



Генетика, селекція, біотехнологія

УДК 635:631.147

© 2014

Т.В. Івченко,
Н.О. Баштан,

кандидати
сільсько-
господарських
наук

Т.І. Віцєня

Т.М. Мірошніченко

Г.В. Мозговська

О.Ю. Гарт

Інститут
овочівництва
і баштанництва
НААН

КЛІТИННА СЕЛЕКЦІЯ ОВОЧЕВИХ КУЛЬТУР НА СТІЙКІСТЬ ДО БІОТИЧНИХ І АБІОТИЧНИХ ЧИННИКІВ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

Мета. Розробити біотехнологічні способи прискореного добору стійкого до біотичних і абіотичних чинників вихідного матеріалу для селекції овочевих культур. **Методи.** У дослідженнях використовували: культуру соматичних і гіногенних тканин та клітин, ембріокультуру, мікроклональне розмноження та клітинну селекцію; мікологічні методи — для ідентифікації фітопатогенів, виділення їх у чисту культуру, отримання моноспорових ізолятів і фільтрату культуральної рідини; статистичні методи — для аналізу достовірності одержаних результатів досліджень. **Результати.** Наведено результати клітинної селекції в культурі *in vitro* з розробки способів прискореного скринінгу і добору стійкого до біотичних і абіотичних чинників вихідного матеріалу для селекції овочевих культур. **Визначено** ефективні селективні системи і схеми клітинної селекції для добору клітинних ліній, стійких до фузаріозного в'янення, альтернаріозу, посухо-, соле- та жаростійких. **Висновки.** Рекомендується використовувати способи клітинної селекції для прискореного отримання селекційних форм, здатних вижити в стресових умовах і успішно відновитися.

Ключові слова: *in vitro*, *Fusarium*, *Alternaria*, селективний чинник, фільтрат культуральної рідини, джерела стійкості, добір.

За останні 10 років у науковій літературі опубліковано низку експериментальних робіт, в яких практично доведено ефективність використання для оцінки і добору стійких форм сільськогосподарських рослин у культурі *in vitro* різнобічних лабораторних методів. Нині культивування рослинних клітин, тканин і органів *in vitro* перетворилось у складну

і широкомасштабну галузь експериментальної біології, спрямовану на створення нових ефективних систем поліпшення економічно цінних видів овочевих культур у перспективних напрямках селекції. Перевагами добору стійких до біотичних і абіотичних чинників рослин-регенерантів в умовах *in vitro* є швидка і точніша оцінка ознак полігенної стійкості;

велика кількість проаналізованих генотипів за відносно короткий проміжок часу. Об'єднуючі методи те, що всі вони базуються на визначенні загальної та специфічної реакції калюсних ліній, рослин-регенерантів на середовищах з ефективною дозою селективних агентів у контрольованих дослідницьких умовах [8, 11]. У Селекційно-генетичному інституті — Національному центрі насінництва та сортівивчення проведено дослідження, які свідчать про ефективність експрес-оцінки толерантності селекційного матеріалу м'якої пшениці до грибів роду *Alternaria* та *Fusarium* [3, 5]. У Миронівському інституті пшениці ім. В.М. Ремесла НААН розроблено ефективні методи оцінки і добору генотипів пшениці на стійкість до фузаріозу колосу [2]. Масштабні дослідження з клітинної селекції овочевих рослин проводять у Китаї, Індії [13], США [9], Чехії, Іспанії, Туреччині [12], Італії [10]. Проте наведені в наукових публікаціях методики в роботі з українськими сортами неефективні, оскільки розроблені для генотипів з іншими генетичними параметрами.

Мета досліджень — розробити біотехнологічні способи прискореного добору стійкого до біотичних і абіотичних чинників вихідного матеріалу для селекції овочевих культур.

Методика досліджень. Досліди виконували за загальноприйнятими біотехнологічними методами за використання стандартного обладнання та із застосуванням розроблених нами регенераційних середовищ [4]. У дослідженнях використовували генотипи баклажана, томата, часнику, моркви, капусти головчастої селекції Інституту овочівництва і баштанництва НААН поколінь F_1 – F_6 з різною польовою стійкістю. Клітинну селекцію до хвороб здійснювали на середовищах з різним умістом селективних агентів — фільтратів культуральної рідини (ФКР) патогенів (20, 40 і 60% від об'єму середовища). Чисті культури збудників хвороб отримували за стандартною методикою В.І. Білай [1]. Контрольний варіант у досліді — середовище без додавання ФКР. Для визначення жаростійкості зразків на калюсні клони впливали повітрям температурою 40, 45, 50°C впродовж 6 год. Для добору на солестійкість до живильних середовищ додавали 1,5% NaCl. Під час добору стійкого до осмотичного стресу матеріалу калюси розміщували на середовищах з додаванням 9 і 12% сахарози.

