

## МОЖЛИВОСТІ КЛІТИННОЇ СЕЛЕКЦІЇ ТА СОМАКЛОНАЛЬНОЇ ВАРІАБЕЛЬНОСТІ ГЕНОТИПІВ КАРТОПЛІ ДЛЯ СТВОРЕННЯ СОРТІВ СТІЙКИХ ДО ФУЗАРІОЗУ

*У результаті виконання поставлених завдань встановлено особливості калюсогенезу, регенерації та отримання стійких до фузаріозу клітинних ліній картоплі в модельованих умовах біотичного стресу. На цій основі запропоновано елементи технології клітинної селекції картоплі на стійкість до *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sambucinum*. Рослини-регенеранти одержані на селективних середовищах характеризуються підвищеною стійкістю (на 10–35 %) до дії патогенів порівняно з регенерантами контрольного варіанта.*

**Ключові слова:** картопля, культура *in vitro*, клітинна селекція, селективні середовища, фітотоксичні метаболіти, рослини-регенеранти.

### Постановка проблеми

Картопля – одна з найпоширеніших культур у світі, її вирощують на всіх континентах практично в кожній країні, майже в усіх зонах, а при створенні певних умов – навіть у районах, несприйнятливих для сільськогосподарського виробництва. В Україні картоплю вирощують на площі понад півтора мільйона гектарів.

За останні роки сорт став одним з визначальних чинників ефективності сучасного картоплярства. Роль сорту в формуванні врожаю близько 50%. Значення сорту загальновідоме і його не можна переоцінити, відрізняючись за комплексом біологічних особливостей та господарських ознак, сорти складають базис будь-якої технології [6].

У сучасних умовах можливості селекціонерів зі збільшення доступної генетичної мінливості значно зросли. В їх розпорядженні є нові методи індукування мутацій, хромосомної та генної інженерії, злиття протопластів та інші, хоча основними джерелами спадкової мінливості, що використовуються в селекційній практиці, залишаються гібридизація і мутагенез. Тому поряд з

використанням рекомбінантних джерел генетичної мінливості цілком доцільним і перспективним є пошук і відпрацювання ефективних методів розширення генетичного різноманіття і за рахунок технологій *in vitro* з використанням різноманітних селективних агентів.

#### **Аналіз останніх досліджень і публікацій**

Базуючись на індукованій чи спонтанній соматоклональній мінливості, в культурі клітин та тканин можливо відібрати в селективних умовах генотипи стійкі до несприятливих факторів зовнішнього середовища, в тому числі і до збудників хвороб. Питаннями використання безклітинних селективних агентів (культуральні фільтрати, токсини) займалися певні дослідники. Такий підхід використовували при отриманні рослин картоплі стійких до *Phytophthora infestans* [7], *Pizootonia solani* [3], *Erwinia atroseptica* [4], *Fusarium oxysporum* [8].

З метою розроблення схеми клітинної селекції на стійкість до збудників фузаріозного в'янення картоплі нами було вивчено дію культуральних фільтратів двох грибних патогенів та їх фітотоксичних метаболітів, а саме фузарієвої кислоти [2]. на ріст і регенерацію суспензійної культури та калюсів двох сортів картоплі з різною стійкістю до даних патогенів.

Задачею даної роботи є відпрацювання критеріїв одержання регенерантів на селективних середовищах та оцінка відселектованих ліній на рівні пробіркових рослин та в польових умовах.

#### **Мета, завдання та методика досліджень**

У дослідженнях використовували сорти картоплі селекції Інституту картоплярства НААН з різною стійкістю до *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sambucinum*: Гурман (стійкий) та Тирас (сприйнятливий).

Поживним середовищем слугувало середовище Мурасіге-Скуга (МС) [9] з різними концентраціями гормонів та амінокислот.

Оцінку стійкості на рівні регенеруючого калюса визначали підрахуванням кількості регенерантів, які вижили на селективних середовищах і число сформованих пагонів на калюс. Кількість вихідних калюсів складала в дослідних зразках – 250 штук, у контролі – 100. У подальшому враховували кількість вкорінених регенерантів.

Аналіз стійкості на рівні рослин проводили в лабораторних умовах шляхом обприскування суспензією конідій. У польових умовах оцінки рослин щодо стійкості проти захворювання, кількісних та якісних показників проводили з використанням методів селекції [5].

#### **Результати досліджень**

У результаті попередніх досліджень [2] ми одержали на тканинному рівні соматоклональні лінії стійкі до фітотоксичних метаболітів (ФТМ) *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sambucinum*.

Проте слід зазначити, що не всі отримані лінії були здатні до регенерації. В ході тривалого селективного відбору деякі з них втратили морфогенетичну

компетентність. Серед проаналізованих літературних джерел нам не вдалося виявити жодного випадку одержання регенерантів у всіх без винятку клітинних і калюсних клонів. Серед резистентних калюсних ліній сорт Гурман до регенерації був здатен лише 36 %, сорт Тирас лише 2,8 %.

