

Т.М. Мірошніченко, аспірант,
Т.В. Івченко, В.Л. Черненко, кандидати с.-г. наук
Інститут овочівництва і баштанництва НААН

ОЦІНКА СТІЙКОСТІ ЗРАЗКІВ ТОМАТА ДО ФУЗАРІОЗНОГО В'ЯНЕННЯ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Показана можливість проведення експрес-оцінки стійкості зразків томата до фузаріозного в'янення за реакцією калюсів на вміст ФКР гриба-збудника хвороби у живильному середовищі в культурі in vitro. Розроблена шкала для візуальної оцінки впливу комплексу токсинів ФКР F. oxysporum на зростання і розвиток калюсів. Результати скринінгу співпадають з результатами фітопатологічної оцінки за методикою РЕВ.

Ключові слова: томат, фузаріозне в'янення, оцінка стійкості

Вступ. Фузаріозне в'янення, збудниками якого є патогенні гриби *Fusarium solani* та *Fusarium oxysporum*, – одна з найбільш шкодочинних хвороб пасльонових рослин взагалі і томата зокрема. На території України, особливо у посушливі роки, втрати урожаю томата внаслідок ураження цим фітопатогеном сягають 20–30% як у захищеному, так і у відкритому ґрунті. Екстремально високі температури повітря і підвищена вологість у захищеному ґрунті створюють надзвичайно сприятливу атмосферу для розвитку і розповсюдження фузаріозного в'янення. У той же час сучасні районовані в Україні сорти томата виявилися малоприспособленими до нових умов культивування і проявляють низьку стійкість до даної хвороби. Тому актуальними для селекційної практики є дослідження з пошуку джерел і донорів стійкості до фузаріозного в'янення томата. У зв'язку з цим виникає потреба у надійних лабораторних експрес-методах оцінки селекційних зразків на фузаріозостійкість.

Оцінку стійкості томата до фузаріозного в'янення проводять методами штучного зараження інкулятором сіянців, окремих пагонів або дорослих рослин, які вирощуються на інфекційному фоні

© Мірошніченко Т.М., Івченко Т.В., Черненко В.Л., 2014.

(15-денна жива культура гриба-збудника). Ступінь ураження рослин хворобою визначають через 30 і 60 діб. Зведена характеристика рівня стійкості зразка при цьому отримується після 2–3 років досліджень [1]. Недоліком цього способу є необхідність значного об'єму інфекційного матеріалу, тривалий термін проведення досліджень, ризик втрати сприйнятливих до фузаріозу генотипів, які мають інші цінніші ознаки.

Оцінку рівня стійкості томатів до фузаріозного в'янення можна визначати в лабораторних умовах за ростом пилоквих трубок на селективному середовищі [2]. Проте цей спосіб дозволяє проводити оцінку стійкості тільки на рівні мікрогаметофітів (констатувати факт лише наявності чи відсутності стійкості). При цьому потрібно враховувати термін придатності об'єкту для проведення аналізу (термін життєздатності пилку, рівень фертильності).

У сучасній науковій літературі опубліковано ряд експериментальних робіт, у яких доведена ефективність використання при оцінках і доборі стійких форм сільськогосподарських рослин у культурі *in vitro* різноманітних штучних методів зараження. Всі вони базуються на визначенні загальної та специфічної реакції калюсних ліній, рослин-регенерантів на штучне їх інфікування фітопатогенами у контрольованих дослідником умовах [3, 4, 5].

Перспективним способом оцінки стійкості до фузаріозного в'янення є культивування калюсних клонів томата *in vitro* на селективних поживних середовищах із додаванням фільтрату культуральної рідини (ФКР) грибів – збудників хвороби. Дослідженнями, проведеними В. П. Мірошніченко, доведено ефективність застосування даного підходу при створенні вихідних селекційних форм томата стійких до альтернаріозу [6]. Перевагами даного методу над існуючими є можливість оцінювати великі об'єми матеріалу, отримані з мінімуму насіння; незалежність від пори року і наявності зимових теплиць; можливість не лише визначати рівень стійкості зразку до фузаріозного в'янення, а й відразу добирати й розмножувати перспективні клони у культурі *in vitro*.

Метою досліджень було визначення ефективності оцінки стійкості зразків томата до фузаріозного в'янення та розробка параметрів експрес-методу скринінгу селекційних зразків в культурі *in vitro*.

