

Т.І. Віцєня, науковий співробітник,
О. Ф. Сергієнко кандидат с.-г. наук,
Інститут овочівництва і баштанництва НААН

**ВПЛИВ ФІЛЬТРАТУ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ
ALTERNARIA RADICINA НА ІНДУКЦІЮ КАЛЮСУ
ТА РЕГЕНЕРАЦІЮ РОСЛИН МОРКВИ У КУЛЬТУРІ *IN VITRO***

*Наведено результати досліджень впливу фільтрату культуральної рідини *Alternaria radicina* M.D. et E. на калюсогенез і ембріогенез у культурі ізольованих тканин моркви протягом декількох пасажів. Виявлено сублетальні концентрації фільтрату досліджуваної рідини для соматичних калюсів, проведено добір резистентних калюсів. Одержано рослини-регенеранти з резистентних калюсів.*

Ключові слова: клітинна селекція, морква, фільтрат культуральної рідини, *Alternaria radicina*, калюсогенез, ембріогенез.

Вступ. Схильність коренеплодів моркви до значного ураження гнилями складає особливі труднощі в одержанні стабільно високих урожаїв моркви столової, збереження товарності, особливо ускладнює вирішення проблеми вирощування повноцінного здорового насіння. До найбільш розповсюджених і шкодочинних збудників грибних хвороб моркви відносяться гриби з роду *Alternaria*. В окремі роки хвороба спричиняє повну загибель коренеплодів, випадки насінників можуть досягати 40 %. Альтернаріоз моркви призводить до відмирання 70-80% листків, у результаті чого урожай коренеплодів знижується на 35-50% [1].

У зв'язку з цим, створення стійких форм, а у подальшому і сортів, є одним із успішних підходів для захисту від патогенів. Нові можливості для рішення цих питань відкриває біотехнологія, яка дає можливість скоротити строки селекції і знижує економічні витрати за рахунок використання культури ізольованих тканин і клітин. Провідне місце у даному випадку належить клітинній селекції, яка дає можливість в умовах *in vitro* проводити добір клітинних популяцій, стійких до селективного фактору, а потім регенерувати цілі рослини.

© Віцєня Т.І., Сергієнко О. Ф., 2012.

Нині в цьому напрямі досягнуто значних успіхів: створено лінії картоплі, стійкі проти фітофторозу, помідора – проти альтернаріозу, пшениці – проти септоріозу та ін. [2, 3, 4]. Є. А. Калашніковою та ін. (1998, 2001), в Росії розроблено схеми клітинної селекції моркви у калюсній та суспензійній культурах [5, 6]. Встановлено, що оптимальними концентраціями культурального фільтрату *Alternaria radicina* M.D. et E. для клітинної селекції у суспензійній культурі моркви є 30 - 50 %. Результати власних розробок свідчать про можливість добору в культурі *in vitro* калюсних ліній моркви, стійких до збудника чорної гнилі [7].

Важливою проблемою при дослідженні методів клітинної селекції є індукція морфогенезу і регенерація рослин у дібраних на селективному фоні ліній. Існують дані про те, що у резистентних ліній регенераційна здатність може бути зниженою [7, 8]. Вивчення впливу біотичних факторів на ріст клітин моркви, а також селекція стійких до хвороб клітинних ліній з наступною регенерацією з них резистентних рослин має теоретичне і практичне значення.

Мета. Дослідити вплив фільтрату культуральної рідини *Alternaria radicina* на індукцію калюсу та регенерацію рослин моркви у культурі *in vitro*.

Методика досліджень. Дослідження здійснювали у лабораторних умовах в лабораторії біотехнології, генетичних ресурсів і теоретичних основ селекції овочевих рослин ІОБ НААН протягом 2011-2012 рр.

