії, субхроматидні обміни, часткову втрату хромосом. Соматоклональну мінливість досліджують на молекулярному рівні, оцінюючи такі перебудови ядерної ДНК.

Таблиця 1.1. Клітинна селекція на стійкість рослин до культуральних фільтратів патогенів

Патоген	Вид рослини	Отримані результати
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Medicagosativa</i>	стійкі клітинні лінії, регенеранти, потомство
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	стійкі клітинні лінії, регенеранти, потомство
<i>Sclerotinia trifolium</i>	<i>Trtifolium protense</i>	стійкі клітинні лінії, регенеранти, потомство
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Trtifolium protense</i>	клітинні лінії
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	стійкі клітинні лінії, регенеранти, потомство
<i>Alternaria solani</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	стійкі клітинні лінії, регенеранти, потомство
<i>Fusarium</i>	<i>Medicago sativa</i>	стійкі клітинні лінії, регенеранти, потомство
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	стійкі клітинні лінії, регенеранти, потомство
<i>Septoria nodorum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	стійкі регенеранти
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Linum usitassimum</i>	стійкі регенеранти
Кореневі гнилі	<i>Triticum aestivum</i>	стійкі клітинні лінії
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Diantus caryophyllus</i>	стійкі регенеранти

Пошук позитивних відхилень генотипу можна зробити більш ефективним і направленим, якщо рослину культивувати на середовищах з додаванням стресового фактору – патотоксинів збудників хвороб. При цьому більша частина рослин гине, а виживають лише стійкі до стресу. Такі рослини дають початок лініям, які після перевірки на генетичну стабільність можуть бути використані для отримання рослин – регенерантів.

В літературних джерелах є повідомлення про селекцію рослин з використанням патотоксинів і культуральних фільтратів грибів, як селективних факторів: тютюну до *Pseudomonas siringae*, *Alternaria alternata*; вівса до патотоксину *victorin*, кукурудзи до *Helminthosporium maus*; рису до *Helminthosporium oryzae*. Опубліковані результати досліджень по селекції томату, ячменю, люцерни [1, 24] до культурального фільтрату гриба *Fusarium oxysporum*, або очищеного патотоксину – фузарієвої кислоти.

## РОЗДІЛ 2. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводили впродовж 2022–2023 років в лабораторії кафедри здоров'я фітоценозів і трофології агрономічного факультету Поліського національного університету.

Матеріалом для виділення збудників сухої фузаріозної гнилі картоплі слугували зразки бульб, уражені змішаними гнилями. В результаті осіннього обстеження бульб картоплі при зберіганні в картоплесховищах відібрано 30 зразків з ознаками сухої фузаріозної гнилі. При цьому виділено 40 ізолятів грибів і перевірено патогенні властивості в лабораторних умовах. Для отримання культурального фільтрата використовували виділений нами вірулентний штам *Fusarium oxysporum*.

Відбір зразків та їх фітопатологічну експертизу проводили за методиками Інституту картоплярства УААН та згідно з міждержавним стандартом ГОСТ 11856-66: «Картопля насінна. Відбір зразків і методи визначення посівних якостей» та ГОСТ 7001-66 «Картопля насінна» [16].

Поширення сухої фузаріозної гнилі в зоні Полісся України визначали шляхом маршрутних обстежень картоплі в період зберігання у господарствах таких населених пунктів: село Паволоч Житомирського району; село Несолонь Звягельського району; село Зарічани Житомирського району; село Єрчики Житомирського району; село Стовпів Житомирського району, село Квітневе Житомирського району. Фітопатологічну експертизу бульб здійснювали через місяць після збирання врожаю.

Поширення фузаріозу на картоплі визначали за формулою:

$$P = \frac{n \times 100}{N}$$

де, P – поширеність хвороби, %;

N – загальна кількість облікових бульб;

$n$  – кількість уражених бульб, шт.

Визначення збудників сухої фузаріозної гнилі проводили за методикою В. І. Білай (1977) [3, 8, 26]. Культуральні та морфологічні ознаки фузаріїв вивчали за культивування на картопляному агарі, кислому та звичайному суловому агарі, рідкому середовищі Чапека. В роботі використані методи світлової мікроскопії.

Ідентифікація збудника хвороби включала три етапи:

- 1) виявлення і визначення збудника безпосередньо на хворій рослині;
- 2) виділення збудника в чисту культуру та ідентифікація за морфологічними ознаками (морфологія спор, спорноносців);
- 3) перевірка патогенності ізолюваного гриба по його здатності викликати хворобу у рослин.