Матеріали і методи. Дослідження проводили відповідно до стандартизованих методик [7], було використано 6 зразків томата різних генотипів: гібрид F₇ Златовласка × КДС-5 (К-4138); 5 зраз-

ків андрогенного походження, отримані з гібриду F₁ Світанок × Волгоградец, із них: 2 зразки, насіння яких оброблене γ -променями (МК-1/5 та МК-1/10; поглинена доза 150 Гр), 3 зразки – з підтвердженою стійкістю до ФКР *Alternaria alternata* (И5, И7, И31).

Для отримання проростків у стерильну культуру на безгормональне середовище Мурасиге-Скуга (MS) введено по 100 насінин кожного зразку. Для клітинної селекції використовували сім'ядольні листки отриманих стерильних проростків, які висаджували на індукційне живильне середовище БІ (середовище MS+2 мг/л 6-БАП+2 мг/л ІОЦК) [7] із додаванням як селективного агента 30 і 50% ФКР патогенного гриба *F. oxysporum*. ФКР був наданий спеціалістами-фітопатологами ІОБ НААН.

Добір стійких калюсних клонів на селективних середовищах проводили одноразово. Кількість зразків в одному варіанті 20 штук, три повторності. Обліки проводили через 30 днів після депонування первинних експлантатів. Рівень стійкості досліджуваних зразків проти ФКР *F. oxysporum* визначали шляхом підрахунку кількості експлантатів, що вижили, у кожному варіанті порівняно з контролем (без ФКР), а також виявлення ступеня впливу селективних середовищ з різними концентраціями ФКР на процеси калюсогенезу і морфогенезу в культурі тканин томата. Бал морфогенезу визначався за 5-бальною шкалою, розробленою у лабораторії біотехнології ІОБ НААН. Статистичну обробку одержаних даних здійснювали за Б.О. Доспеховим [8].

Результати досліджень. Нашими дослідженнями визначений зв'язок між рівнем сприйнятливості зразків томата до фузаріозного в'янення та реакцією калюсів на вміст ФКР гриба-збудника хвороби *F. oxysporum* у живильному середовищі в культурі *in vitro*. Результати дисперсійного аналізу показали, що вплив різних концентрацій ФКР *F. oxysporum* на кількість життєздатних експлантатів є індивідуальним для кожного зразку (табл. 1), причому саме фактор В – генотип – є визначальним. Отже, життєздатність експлантатів томата на середовищах з ФКР обумовлена, в першу чергу, генетичною стійкістю зразків до фузаріозного в'янення.

За фактором А – середовище – істотна різниця визначена лише для зразку И7 між контролем та варіантом з 50% вмістом ФКР. Вживання експлантатів за варіантами становило 85,2 і 17,2 штуки відповідно. Різниця за варіантами у інших зразків не перевищує НР₀₅, тобто знаходиться в межах похибки досліду. Такий ре-

зультат можна пояснити низькою патогенністю ФКР використаного штаму збудника хвороби. Проте у всіх досліджених зразків життєздатність калюсних клонів у контрольному варіанті вища, ніж у варіантах з додаванням ФКР, і спостерігається тенденція до зниження кількості життєздатних експлантатів зі збільшенням концентрації селективного агента у живильному середовищі. Дисперсійний аналіз підтверджує наявність істотного зв'язку між зазначеними показниками (на 5% рівні істотності F_{ϕ} перевищує F_T у 21 раз). На основі аналізу показника життєздатності зразки МК-1/5 та К-4138 виділили серед досліджених як найбільш стійкі – у них кількість життєздатних калюсів у варіантах досліду з 30 та 50% вмістом селективного агента практично не відрізняється від контролю.

Найбільш різке зниження кількості життєздатних експлантатів, характерне для генотипів МК-1/10 та И7, свідчить про їх сприйнятливність до фузаріозного в'янення. Низькі абсолютні показники виживаності у генотипу К-4138 можна пояснити природним слабким відгуком на культивування *in vitro*.

Селективний вплив ФКР *F. oxysporum* яскраво проявився на процесах калюсо- і морфогенезу. Істотні відмінності за показником середнього об'єму калюсу визначені як за варіантами середовища, так і за генотипами. На нашу думку, саме цей показник найбільш чітко відображає індивідуальну чутливість генотипа до ФКР збудника фузаріозного в'янення.