Донорським матеріалом для проведення клітинної селекції овочевих культур були

такі типи експлантатів: для томата, баклажана — сім'ядолі 7–10-денних стерильних проростків; для моркви — калюси соматичні та з незапліднених насіннезародків; для капусти головчастої — апекси 3–5-денних проростків; для часнику — апікальні меристеми. Культивування експлантатів проводили за стандартними для культур температурними умовами (22–24°C за 16-годинного фотоперіоду за освітлення 2 тис. лк). Аналіз впливу селективного чинника на розвиток експлантатів у культурі *in vitro* та першу диференціацію зразків за проявом на калюси проводили на 16-ту добу культивування. Клітинну селекцію проводили за 2-ступінчастими схемами добору.

Отримані рослини-регенеранти розмножували, підрощували, укорінювали і адаптували до нестерильних умов за загальноприйнятими методиками. Надалі оцінку рівня прояву ознак проводили згідно з «Методикою проведення експертизи сортів на відмітність, однорідність і стабільність (ВОС)» [7].

Результати досліджень та їх обговорення. Нами визначено, що на етапі індукції та проліферації калюсу у первинних експлантатів Пасльонових культур (томат, баклажан) можна достовірно диференціювати зразки відповідно до рівня їх стійкості у польових умовах. Виявлено значну генотипову мінливість калюсних клонів за стійкістю до ФКР фітопатогенів, що дає змогу ефективно добирати перспективні за досліджуваними ознаками генотипи. Для експлантатів баклажана східно-азіатського походження ефективними умовами для проведення клітинної селекції на стійкість до фузаріозного в'янення було культивування на селективному середовищі з 20 % ФКР, а для зразків західно-азіатського походження — 40% ФКР. Для культури томата ефективною концентрацією ФКР гриба *F. oxysporum* для добору стійких калюсних клонів прийнятливих генотипів є 30% ФКР. Для середньостійких та стійких зразків рекомендується використовувати концентрації ФКР гриба *F. oxysporum* 50% і вище.

На культурі капусти головчастої розроблено індивідуальну схему клітинної селекції до фузаріозного в'янення, за якої здійснювали добір стійких морфогенних калюсів, на селективному середовищі з 40% ФКР *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*. В експерименті встановлено значний вплив ФКР у живильному середовищі на такі показники розвитку

вихідних експлантатів: життєздатність, частоту регенерації, морфологічні показники розвитку пробіркових рослин капусти (довжину адвентивних пагонів і коренів). За результатами проведених упродовж 2011–2013 рр. досліджень серед 19 обстежених селекційних ліній капусти білоголової дібрано резистентні до дії ФКР мериклони двох генотипів — КН 12708 і КН 12920, які в культурі *in vitro* виявили максимальну життєздатність (71,4 та 48%). Також на селективному середовищі з 40% ФКР високими показниками життєздатності характеризувались індивідуально дібрані мериклони капусти червоноголової генотипу КН 13141, які крім стійкості, вирізнялися підвищеним рівнем антоціанів у пробіркових рослинах.

У селекції овочевих культур актуальним є залучення біотехнологічного методу гіногенезу та андрогенезу (гаплоїдної технології) у поєднанні з клітинною селекцією *in vitro*, завдяки застосуванню яких можна значно скоротити термін створення гомозиготного матеріалу, стійкого до патогенів. У результаті проведених нами досліджень з клітинної селекції моркви виявлено істотний вплив ФКР *Alternaria radicina* M.D. et E. на життєздатність і проліферацію соматичних і гіногенних калюсних клонів моркви, що дало змогу провести скринінг матеріалу за стійкістю до альтернаріозу. Розроблено 2-ступінчасту схему добору, яка включає культивування впродовж одного пасажу (30 діб) на селективному середовищі з 30% ФКР, наступний пасаж на середовищі без селективного чинника і 3-й пасаж на 40% ФКР для жорсткішого селективного добору. Завдяки проведеному впродовж 2011–2013 рр. скринінгу в культурі *in vitro* серед соматичних і гіногенних калюсів 16 генотипів моркви на стійкість до дії ФКР *Alternaria radicina* дібрано 2 резистентних до ФКР гіногенних калюсних клони б. к. 336 та 333, коренеплоди яких передано для залучення до гібридної селекції.