Визначення фітопатогенних грибів базується на їх морфологічних ознаках. Особливе значення мають спори і видозміни міцелію. За наявності міцелію встановлюється тільки грибна природа хвороби. В подальшому при виявленні на рослині спорношення проводиться мікроскопіювання об'єкта. В тих випадках коли спорношення не знайдено, структури гриба можна виявити в тканинах рослини. Для цього з них готують зрізи уражених тканин і вивчають під мікроскопом [21].

В окремих випадках для стимулювання спороутворення у збудників грибних захворювань використовують «вологі камери». Камерою може слугувати будь-який закритий посуд, в якому можна створити відносну вологість повітря 100%. Для цього придатні чашки Коха і чашки Петрі. Дно і кришку чашки вистилають вологим фільтрувальним папером. При цьому не можна допускати накопичення води на дні чашки, щоб не викликати загнивання матеріалу. Перед поміщенням у вологу камеру досліджуваний матеріал ретельно миють проточною водою. Бульби поверхнево дезінфікують спиртом або перманганатом калію. Далі матеріал розміщують на чашки для більш швидкого проростання міцелію на поверхні, при цьому ніж або скальпель періодично прожарюють. Вологі камери витримують при

температурі 15–20° С. Якщо досліджуваний збудник добре росте і при більш низьких температурах, то встановлюють температуру 8–10° С, яка затримує розвиток сапрофітних грибів, що заважають виявленню збудника. Тривалість інкубації у вологій камері залежить від часу, необхідного для утворення спор. Зазвичай цей період обмежений 1- 3 доби, іноді триває до трьох тижнів. В цей час періодично контролюють вологість і при необхідності фільтрувальний папір в чашках зволожують.

Для виділення патогену в чисту культуру використовують бульби з ознаками ураження сухою гниллю. Частини бульб поверхнево дезинфікують, промивають стерильною водою і розрізають на шматочки довжиною 1- 2 см. Матеріал розміщують в чашках Петрі з агар – агаром і ставлять в термостат при 20°С. Щоденно чашки проглядають. Як тільки міцелій починає проростати із зрізів і переходить на поживне середовище, його переносять на чисте поживне середовище в іншу чашку. Потім грибок визначають за типом спороношення. Визначення фітопатогенних грибів, проводять переважно за морфологічними ознаками спор. Спори діагностують за забарвленням, формою, розміром, наявністю перегородок і типом проростання. Якщо грибок ізольований із уражених частин рослини, не утворює спороношення, застосовують методи стимуляції спороутворення. Наприклад спеціальні поживні субстрати, певний режим освітлення і температури, високу вологість повітря.

Калусну культуру картоплі отримували із пробіркових рослин, культивованих в умовах *in vitro* (рис. 2.1; 2.2; 2.3).

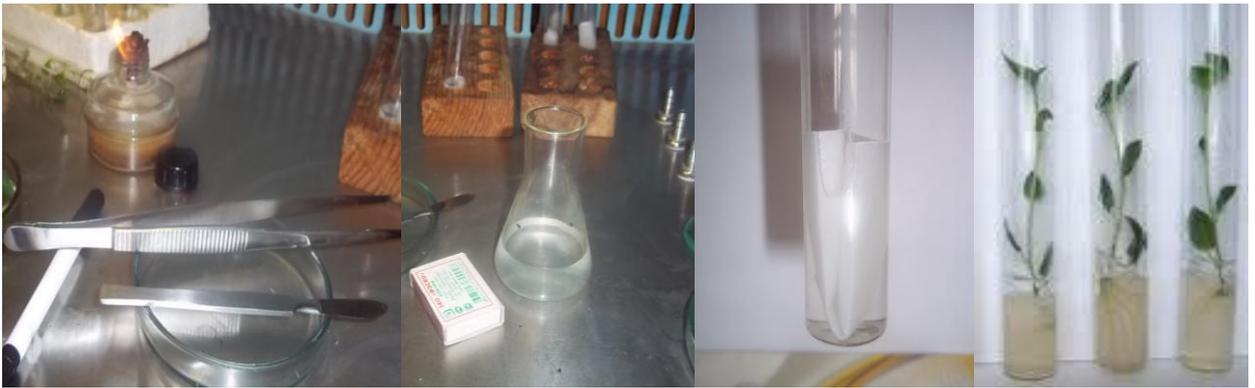


Рис. 2.1. Інструменти та матеріали необхідні для мікроклонального розмноження картоплі в умовах *in vitro*.



Рис. 2.2. Черенкування рослин картоплі.



Рис. 2.3. Пробіркові рослини картоплі, вирощені в умовах *in vitro*.