Додавання селективного агента сприяло зменшенню середнього об'єму калюсу у всіх генотипів (табл. 2). Наприклад, у зразку МК-1/5 даний показник у контрольному варіанті становив 804,8 мм³, у варіанті з 30% ФКР – 276,0 мм³, а з 50% – лише 66,5 мм³. У генотипа МК-1/10 – відповідно 476,7, 128,3 та 3 мм³. Особливо яскраво пригнічуючий вплив ФКР на дану ознаку проявився у генотипів МК-1/5, И5, МК-1/10 та И7.

Середній бал морфогенезу також істотно знижувався зі збільшенням концентрації ФКР. Так, у генотипу МК-1/5 даний показник зменшувався від 5 у контролі до 2 у варіанті з 50% ФКР. У генотипів МК-1/10 та И7 на середовищі з 50% вмістом патогену морфогенез взагалі не спостерігався. Виняток становить генотип И5, морфогенез якого в культурі *in vitro* не змінювався залежно від концентрації ФКР *F. oxysporum* у живильному середовищі. В усіх варіантах досліду середній бал морфогенезу дорівнював 2. Таким чином, індивідуальна чутливість кожного зразку томата

до досліджуваного патогену проявляється через комплекс змін показників життєдіяльності експлантатів.

За результатами досліджень розроблено 5-бальну шкалу для візуальної оцінки впливу комплексу токсинів ФКР *F. oxysporum* на ріст і розвиток експлантатів, у якій поєднано оцінку як кількості життєздатних експлантатів, так і інтенсивності процесу калусогенезу: бал 0 – високостійкий, розвиток тканин не відрізняється від культивування на контрольному варіанті; бал 1 – стійкий, хлорозних тканин до 25%, наростання калусів інтенсивне; бал 2 – середньостійкий, хлорозних тканин – до 50%, наростання калусів середнє; бал 3 – сприйнятливий, хлорозних тканин – до 75%, наростання калусів пригнічене; бал 4 – високосприйнятливий, хлорозних тканин більше 75%, наростання калусів відсутнє. Досліджені зразки розподілилися за рівнем стійкості в культурі *in vitro* наступним чином: високо сприйнятливі – МК-1/10; сприйнятливий – И5; середньостійкі – К-4138, И7, И31; стійкий – МК-1/5. Найвищим рівнем стійкості в роки досліджень характеризувався генотип МК-1/5.

Із досліджених генотипів на обох варіантах селективного середовища були дібрані стійкі калусні клони, із яких були отримані рослини регенеранти. У подальшому із них були отримані адаптовані до природних умов горщиківі рослини, які були висаджені у скляній теплиці для отримання насіння. У 2013 р. результати польової фітопатологічної оцінки їх потомства на стійкість проти фузаріозного в'янення за методикою РЕВ співпали з результатами досліду (табл. 3). Таким чином, розроблену шкалу можна використовувати для попередньої оцінки стійкості зразків томата. Крім того, запропонований спосіб робить можливим проводити клітинну селекцію томата на стійкість проти фузаріозного в'янення паралельно з оцінкою, що значно прискорює селекційний процес. Результати досліджень використані при створенні методичних рекомендацій «Клітинні технології створення вихідного селекційного матеріалу основних овочевих рослин в культурі *in vitro*».

Висновки. Запропонований експрес-метод оцінки дозволяє одержати достовірні дані щодо рівня стійкості до фузаріозного в'янення зразків томата та гібридних комбінацій на різних стадіях селекційного процесу.

Бібліографія.

1. Методические указания по селекции сортов и гибридов томата для открытого и защищенного грунта. – М. : ВАСХНИЛ, 1986. – С. 54-57.
2. Пат. 3848, Беларусь, С1 А01Р1/00, А01Н1/04. Способ оценки устойчивости томатов к фузариозному увяданию / Анохина В. С., Пискун С. Г., Поликсенова В. Д., Тимошенко М. К. – 03.06.2001.
3. Калашникова Е. А. Клеточная селекция растений на устойчивость к грибным болезням: дис. ... доктора биол. наук: 03.00.23 / Е. А. Калашникова. – М., 2003. – 279 с.
4. Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология : сб. науч. тр. IX-ой междунар. конф., 8-12 сентября 2008 г. / ИФР им. К. А. Тимирязева, МГУ им. М. В. Ломоносова. – М. : ООО «ИД ФБК-ПРЕСС», 2008. – С.156, 410.
5. Пат. 94034770, Российская Федерация, МПК 6 А01Н1/04, А01G7/00. Способ отбора растений, устойчивых к фитопатогену / Веденева М. Л., Тихонова Т. В., Маркелова Т. С., Кириллова Т. В. – 27.05.1997.
6. Пат. 62592, Україна, МПК А01Р1/04 (2006.01). Спосіб створення стійких проти альтернативізу вихідних форм томата / Мірошніченко В. П., Івченко Т. В., Черненко В. Л., Черненко К. М. – 12.09.2011, Бюл. № 17.
7. Методика досліджень в культурі ізольованих тканин овочевих рослин. / Мірошніченко В. П., Сергієнко О. Ф., Івченко Т. В. та ін. – Мерефа : ІОБ УААН, 2004. – 25 с.
8. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) / Б. А. Доспехов. – М. : Колос, 1979 – 416 с.

