

ПІДВИЩЕННЯ ІМУНІТЕТУ РОСЛИН КАРТОПЛІ ДО ПАТОГЕНІВ МЕТОДОМ КЛІТИННОЇ СЕЛЕКЦІЇ

УДК 635. 21: 581.143.6

Н.А. Захарчук, кандидат біол. наук, Інститут картоплярства УААН
Т.М.Олійник, кандидат сільськогосподарських наук, ІПДО НУХТ

Отримано стійкі до фітотоксичних метаболітів (ФТМ) гриба *Phytophthora infestans* клітинні лінії і рослини-регенеранти. Розглянуто зв'язок стійкості *in vitro* та *in vivo*.

Cell lines and regenerants plants resistant to phytotoxic metabolites (PTM) of *Phytophthora infestans* were obtained. Relationship between *in vitro* and *in vivo* resistance have been considered.

Одним з актуальних напрямків у селекції картоплі на стійкість до інфекційних хвороб є впровадження методів біотехнології, а саме культури клітин і тканин. Застосування техніки клітинного і тканинного доборів в умовах *in vitro* при використанні відповідних селективних факторів дозволяє отримувати лінії картоплі з підвищеною стійкістю.

Методика досліджень. У роботі використовували пробіркові рослини картоплі контрастних щодо фітофторозу сортів: “Зов”, “Незабудка”, “Повінь” – сприйнятливі; “Кобза”, “Луговська”, “Обрій”, “Слов’янка” – відносно стійкі. Виділення стійких проти патогена регенерантів картоплі проводили на калусах із суспензійної культури листового і стеблового походження. Культивування здійснювали на штучних живильних середовищах для калусогенезу, регенерації і вирощування рослин [1].

В якості селективного фактору застосовували ФТМ гриба *Phytophthora infestans* [2]. Тестування регенерантів на стійкість проти фітофторозу проводили згідно з методикою Н.Коваль [3].

Результати досліджень. Результати досліджень щодо виділення ФТМ *Ph. infestans*, їх очистки, перевірки фітотоксичної активності, підбору максимально-критичних концентрацій і впливу на приріст маси калусної тканини картоплі задіяних сортів викладено в попередній публікації [2].

Наприкінці першого селективного добору (4–6 тижнів) частка калусів, здатних до росту, складала від 0,9 до 9,7% в залежності від

сорту та концентрації ФТМ *Ph. infestans*. Деякі з них (близько 5%) продовжували ріст при підвищенні концентрації селективного фактору в другому і третьому селективних циклах.

Після двох-трьох пасажів калуса в умовах селективного середовища стійкі експланти пересаджували на контрольне середовище (без ФТМ) і культивували протягом 4-6 тижнів для збереження їх регенераційної здатності. Повідомлення деяких дослідників [4] стверджують, що в разі сильного пресингу селективного фактору калусна тканина повністю втрачає морфогенетичні потенції, а тому доцільно використовувати переривчастий спосіб добору.

Для оцінки стабільності стійкості відібрані калуси повторно культивували на середовищі з ФТМ гриба (IV селективний цикл). При цьому вони поділялись на дві групи: у першій життєздатність була обумовлена адаптацією – ця група калусних ліній загинула; у другій – життєздатність, можливо, визначалась генетичними змінами, а тому ці лінії активно росли на селективному середовищі.

Після IV селективного циклу виділили: по 4 стійких клітинних лінії у сортах “Зов” і “Незабудка”, 6 - у с. “Повінь”, 13 - у с. “Кобза”, 14 – у с. “Обрій”, 25 - у с. “Слов’янка” та 43 у сорту “Луговська”.

Таким чином, на тканинному рівні одержали соматоклональні лінії, які несуть у своєму генотипі стійкість щодо ФТМ *Ph. infestans*. Проте слід зазначити, що не всі отримані лінії були здатні до регенерації. В ході тривалих селективних доборів деякі з них втратили морфогенетичну компетентність. Серед проаналізованих літературних джерел [5] не виявлено жодного випадку 100%-ї регенерації у всіх без винятку клітинних і калусних клонів. У наших дослідженнях серед стійких калусних ліній сорту “Луговська” до регенерації були здатні 36 ліній, с. “Слов’янка” - 12, с. “Кобза” та “Обрій” – 8 і 9 відповідно, с. “Незабудка” – 2, с. “Зов” і “Повінь” - по 1 лінії.

Проблема одержання рослин-регенерантів зі стійких клітинних і калусних ліній є однією з найбільш важливих і складних у клітинній селекції. Регенерація пагонів з таких клітин дуже ускладнена і частота утворення рослин низька [5, 6].

Результати досліджень регенерації рослин, проведеної в селективних умовах, показали, що підвищення концентрації токсичних метаболітів в середовищі знижувало кількість одержаних регенерантів.

Так, для сорту “Луговська” на контрольному середовищі одержали 118 регенерантів, на середовищі, яке містило 0,1 мг/мл ФТМ, – 102; 0,5 мг/мл – 89; 1,0 мг/мл – 67; 3,0 мг/мл – 49 і на середовищі з найвищою концентрацією 5,0 мг/мл - 42 рослини (Табл. 1).