Калусні культури можна отримати з багатьох органів рослини (експланти листка, стебла, кореня, дисків мікробульб) або з певного типу

клітин (ендосперми, пиляків, соматичних клітин, протопластів). Після вибору експланта та підбору живильного середовища приступають до отримання калусних культур. Для отримання калусної культури картоплі використовують листки і стебла пробіркових рослин *in vitro*. Листові пластинки розрізають скальпелем перпендикулярно середній жилці на смужки шириною 1 мм. Стебла нарізають на сегменти 2-4 мм, травмуючи тканину скальпелем у вигляді насічок. Експланти поміщають у чашки Петрі чи колби. Підбором живильного середовища регулюють тип калусної тканини (крихка чи щільна). Індукція калусоутворення у картоплі проходить з використанням середовища Мурасіґа-Скуґа з вмістом 2,0-5,0 мг/л 2,4-Д; 0,2-1,0 мг кінетина або 0,1-0,5 мг/л БАП. Висока концентрація 2,4-Д у середовищі в подальшому може негативно впливати на процес регенерації. При оптимально підбраному середовищі, відповідно до сортів, за 3-5 тижнів утворюються калуси. Стерильним скальпелем зрізають утворені калуси з вихідного експланта. При цьому потрібно звернути увагу на розміри шматочка калуса, який переносять на живильне середовище. Отримані ліні калусних культур потрібно регулярно пересаджувати, приблизно через кожні 4-6 тижнів. Умови культивування для крихкої калусної тканини "темнові" культуральні, для щільного довгопасованого калусу "світлові" культуральні при температурі  $24-26^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ , відносній вологості повітря 80-85%.

З метою одержання рослин-регенерантів калусну тканину переносять на середовище для морфогенезу. Культивують у "світловій" кліматичній кімнаті при температурі  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , освітленості  $5000\pm 500$  лк, 16-годинному фотоперіоді й відносній вологості 80-85%. Пересадження калусної тканини проводять через 4 тижні на регенераційні середовища. Регенеровані пагони вкорінюють на безгормональному середовищі МС.

Виділення стійких регенерантів картоплі до *Fusarium oxysporum* проводили на основі калусної культури, ініційованої з пробіркових рослин картоплі сорту Бородянська рожева, вирощених в умовах *in vitro*. В роботі використані штучні поживні середовища для калусогенезу, регенерації,

вирощування картоплі, розроблені УНДІ КГ. Інфекційний фон створювали шляхом введення в поживне середовище фільтрату культуральної рідини гриба *Fusarium oxysporum* (рис. 2.4.). Культуральний фільтрат отримували за допомогою мікробіологічного фільтра (рис. 2.5.).

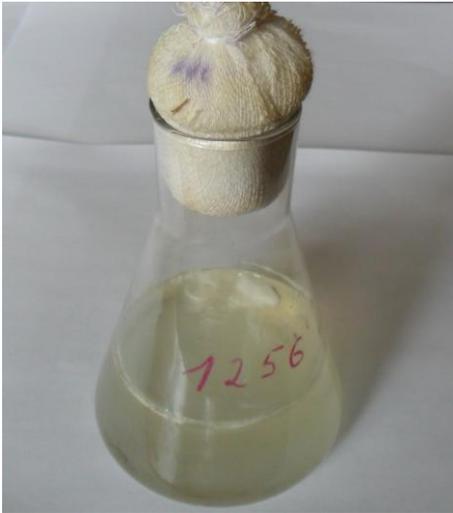


Рис. 2.4. Ріст гриба *Fusarium oxysporum* на рідкому середовищі Чапека для отримання культурального фільтрату.



Рис. 2.5. Мікробіологічний фільтр.

Випробували дію різних концентрацій токсичного фільтрату на калус для встановлення оптимальної, при якій гине 90% тканини. Летальну концентрацію використовували в селекції калусу, застосовуючи переривний метод відбору (табл.2.1).

**Таблиця 2.1. Селекція калусної культури картоплі на стійкість до культурального фільтрату *Fusarium oxysporum***

Номер пасажу	Наявність селективного фактору	Мета пасажу	Примітки
1	+	Відбір стійких калусних ліній	Стійкість може бути обумовлена як генетичними, так і адаптаційними причинами.
2	-	Вирощування стійких калусів	
3	+	Перевірка генетичної стабільності ознаки резистентності до культурального фільтрату.	Стійкість обумовлена тільки генетичними причинами.
4	-	Культивування калусних ліній з генетично стабільною ознакою резистентності.	