Т.М. Мирошніченко, Т.В. Івченко, В.Л. Черненко

Оценка устойчивости образцов томата к фузариозному увяданию в культуре *in vitro*.

Резюме. Показана возможность проведения экспресс-оценки устойчивости образцов томата против фузариозного увядания по реакции каллусов на содержание ФКЖ гриба-возбудителя болезни в питательной среде в культуре *in vitro*. Разработана шкала для визуальной оценки влияния комплекса токсинов ФКЖ *F. oxysporum* на рост и развитие каллусов. Результаты скрининга совпадают с результатами фитопатологической оценки по методике СЭВ.

Т.М. Miroshnichenko, Т.В. Ivchenko, V.L. Chernenko

In vitro assessment of tomato samples resistance to Fusarium wilt.

Summary. The possibility of rapid assessment of tomato samples resistance to Fusarium wilt by the calluses reaction to the contents of FCF of pathogenic fungus in the culture medium *in vitro* was shown. A visual scale for assess the impact of toxins complex of *F. oxysporum* FCF on callus growth and development was created. The results of the assessment coincide with the results of the assessment by СМЕА phytopathological method.

1. – Кількість життєздатних експлантатів томата на живильних середовищах з різним вмістом ФКР гриба *F. Oxysporum* (середнє 2012 – 2013), шт.

Фактор В: генотип	Фактор А: середовище			Середнє за фак- тором В
	MS без ФКР, конт- роль	MS+30% ФКР	MS+50% ФКР	
МК-1/5	83,3	80,3	79,8	81,1
МК-1/10	68,3	55,8	33,0	52,4
И 5	66,7	53,3	33,3	51,1
И 7	85,2	35,5	17,8	46,2
И 31	93,5	52,3	48,7	64,8
К-4138	25,5	15,0	10,1	16,9
Середнє за факто- ром А	70,4	48,7	37,1	52,1
НІР ₀₅ А	61,4			
НІР ₀₅ В, АВ	10,2			

2. – Середній об'єм калюсу зразків томата на живильних середовищах з різним вмістом ФКР гриба *F. oxysporum* (середнє 2012 – 2013), мм³

Фактор В: генотип	Фактор А: середовище			Середнє за фактором В
	MS без ФКР, контроль	MS+30% ФКР	MS+50% ФКР	
МК-1/5	808,5±10,1	270,6±17,8	66,0±9,5	381,7
МК-1/10	482,5±35,3	131,3±3,9	5,9±1,1	206,6
И 5	636,7±14,2	308,5±8,5	76,0±1,7	340,4
И 7	410,0±15,4	330,0±18,9	2,0±0,4	247,3
И 31	216,2±10,4	163,4±10,9	112,1±10,4	163,9
К-4138	119,3±15,1	89,2±6,4	57,8±4,0	88,8
Середнє за фактором А	445,5	215,5	53,3	238,1
НІР ₀₅ А	105,8			
НІР ₀₅ В, АВ	17,7			

3. – Рівень стійкості зразків томата до фузаріозного в'янення в культурі *in vitro* та *in vivo*

Зразок	Стійкість <i>in vitro</i>			Стійкість <i>in vivo</i>		
	% ураження	Бал	Рівень стійкості / сприйнятливості	% ураження	РЕВ	Рівень стійкості / сприйнятливості
МК-1/10	77,7	4	--/--	46,3	3	--/--
И5	67,3	3	сприйнятливий	37,1	3	--/--
И7	38,2	2	середньостійкий	20,6	5	середня стійкість / слабка сприйнятливість
ИЗ1	32,1	2	--/--	16,3	5	--/--
К-4138	28,4	2	--/--	6,9	7	висока / практична стійкість
МК-1/5	19,5	1	стійкий	4,2	7	--/--