Для культури пиляків томата доведено можливість проведення клітинних доборів на стійкість до ранньої сухої плямистості томата з використанням 20% ФКР *Alternaria solani* S. Кращі зі створених андрогенних ліній МК-1/1, МК-1/3, МК-1/10 за результатами фітопатологічної оцінки характеризувалися польовою стійкістю до альтернаріозу, їх захищено до групи стійких (7 балів за шкалою РЕВ). Зразки томата і баклажана, які

мали високі продуктивні якості, передано до Національного центру генетичних ресурсів рослин України (7 ліній) та впроваджено у селекцію.

Також нами проведено пошукові дослідження у напрямі розробки лабораторних способів добору стійкого вихідного селекційного матеріалу овочевих культур до абіотичних факторів: засолення, осмотичного стресу, високих температур. З метою одержання селекційного матеріалу з комплексною стійкістю до хвороб і абіотичних факторів середовища на культурі томата проведено серію дослідів з додаванням як селективних факторів ФКР *Alternaria solani* та 1% NaCl; ФКР *Alternaria solani* та 90 і 120 г/л сахарози. Вихідним матеріалом були рослини *ex vitro* резистентних до альтернаріозу зразків томата та рослини з проявами стерильності. Найвищу здатність до калюсогенезу на селективних середовищах виявили пиляки зразків з функціональною стерильністю покоління F₇, що підтверджує висловлену нами раніше думку про компенсаційний характер андрогенезу у форм томата з вадами насінневого розмноження.

На культурі часнику добір посухостійких форм серед колекційних зразків проводили культивуванням рослин-регенерантів на живильному середовищі з 12% сахарози.

Для культури баклажана розроблено спосіб оцінки в культурі *in vitro* жаростійкості зразків. Визначено, що оптимальним температурним режимом для скринінгу зразків баклажана на жаростійкість є витримка калюсних клонів упродовж 6 год за температури 45°C. За такого температурного режиму життєздатність калюсів у зразків західно-азіатського підвиду знижувалась до 36%, тоді як у зразків східно-азіатського — вона становила 61,3–76,5%. Для повнішої оцінки жаростійкості отриманих ліній баклажана проведено їх лабораторне діагностування (на листках) за методом Ф.Ф. Мацкова [6]. Результати оцінки жаростійкості збіглися з отриманими в культурі *in vitro* результатами, що підтверджує можливість використання зазначеного вище способу як допоміжного для встановлення рівня жаростійкості зразків баклажана в лабораторних умовах у зимовий період.

Для культури капусти савойської досліджували можливість добору на селективних поживних середовищах в культурі *in vitro* толерантних до водного дефіциту генотипів.

Результати клітинної селекції овочевих культур (2011 – 2013 рр.)

Культура	Селективне середовище	Чинник	Досліджено генотипів, шт.	Донорський експлантат	Рівень стійкості зразків за 9-бальною шкалою РЕВ		Створено клітинних ліній, шт.
					вихідних зразків	дібраних ліній	
Морква <i>Daucus carota</i>	40% ФКР гриба <i>Alternaria radicina</i>	Чорна гниль	16	Калюс із насінневих зародків і соматичний калюс	3	5	2
Капуста білоголова <i>Brassica oleracea convar. capitata</i>	40% ФКР гриба <i>Fusarium oxysporum f. sp. conglutinans</i>	Фузаріозне в'янення	19	Апекси 3–5-добових проростків	3	5	3
Капуста червоноголова <i>Brassica oleracea convar. capitata rubra</i>	Те саме	Те саме	1	Те саме	3	5	4
Капуста савойська <i>Brassica o. var. sabauda</i>	9% сахарози	Посуха	1	»	5	7	4
Часник <i>Allium sativum</i>	12% сахарози	»	6	Рослини-регенеранти	5	7	1
Томат <i>Solanum lycopersicum</i>	20% та 40% ФКР гриба <i>F. oxysporum</i>	Фузаріозне в'янення	13	Сім'ядолі із 7–10-добових проростків	3	5	4
	40% ФКР гриба <i>Alternaria solani</i>	Рання суха плямистість	11	Пилляки	5	7	4
	NaCl (1%)	Засолення	6	Рослини-регенеранти	5	7	2
	9% сахарози	Посуха	8	Те саме	5	7	2
Баклажан <i>Solanum melongena</i>	20% та 40% ФКР гриба <i>Fusarium oxysporum</i>	Фузаріозне в'янення	15	Сім'ядолі 7–10-добових проростків	3	5	2
	40–45°C — 6 год	Висока температура	9	Калюсні клони	5	7	2

Розробку прискореного способу добору посухостійких генотипів проводили дослідженням впливу високого осмотичного тиску, створеного у живильному середовищі підвищеними концентраціями сахарози (9%), на розвиток культури апікальних меристем. Дібрано і розмножено 4 мериклони, рослини яких адаптовано. Нині здійснюється насіннєве розмноження перспективного матеріалу для подальшого випробування отриманого матеріалу.