### РОЗДІЛ 3. ВИДЛЕННЯ СТІЙКИХ ГЕНОТИПІВ КАРТОПЛІ ДО ТОКСИНІВ ГРИБА *FUSARIUM OXYSPORUM*

#### 3.1. Поширення сухої фузаріозної гнилизни в господарствах Житомирській області

За останні роки питома вага вирощування картоплі в колективних господарствах значно знизилась, а основна частка площ знаходиться в приватному секторі. Відомо, що вирощування картоплі в індивідуальних господарствах проходить переважно без дотримання сівозміни, тобто в монокультурі, та на досить низькому технологічному рівні при відсутності сортозаміни. Такий рівень вирощування картоплі призводить до поширення та накопичення шкідників і хвороб картоплі, в тому числі фузаріозу як в період вегетації так і в період зберігання врожаю бульб. Необхідно відмітити, що відомості про поширення фузаріозу в цих умовах у межах України недостатньо повні. Це пов'язане з тим, що, у фітопаталогічній ситуації на картоплі та в біології збудника фузаріозу, відбулися останнім часом значні зміни, пов'язані зі зміною районованих сортів, асортименту фунгіцидів-протруювачів, з внесенням змінених доз органічних та мінеральних добрив, вирощуванням картоплі у монокультурі в приватному секторі.

Згідно проведеної фітопаталогічної експертизи бульб картоплі при зберіганні, встановлено, що суха фузаріозна гниль поширена в усіх обстежених господарствах приватного сектору Житомирської області (табл.3.1). Показники поширення хвороби варіювали від 2 до 5%. Найбільшого поширення хвороба набула в наступних населених пунктах: село Несолонь Звягельського району – 5%, село Стовпів Житомирського району – 4% [2].

**Таблиця 3.1. Поширення сухої фузаріозної гнилі картоплі в господарствах приватного сектору Житомирської області, 2023 р.**

№	Пункт обстеження	Захворювання	Збудник	Поширення хвороби, %
1	2	3	4	5
1	с. Паволоч Житомирського району	суха фузаріозна гниль, ризоктоніоз, симптоми вірусних хвороб, мокра бактеріальна гниль	<i>R. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> ,	3
2	с. Несолонь Звягельського району	суха фузаріозна гниль, ризоктоніоз	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>R. solani</i> .	5
3	с. Зарічани Житомирського району	ризоктоніоз, змішана гниль	<i>R. solani</i>	1
4	с. Єрчики Житомирського району	ризоктоніоз	<i>R. solani</i>	3
5	с. Стівпів Житомирського району	суха фузаріозна гниль, ризоктоніоз	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>R. solani</i>	4
6	с. Квітневе Житомирського району	ризоктоніоз, змішана гниль	<i>R. solani</i>	2

Виділені ізоляти збудників хвороби ідентифікували як *F. oxysporum*, *F. solani*. Окрім фузаріозу було виявлено інші хвороби: сріблясту паршу, мокру гниль, ризоктоніоз, симптоми вірусних хвороб.



Рис. 3.1. Суха фузаріозна гнилизна картоплі

### 3.2. Ідентифікація збудників сухої фузаріозної гнилизни

Із зразків картоплі з ознаками захворювання гнилями бульб, відібраних в Житомирській області (табл. 3.1), на основі морфологічних і культуральних ознак, виділені і ідентифіковані патогенні штами *Fusarium oxysporum* і *Fusarium solani*. При штучному зараженні бульб картоплі вони викликали типові симптоми сухої фузаріозної гнилі у вигляді бурих вдавлених плям. Уражена тканина зморщувалась, утворюючи внутрішні порожнини, вистелені міцелієм гриба. На поверхні бульб з'являлись рожеві, кремово-жовті подушечки. Визначення здатності до токсиноутворення у виділених штамів показало, що фільтрати усіх досліджуваних культур мали фітотоксичну активність по відношенню до рослин картоплі, вирощених в умовах *in vitro*. Культуральні фільтрати цих патогенів викликали мацерацію тканини здорових бульб картоплі, що свідчить про наявність активних пектиназ. Виділені патогенні штами *F. oxysporum* – 26н, 5в, 13а і *F. solani* – 47д, 19о, 17ф. Патогенні штами *F. oxysporum* були використані нами для виділення стійких генотипів картоплі методами біотехнології.



Рис. 3.2. Макроконідії *Fusarium oxysporum*.



Рис. 3.3. Макроконідії *Fusarium solani*.

У збудника *F. oxysporum* макроконідії утворюються в повітряному міцелії, а також в спородохіях або піонотах, серпоподібні, з тонкою оболонкою, з ясно вираженою ніжною, з 3–5 перетинками. Верхня клітина макроконідій поступово і рівномірно звужується. Розміри конідій з 5 перетинками – 20–65 x 3–5 мкм. Макроконідії *F. solani* серпоподібної форми, еліптично зігнуті, з короткою звуженою і тупою верхівкою, з ніжкою чи сосочком у основі. Клітини мають 3–5 перетинок. Розміри конідій з трьома перетинками – 30–45 x 4,5–5,5 мкм. Утворюються вони в повітряному міцелії, спородохіях і піонотах. На ураженій тканині міцелій має кремово – жовте забарвлення.