Проблема одержання регенерантів з стійких клітинних і калюсних ліній є однією з найбільш важливих і складних у клітинній селекції. Регенерація пагонів з таких клітин дуже ускладнена і частота утворення рослин низька.

Розробляючи селективні середовища, ми виходили з припущення, що в більш жорстких селективних умовах проходить скринінг клітин з підвищеною стійкістю до фітотоксичних метаболітів грибів *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sambucinum*. Проліферація клітин призводила до утворення калюса, а згодом і регенерантів, які характеризувалися підвищеною стійкістю. Результати досліджень регенерації рослин, проведеної в селективних умовах, показали, що підвищення концентрації токсичних метаболітів у середовищі знижувало кількість одержаних регенерантів. Так, для сорту Гурман на контрольному середовищі (без фітотоксичних метаболітів) одержали 136 регенерантів, на середовищі, яке містило 10 мкМ ФТМ – 139 шт.; 20 – 119 шт.; 30 – 106 шт.; 40 – 78 шт.; 50 – 61 шт.; 60 – 41 шт. і на середовищі з найвищою концентрацією 70 мкМ всього 37 рослин.

Така закономірність зберігалася і для сорту Тирас (табл. 1).

**Таблиця 1. Вихід рослин-регенерантів із суспензійної культури картоплі на селективному середовищі з різними концентраціями ФТМ**

Варіанти дослідів	Висаджено експлантів, шт.	Отримано, шт.	
		морфогенних калюсних ліній	рослин-регенерантів
Сорт Гурман			
МС (контроль)	100	64	136
МС + ФТМ, мкМ:			
10	200	68	139
20	200	62	119
30	200	54	106
40	200	49	78
50	200	43	61
60	200	38	41
70	200	36	37
Сорт Тирас			
МС (контроль)	100	58	102
МС + ФТМ, мкМ:			
10	200	43	63
20	200	27	43
30	200	12	18
40	200	6	11
50	200	3	3
60	200	2	2
70	200	2	2

Одержані на селективних середовищах рослини-регенеранти розмножили методом живцювання і оцінили на стійкість до *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sambucinum*.

Методом штучного зараження оцінили 238 ліній соматоклонів та 825 ліній, отриманих методом клітинної селекції. Слід зазначити, що серед рослин кожного з досліджуваних сортів, одержаних на контрольному середовищі (без ФТМ) і на селективних середовищах, спостерігали утворення ліній як із підвищеною стійкістю, так і більш сприйнятливих. Слід зазначити, що значна частина стійких форм мала і морфологічні зміни. Можливо це явище пояснюється соматоклональною варіабельністю клітин під дією умов культивування *in vitro*. Характер розподілу частоти утворення різних за стійкістю ліній в межах кожного з вивчених генотипів указує на те, що більш стійкі на рівні рослин-регенерантів лінії частіше зустрічалися у нащадків більш стійких генотипів. Так, серед регенерантів сорту Гурман 43% складала рослини, які мали вищий бал стійкості, в порівнянні з контролем. Тоді як лінії з підвищеною стійкістю у сорту Тирас не перевищували 12% від загальної кількості одержаних рослин. У середньому з усієї кількості досліджуваного матеріалу, одержаного методом соматоклональної мінливості, 28,4 % ліній мали стійкість на рівні контролю, 22,4 % ліній мали стійкість вище контролю на 1–2 бали, що становило 4–7 балів залежно від сорту.

Проте абсолютно імунних форм картоплі щодо фузаріозного в'янення виявлено не було.

Внесення фітотоксичних метаболітів грибів *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sambucinum* у селективні середовища призвело не лише до підвищення стійкості у рослин-регенерантів на 2–4 бали, але і до збільшення загальної кількості стійких ліній порівняно з контролем. Так 38,7 % отриманих ліній мали вищий бал стійкості, ніж вихідний сорт, а 41,4 % складала рослини зі стійкістю на рівні контролю.

Лінії, які характеризувалися підвищеною стійкістю, в подальшому випробовували в польових умовах на штучному інфекційному фоні з метою вивчення питання щодо збереження резистентності, яка була досягнута в культурі *in vitro*, в польових умовах протягом 2011–2013 років.

Бульби картоплі висаджували на ділянці, де в попередні роки відмічали сильне ураження фузаріозним в'яненням та вносили в кожну лунку по 4 г інфікованого препарату із фузаріуму, який одержували шляхом розмноження чистої культури *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sambucinum* на картопляно-вівсяному середовищі [2].