Створені нові 28-клітинні лінії передано для випробування їх господарських ознак до селекції. За отриманими результатами завдяки підвищеній стійкості до біотичних і абіотичних чинників у новостворених ліній спостерігається збільшення товарної урожайності рослин від 9,2 до 29%, водночас знижується собівартість продукції, а також підвищується рівень рентабельності вирощування овочевої продукції від 3,1 до 68,6%.

Висновки

Використання клітинної селекції забезпечує прискорену оцінку та добір стійкого до біотичних і абіотичних чинників вихідного селекційного матеріалу основних овочевих культур. Стійкість/толерантність новостворених ліній у цьому

разі розглядається як розширення норми реакції, часто значущої, що дає змогу використовувати розроблений підхід для отримання селекційних форм, здатних вижити в стресових умовах і успішно відновитися.

Бібліографія

1. Билай В.И. Фузариї/В.И. Билай. — К.: Наук. думка, 1977. — 443 с.
2. Волощук С.І. Клітинна селекція пшениці на стійкість до *Fusarium graminearum schwabe*: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с.-г. наук: спец. 03.00.15/С.І. Волощук. — Миронівка, 2006. — 20 с.
3. Калашникова Е.А. Клеточная селекция растений на устойчивость к грибным болезням: автореф. дис. на соискание науч. степ. д-ра биол. наук: спец. 03.00.23/Е.А. Калашникова. — М., 2003. — 35 с.
4. Клітинні технології створення вихідного селекційного матеріалу основних овочевих рослин в культурі *in vitro* (метод. реком.)/С.І. Корнієнко, С.І. Кондратенко, Т.В. Івченко та ін. — Х.: Плеяда, 2013. — 47 с.
5. Корня Т.М. Культура пыльцы пшеницы как метод экспресс-оценки устойчивости к фузариозу/Т.М. Корня, С.А. Игнатова, О.В. Бабаянц//Современная биотехнология сельскохозяйственных растений и биобезопасность (Геном растений VI), 7–10.09.2010 г.: тезисы VI междунар. конф. — Одесса, 2010. — С. 90.
6. Мацков Ф.Ф. Новый скорый метод распознавания живых, мертвых и поврежденных тканей зеленого растения. — ДАН СССР. — 1956. — № 6. — С. 255–256.
7. Охорона прав на сорти рослин. Методика проведення експертизи сортів на відмітність, однорідність і стабільність (ВОС). — К.: Алефа, 2004. — 242 с.
8. Chelliah S. Resistance in bhindi, brinjal and tomato to major insect and mite pests Proceedings of the National Seminar on Breeding Crop Plants for Resistance to Pests and Diseases/S. Chelliah, K. Srinivasan. — Tamil Nadu, India, 1983. — P. 47.
9. Crino P. Culture filtrates and toxins in the selection of disease resistant plants/P. Crino, G. Cristinzio//Proc. of the Workshop: Plant Breeding for Resistance to Biotic Stresses. Physiological and Molecular Bases, Monsampolo Del Toronto, Italy, 19–20 May 1994. — Petria, 1996. — P. 197–217.
10. Hammond-Kosack K.E. Plant disease resistance genes/K.E. Hammond-Kosack, J.D.G. Jones//Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 2011. — P. 575–607.
11. Jayashankar S. *In vitro* selection of Vitis vinifera Chardonnay with Elsinoe ampelina culture filtrate is accompanied by fungal resistance and enhanced secretion of chitinase/S. Jayashankar, Z. Gray. — 2000. — P. 200–208.
12. Lebeda A. *In vitro* screening methods for assessing plant disease resistance/A. Lebeda, L. Svabova//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.
13. Malik A. Biochemical/physiological characterization and evaluation of *in vitro* salt tolerance in cucumber/A. Malik, W. Li//African Journal of Biotechnology. — 2010. — P. 3284–3292.

Надійшла 26.08.2014.