### **3.3. Виділення стійких генотипів картоплі до токсинів гриба *Fusarium oxysporum*.**

При отриманні резистентних форм картоплі на основі біотехнології, а саме методу тканевого відбору, першим етапом роботи був пошук робочого діапазону концентрації культурального фільтрату *Fusarium oxysporum*, в межах якого виявлялась різна життєздатність калусних тканин. Для встановлення сублетальних доз культуральної рідини проводили порівняння дії ряду концентрацій від 5 до 40 мг/л на ріст калусу картоплі сорту Бородянська рожева (табл. 3.2).

**Таблиця 3.2. Вплив концентрацій культурального фільтрату збудника *Fusarium oxysporum* на життєздатність калусної тканини картоплі сорту Бородянська рожева**

Концентрація, мг/л	% життєздатних калусів	Примітка
5	100	Значно уповільнений ріст
10	100	
20	100	
25	60	
30	12	
35	4	
40	-	

Дані таблиці 3.2 свідчать, що концентрація фільтрату збудника в межах від 5 до 15 мг/л не мала значного токсичного впливу на життєздатність калусної культури і, починаючи з концентрації 20 мг/л, спостерігалось уповільнення росту калусів. Повне пригнічення розвитку калусної культури викликала концентрація токсичного фільтрату *Fusarium oxysporum* 40 мг/л і більше.

Отже нами підібрано сублетальну концентрацію фільтрату патогена: 35 мг/л, при якій гинуло не менше 90% калусної тканини. Ця концентрація служила селективним ситом для відбору з вихідної популяції тих ліній, які за рахунок соматональної мінливості набули більш високу ступінь стійкості до стресового фактору.

При культивуванні в присутності токсинів гриба більша частина калусів набула темно-коричневого забарвлення і відмерла, але деякі з них зберегли життєздатність і продовжували ріст. В стресових умовах тканина стала більш крихкою, але її структура відновилась на безтоксичному середовищі.

Після першого пасажу в умовах токсичного середовища резистентні експланти перенесли на звичайні середовища (без фільтрата збудника) і культивували протягом одного місяця для збереження регенераційної здатності. Повідомлення деяких дослідників стверджують, що при сильному пресінгу токсинів тканина повністю губить морфогенетичні потенції [ 11, 12] тому доцільно використовувати переривний метод відбору .

Для оцінки генетичної стабільності стійкості до культурального фільтрату відібрані калуси повторно культивували на середовищі з токсинами (третьій селекційний цикл), при цьому вони поділились на дві групи. У першій життєздатність в присутності токсину була обумовлена адаптацією – ця група ліній загинула, у другій – життєздатність визначалась генетичними змінами, а тому ці лінії активно росли на фоні селективного фактора. Після третього селективного циклу виділено шість стійких ліній сорту Бородянська рожева (табл. 3.3).

**Таблиця 3.3. Динаміка відбору калусних ліній картоплі сорту Бородянська рожева на стійкість до культурального фільтрату *Fusarium oxysporum***

Номер пасажу	Концентрація селективного фактору, мг/л	Кількість калусів. шт.	
		Всього	Стійких
1	35	1500	15
2	-	15	15
3	35	15	6