Аналіз результатів оцінювання (табл. 2) свідчить, що всі досліджувані лінії в тій чи іншій мірі уражувалися фузаріозом. Слід зазначити і характерне наростання захворювання за роки досліджень: у 2011 році кількість уражених рослин становила 2,1–26,7 %, в 2013 році – 7,7–44 %. Візуальна оцінка картоплиння за ступенем ураження фузаріозом показала високий (5–8) бал стійкості, в той час як контрольні зразки уражувалися значно сильніше (бал стійкості 1–5). У результаті досліджень нам вдалося виділити лінії, які протягом трьох років випробувань характеризувались вищим балом стійкості порівняно з вихідними сортами Гурман та Тирас.

Одержані лінії оцінювали за урожайністю та крохмальністю. Відхилення ліній за господарсько-цінними показниками спостерігали як у бік збільшення

значення ознаки, так і її зниження. При цьому доля відхилення в бік збільшення складає 25–75 % залежно від ознаки. Посидання максимальних значень ознак виявили в лініях 12 та 28 сорту Гурман. Дані лінії для подальшого випробування передано до селекційного розсадника основного випробування.

Таблиця 2. Мінливість ліній регенерантів за господарсько-цінними ознаками в польових репродукціях

Сорт	Номер лінії	Урожай, г/кущ	Вміст крохмалю, %	Бал стійкості		
				2011	2012	2013
Гурман		1032	15,4	5	4,3	3,8
	3	1307	15,0	4,3	3,9	3,0
	4	1082	15,8	5,7	5,1	4,5
	5	664	15,2	6,3	6,0	5,6
	7	1305	15,7	5,7	5,4	5,0
	8	1140	15,9	7,7	6,8	4,9
	9	915	15,1	6,3	6,0	4,8
	12	1533	16,3	8,0	7,8	7,8
	16	970	15,2	6,6	5,0	3,9
	17	1087	15,5	5,2	5,0	4,5
	27	1234	15,7	6,7	6,1	4,8
	28	1670	16,6	7,8	6,5	6,0
	29	944	15,3	4,7	4,0	4,0
	34	1422	15,5	5,0	4,0	3,2
НІР05		281				
Тирас		995	12,2	2,8	1,7	0,9
	8	1360	12,2	4,1	3,6	2,9
	14	854	12,8	4,6	3,9	3,7
НІР05		315				

### Висновки та перспективи подальших досліджень

Проаналізовано мінливість між сортами картоплі за здатністю до морфогенезу *in vitro* (калюсо- і регенераційна властивості) на середовищах з різним вмістом фітотоксичних метаболітів *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sambucinum*.

У результаті клітинної селекції отримано рослини-регенеранти картоплі, стійкі до селективних агентів у культурі *in vitro* та, безпосередньо, до збудників фузаріозного в'янення в умовах інфекційного фону.

У подальшому плануємо оцінити на генетичному рівні (*RAPD* метод) калюсні клітини, які культивуються в селективних умовах та рослини-регенеранти, одержані в результаті клітинної селекції і різняться підвищеною стійкістю до *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sambucinum*.

### Література

1. Билай В. И. Методы экспериментальной микологии. / В. И. Билай. – К. : Наукова думка, 1982. – 322 с.
2. Захарчук Н. А. Ефективність селекції картоплі *in vitro* на стійкість до *Fusarium oxysporum* та *Fusarium sambucinum* / Н. А. Захарчук // Вісн. Сумського нац. аграрного ун-ту. Сер. Агрономія і біологія. – 2013. – Вип. 11(26). – С. 188–191.

3. Калашикова Е. А. Клеточная селекция растений на устойчивость к грибным болезням : автореф. дис на соискание науч. степени доктора биол. Наук: спец 03.00.23 / Е. В. Калашикова. – М., 2003. – 39 с.

4. Олійник Т. М. Активність комплексу екзоферментів збудника чорної ніжки картоплі / Т. М. Олійник // Картоплярство. – К. : «Урожай», 1994. – Вип. 25. – С. 40–43.

5. Методичні рекомендації щодо проведення досліджень з картоплею / В. С. Куценко, А. А. Осипчук, А. А. Подгаєцький [та ін.]. – Немішаєве, – 2002. – 182 с.

6. Подгаєцький А. А. Можливість виділення висококрохмалистих форм серед потомства від схрещування міжвидових гібридів / А. А. Подгаєцький // Вісн. Сумського нац. аграр. ун-ту. Сер. Агронія і біологія. – 2013 . – Вип. 3(25). – С. 224–228.

7. Behnke M. General resistance to late blight of *Solanum tuberosum* plants regenerated from callus resistant to culture filtrates of *Phytophthora infestans* / M. Behnke // Theor. and Appl. Genet. – 1980. – 56. – P. 151–152.

8. Bolic M. In vitro selection for disease resistance in potato and barley / M. Bolic, B. Foroughi-Wehr, F. Kohler // Nuclear Technigues and in vitro Culture for Plant Improvement. – Vienn: IAEA, 1986. – P. 275–285.

9. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, A. Scoog // Phtsiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.