Таблиця

Вихід рослин-регенерантів із суспензійної культури картоплі на селективному середовищі з різною концентрацією ФТМ

Варіант досліджу	Отримано рослин-регенерантів у сортах, шт						
	«Зов»	“Незабудка”	“Повінь”	“Кобза”	“Луговська”	“Обрій”	“Слов’янка”
МС (контроль)	49	98	21	48	118	68	75
МС + ФТМ мг/мл							
0,1	31	72	18	32	102	45	67
0,5	12	21	11	28	89	32	46
1,0	6	8	3	23	67	23	25
3,0	3	2	1	14	49	18	19
5,0	1	0	0	7	42	10	12

Серед одержаних рослин-регенерантів від 7 до 20% ліній (в залежності від сорту) мали нормальний морфологічний розвиток.

Одержані рослини-регенеранти розмножували живцюванням та оцінювали на стійкість щодо *Ph.infestans*.

Для штучного зараження ми використовували ізоляти раси 1.2.3.4.5.6.6.+0.7.8.9.10.11хуз, яка характеризується високою агресивністю і містить 11 генів вірулентності. Перед інфікуванням суспензію витримували 2-3 год. в холодильнику (при температурі 3-5° С) для стимулювання виходу зооспор.

Слід зазначити, що серед рослин-регенерантів, одержаних на контрольному і на селективних середовищах, спостерігали утворення ліній як з підвищеною стійкістю, так і більш сприйнятливі. Можливо, це пояснюється соматональною варіабельністю клітин під дією умов культивування *in vitro*.

Внесення фітотоксичних метаболітів гриба *Ph. infestans* в середовища призвело не лише до підвищення стійкості у рослин-регенерантів на 1-4 бали, але і до збільшення загальної кількості

стійких ліній порівняно до контролю. Так, на селективних середовищах спостерігали підвищення стійкості у 30,2% ліній, тоді як на контрольному – 21,6%. Проте абсолютно імунних форм картоплі щодо фітофторозу не виявлено.

На рівень стійкості рослин-регенерантів впливали також кількість і тривалість пасажів калусної тканини. У соматиклонів сортів “Незабудка”, “Обрій” і “Слов’янка”, одержаних після 15 пасажу, спостерігали повне ураження рослин фітофторозом у культурі *in vitro* (бал стійкості 1-2). Можливо, після 15 пасажу відображається фізіологічне старіння калусної тканини, що відбивається на послабленні імунної системи рослин. У регенерантів, отриманих з 5 по 11 пасажу калусу бал стійкості щодо *Ph. infestans* становив 5-8. Нами досліджено, що в цьому діапазоні знаходяться більш стійкі форми.

Лінії з підвищеною стійкістю оцінювали методом штучного зараження в польових умовах в 1999-2000 рр. лабораторно-польовим методом за методикою [3].

Обліки проводили три рази за період вегетації. Після узагальнень даних кожної з оцінок визначали середній індекс ураження фітофторою за період вегетації і за два роки.

Аналізуючи результати тестування щодо *Ph. Infestans*, слід відмітити, що стійкість, досягнута в культурі *in vitro*, не завжди зберігалась у польових умовах. Так, регенеранти сортів “Незабудка” і “Повінь” виявились нестійкими і були вибракувані. У рослин-регенерантів сортів “Зов”, “Кобза”, “Луговська”, “Обрій” і “Слов’янка” індекс ураження фітофторою становив від 5,3 до 33,7. Проте нам вдалось виділити лінії регенерантів сортів “Зов”, “Кобза”, “Луговська”, “Обрій”, “Слов’янка” які протягом двох років випробувань характеризувались низьким індексом ураження.

Висновки. Нами встановлено, що більш імунні форми одержано в діапазоні культивування калусної тканини 5-11 пасажів. При використанні клітинної селекції і селективного фактору (ФТМ гриба *Ph. Infestans*) були відібрані лінії картоплі з підвищеною стійкістю щодо фітофторозу порівняно з вихідними сортами. Встановлено, що ознака стійкості, набута в культурі *in vitro*, не завжди відповідає стійкості в умовах *in vivo* стосовно досліджуваних сортів.

Література

1. Олейник Т.Н., Захарчук Н.А. Использование суспензионной культуры клеток в селекции картофеля на устойчивость к заболеваниям // Вопросы картофелеводства: Науч. тр. ВНИИКХ.- М.,- 2001.- С. 299-303.
2. Захарчук Н.А., Олійник Т.М., Зайченко О.М. Клітинний добір у селекції картоплі на стійкість проти фітофторозу // Вісник Білоцерківського ДАУ.- Вип. 15.- 2001.- С. 52-60.
3. Коваль Н.Д. Методические рекомендации по оценке картофеля на фитотроустойчивость.- М.,- 1987. - 22с.
4. Chawla H.S., Wenzel G. In vitro selection for Fusaric acid resistant barley plants // Plant Breeding.- 1987.- № 99.- P.159-163.
5. Wenzel G., Kohler F., Schuchmann R. In vitro screening for disease resistance // British Crop protection conf. Pests and diseases. Proc., 1.- 1984.- P.199-201.
6. Binarova P., Nedelnic J., Fellner M., Nedbalkova B. Selection for resistance to filtrates of Fusarium spp. In embryogenis cell suspension culture of Medicago sativa //Plant Cell, Tissue and Organ Cult.- 1990.- 22, №3.- P.191-196.