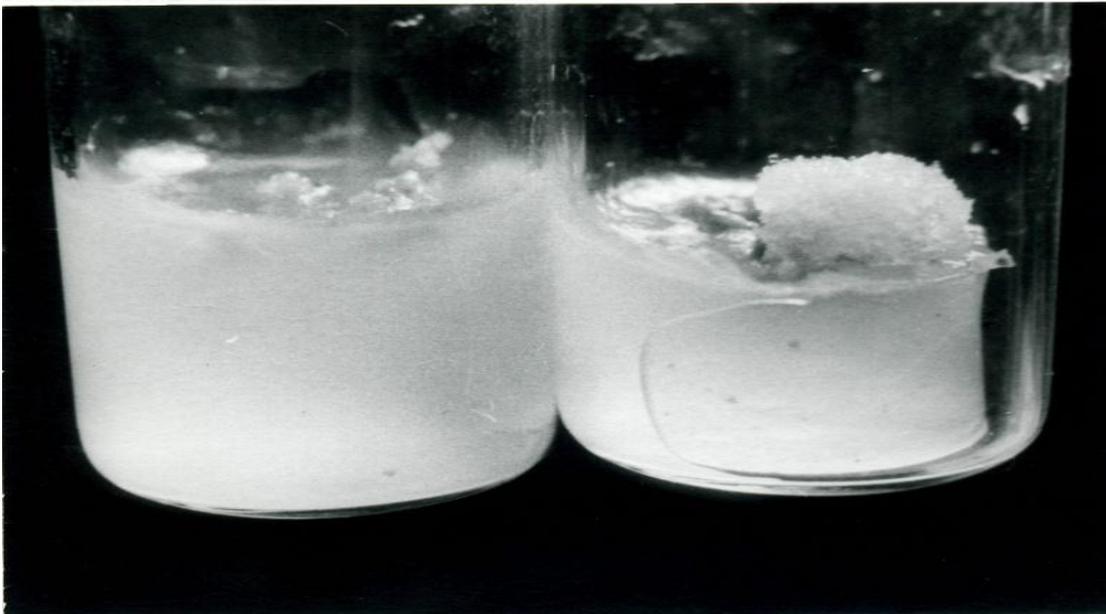


Рис. 3.4. Стійка до культурального фільтрату збудника *Fusarium oxysporum* калусна лінія картоплі сорту Бородянська рожева.

Таким чином, на тканевому рівні нами отримано калусні лінії, що несуть в своєму генотипі стійкість до культурального фільтрату *Fusarium oxysporum*. Після проведення повної схеми тканинної селекції була перевірена їх морфогенетична компетентність (табл. 3.4).

**Таблиця 3.4. Морфогенетичні компетенції калусних ліній картоплі сорту Бородянська рожева, стійких до культурального фільтрату *Fusarium oxysporum***

Калусні лінії, шт.	
всього	здатних до морфогенезу
6	2

В літературі не описані випадки стриманих регенерантів в усіх без винятку клітинних і калусних клонів. В ході тривалого відбору деякі з них гублять морфогенетичну компетентність. Здатність картоплі до морфогенезу в значній мірі залежить від генотипічних особливостей сорту, пори року, гормональних умов середовища, фізіологічного стану матеріалу для експлантатів і інших факторів [10]. Практично для кожного сорту необхідно підбирати свої оптимальні умови для регенерації *in vitro*.

Процес індукції морфогенезу був тривалим, використовували різні середовища для того, щоб знайти оптимальний варіант. Регенерація інтенсивно проходить тільки у весняний період. Спочатку спостерігалось потемніння калусної тканини і утворення глобул, після чого з'явилися меристематичні зони (рис. 3.5.). Тканину неодноразово пересаджували на свіжі середовища (з БАП, зеатином) до утворення паростків, які відділяли і культивували на безгормональних середовищах для укорінення [22, 27].

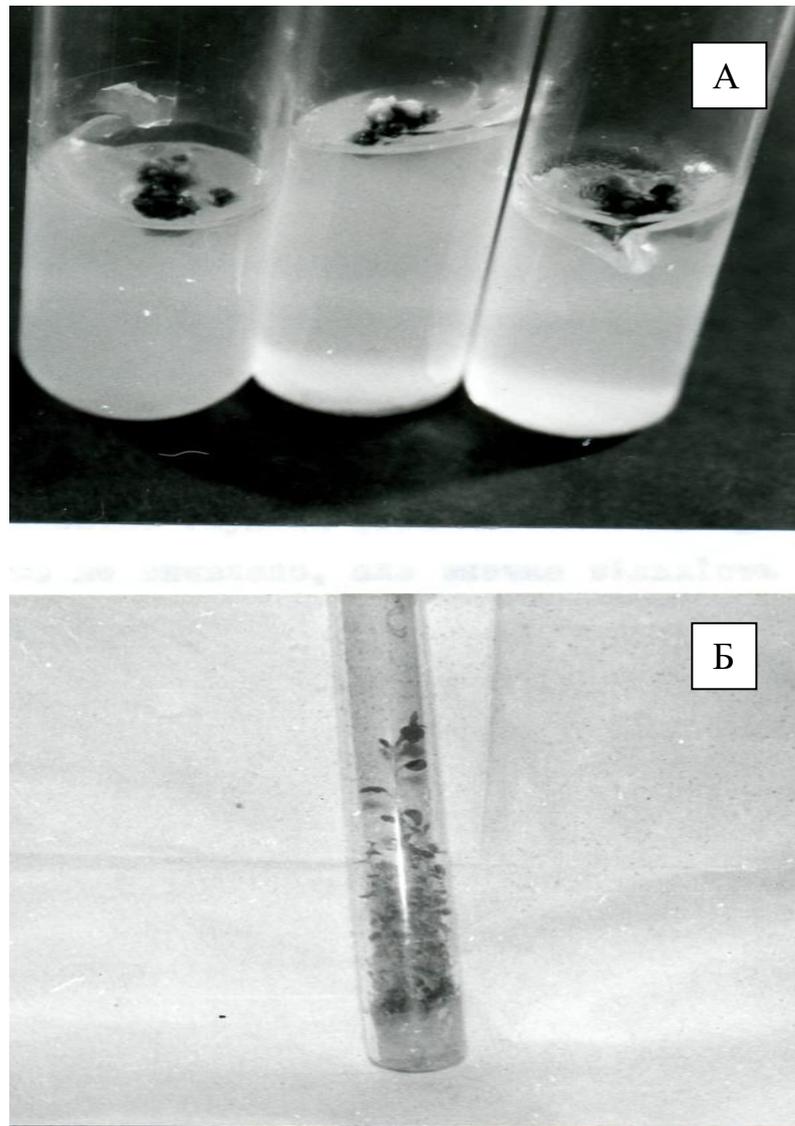


Рис. 3.5. Регенерація рослин картоплі сорту Бородянська рожева з калусних ліній, стійких до культурального фільтрату збудника *Fusarium oxysporum*: А - формування меристематичних зон; Б - утворення паростків.

Частина калусів лишилась без змін (безкольоровою і крихкою) – в цьому випадку індукція морфогенезу дорівнювала нулю. Заключним етапом роботи була перевірка регенерантів на стійкість до токсинів гриба. Регенеранти тестували впродовж семи діб в середовищі з токсинами гриба *Fusarium oxysporum*. 110 із 140 листків рослин, отриманих із стійкого калусу залишались зеленими. 50 листків контрольних рослин втратили тургор, пожовкли. Через 20 діб всі рослини загинули. Отже, отримані із стійкого

калусу рослини набули відносну стійкість до токсинів гриба *Fusarium oxysporum*, проте абсолютно імунних генотипів не виявлено. Повторна ініціалізація калусу з регенерантів і його тестування на стійкість до токсинів *Fusarium oxysporum* показали стабільність ознаки, що дозволяє стверджувати про генетичний характер отриманої соматичної мінливості.

Отже на основі біотехнологічних методів розроблена селективна система для отримання відносно стійких генотипів картоплі проти збудника *Fusarium oxysporum*, яка включає поетапну селекцію калусної культури на поживному середовищі з фактором стресу: культуральним фільтратом 10–14 даної культури гриба *Fusarium oxysporum*, вирощеного на рідкому середовищі Чапека при оптимальних умовах, в сублетальній концентрації від 35 мг/л і вище, яка встановлюється індивідуально для кожного генотипа.

## ВИСНОВКИ

1. Згідно проведених досліджень, суха фузаріозна гниль картоплі поширена в усіх обстежених господарствах приватного сектору Житомирської області. Показники поширення хвороби варіювали від 2 до 5%. Найбільшого поширення хвороба набула в наступних населених пунктах: село Несолонь Звягельського району – 5%, село Стовпів Житомирського району – 4%.
2. В результаті вивчення патогенних культуральних, морфологічних властивостей грибів, виділених із уражених сухою гниллю зразків картоплі, відібраних в зоні Полісся України, ідентифіковано такі збудники захворювання: *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*.
3. Виділені патогенні штами: *Fusarium oxysporum* – 26н, 5в, 13а; *Fusarium solani* – 47д, 19о, 17ф.
4. На основі біотехнологічних методів розроблена селективна система для отримання відносно стійких генотипів картоплі до збудника *Fusarium oxysporum*, яка включає поетапну селекцію калусної культури в умовах *in vitro* на поживному середовищі з фактором стресу – культуральним фільтратом 10–14 даної культури гриба *Fusarium oxysporum*, вирощеного на рідкому середовищі Чапека при оптимальних умовах, в сублетальній концентрації 35 мг/л і вище, яка встановлюється індивідуально для кожного генотипа.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Біотехнологія з основами екології: навчальний посібник / Трохимчук І. М., Плюта Н. В., Логвиненко І. П., Сачук Р. М. Київ: Видавничий дім «Кондор», 2019. 304 с.
2. Білявський І. В. Суха фузаріозна гниль картоплі в умовах Полісся України. Інтенсифікація еколого-біологічного рослинництва: збірник тез доповідей науково-практичної конференції студентів агрономічного факультету (м. Житомир, 15 листопада 2023р.), Житомир: Поліський національний університ. С. 100–101.
3. Билай В. И. Методы экспериментальной микологии. Киев: Наук. думка, 1982. 551 с.
4. Билай В. И., Гвоздяк И. Г., Скрипаль И. Г. Микроорганизмы – возбудители болезней растений. К.: Наук. думка, 1988. 549 с.
5. Билай В. И. Фузариозы. К.: Наук. думка, 1977. 441 с.
6. Бондар І. В., Гуляев В. М. Основи біотехнології. Монографія Дніпродзержинськ: Видавництво ДДТУ, 2009. 444 с.
7. Буга С. Ф. Проблема борьбы с корневыми гнилями. *Защита растений*. 1984. №1. С.17–24.
8. Векірчик К. М. Практикум з мікробіології. К.: Либідь, 2001. 142 с.
9. Довідник із захисту рослин / Л. І. Бублик та ін. За ред. М П. Лісового. К.: Урожай, 1990. 744 с.
10. Дробик Н. М., Гуменюк Г. Б., Грубінко В. В. Лабораторний практикум з біотехнології. Тернопіль, 2019. 124 с.
11. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наук. думка, 1980. 488с.
12. Калинин Ф. Л., Кушнир Г. П., Сарнацкая В. В. Технология микрклонального размножения растений. Киев: Наук. думка, 1992. 232 с.
13. Картопля / за ред. В. В. Кононученка, М. Я. Молоцького. Біла Церква, 2002. Т. 1. 536 с.

14. Караджова Л. В. Фузариозы полевых культур. Кишинев, 1989. 253 с.
15. Коваль Н. Д. Вивчення стійкості сортів і гібридів картоплі проти сухої фузаріозної гнилі. *Картоплярство*. 1983. Вип. 14. С. 23–25.
16. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений и факторы, регулирующие этот процес. *Цитология и генетика*. 1980. Т.14, №1. С. 73-81.
17. Куценко В. С. Картопля. Хвороби і шкідники / за ред. В. В. Кононученка, М. Я. Молоцького. К., 2003. Т. 2. 240 с.
18. Кучко А. А., Олійник Т. М. Сомаклональна мінливість у картоплі. *Картоплярство*. 1998. Вип. 28. С. 28–36.
19. Кучко А. А., Власенко В. М., Мицько В. М. Фізіологія та біохімія картоплі. К.: Довіра, 1998. 335 с.
20. Кушнір Г. П., Сарнацька В. В. Мікроклональне розмноження рослин. Київ: Наукова думка, 2005. 272 с.
21. Люта В. А., Кононов О. В. Мікробіологія з технікою мікробіологічних досліджень, вірусологія та імунологія: підручник (ВНЗ I-III р. а.). Вид. 2-е. Київ, 2018. 576 с.
22. Мартиненко О. І. Методи молекулярної біотехнології. Лабораторний практикум. Київ: Академперіодика, 2010. 232 с.
23. Марютін Ф. М., Панталеев В. К., Білик М. О. Фітопаталогія: Навч. пос. Харків : Еспада, 2008. 552 с.
24. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин: підручник для студ. вищ. навч. закладів. Київ: Поліграфконсалтинг, 2003. 520 с.
25. Методичні рекомендації щодо проведення досліджень з картоплею / Куценко В. С. та ін. Немішаєве. 2002. 182с.
26. Методы экспериментальной микологии. Справочник. / И. А. Дудка и др.; под ред. В. И. Билай. Киев: Наукова думка, 1982. 549 с.
27. Мусієнко М. М., Панюта О. О. Культура ізольованих клітин, тканин і органів рослин. Киев: Фітосоціоцентр, 2001. 47 с.

28. Науково – практичні рекомендації по екологічно безпечних технологіях застосування пестицидів при вирощуванні основних с-г культур в господарствах Житомирської області / О. А. Дереча та ін. Житомир: Евенюк. 2009. 64 с.
29. Недвига О. Є. Хвороби картоплі: навчальний посібник. Умань: Уманське комунальне навчально-поліграфічне підприємство, 2009. 338 с.
30. Оздоровлення насіннєвого матеріалу картоплі та його діагностика в системі біотехнологій / Т. М. Олійник та ін. *Сільськогосподарська мікробіологія*. 2011. Вип. 14. С. 156–166.
31. Пересипкін В. Ф. Сільськогосподарська фітопатологія: підручник. К.: Аграрна освіта, 2000. 451 с.
32. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія. Київ: НУХТ, 2009. 336 с.
33. Положенець В. М, Іващенко І. В, Немерицька Л. В. Хвороби, шкідники та бур'яни картоплі. Ж: Рута, 2012. 175 с.
34. Положенець В. М., Марков І. Л., Мельник П. О. Хвороби і шкідники картоплі. Житомир, 1994. 320 с.
35. Положенець В. М. Захист картоплі від хвороб і шкідників в агроценозі малопродуктивних земель Полісся. К., 2002. 199 с.
36. Рудишин С. Д. Біотехнологія рослин: навч. посіб. Суми: «Корпункт», 2024. 200с.
37. Страшнюк Н. М., Феник С. Й., Грубінко В. В. Лабораторний практикум з біотехнології. Тернопіль, 2000. 123 с.
38. Токсично – біологічні властивості фузарієвої кислоти. *Мікробіологічний журнал* / В. І. Білай та ін. 1975. Т. 37, вип. 5. с. 325–328.