Матеріалом для проведення досліджень були 5 перспективних для подальшої селекції генотипів моркви, отриманих із лабораторії селекції коренеплідних культур: сорт Памела (№ біотехнологічного каталогу 317), індухт-лінії Краплинка I₄ (б. к. 318) і Ярина I₄, (б. к. 319), складний гібрид F₁ (б. к. 320) і сорт Яскрава (б. к. 321). В стерильну культуру вводили по два коренеплоди кожного генотипу. Попередньо коренеплоди мили під проточною водою. Дезинфікували їх у ламінарному боксі в такій послідовності: рослинний матеріал занурювали у розчин 70% етилового спирту на 1 хв.; далі обробляли 2,6% розчином гіпохлориту натрію за експозиції 20 хв. та промивали матеріал не менше 5 разів стерильною дистильованою водою [9, 10].

Вісічки коренеплідів розміром 5 мм з кортикальної паренхіми, що включає флоему, ксилему і камбальні клітини, розміщували на середовищі B5 [11] з вмістом фітогормонів 0,2 мг/л 2,4 Д і 0,2 мг/л кінетину для індукції калюсогенезу. Для нарощування необхідної для проведення дослідження калюсної маси здійснювали 3 пасажі, кожен тривав 30 діб. На початку пасажу об'єм висаджуваних калюсів становив 125 мм³. Інтенсивність

наростання визначали за об'ємом калюсів у кінці кожного пасажу. Абсолютний приріст обчислювали за формулою:

$$V = V_1 - V_0,$$

де V – абсолютний приріст об'єму, мм³;

V_0 – початковий об'єм калюсу, мм³;

V_1 – кінцевий об'єм калюсу, мм³.

Для добору стійких до *Alternaria radicina* M.D. et E. калюсів моркви у культурі *in vitro* у четвертому пасажі до складу поживного середовища перед автоклавуванням додавали у якості селективного агента фільтрат культуральної рідини (ФКР) *Alternaria radicina*, який готували співробітники групи імунітету за стандартною методикою на середовищі Чапека [1].

Спочатку проводили попереднє випробування середовища з вмістом 30 % ФКР чорної гнилі. Дана концентрація фільтрату культуральної рідини виявилась критичною, всі калюсні клони у даному варіанті середовища через 5 діб мали некротичний вигляд. Після пересаджування на середовище без фільтрату культуральної рідини не мали ознак росту.

Вірулентність штама гриба *Alternaria radicina* через неоднорідність расового складу гриба за роками виявилась вищою у поточному році, тому вміст фільтрату культуральної рідини у селективних середовищах було зменшено порівнянно з даними співробітників інституту та інших авторів, де добір калюсних клонів проводили на середовищах з 30 і 50 % фільтрату культуральної рідини *Alternaria radicina* [5, 6, 7].

Отримані в результаті 3-х пасажів калюсні клони 5 генотипів висаджували на середовища:

– B5 – без фільтрату культуральної рідини (ФКР) *Alternaria radicina*;

– B5 – 10 % ФКР *Alternaria radicina*;

– B5 – 20 % ФКР *Alternaria radicina*.

Кожен варіант представляли 30 калюсів певного генотипу. Обліки здійснювали візуально після 30 діб культивування. Фіксували калюси без уражень, з некротичними зонами та повністю некротичні, а також їх об'єм.

Математичну обробку результатів проведено за існуючими методиками [12, 13].

Результати досліджень. Для здійснення досліджень введено в культуру *in vitro* і отримано соматичні калюси 5 досліджуваних генотипів.

Вивчення життєздатності калюсів у досліді з добору стійких до чорної гнилі калюсних клонів свідчить, що у контрольному середовищі калюси зеленого забарвлення становили в середньому 93,1 %, а з некротичними зонами – лише 6,9 % (табл. 1). На середовищі з 10 %

ФКР калюси зеленого забарвлення становили в середньому 23,6 %, спостерігали 49,2 % калюсних клонів з наявністю некротичної зони, яка становила 50 – 70 % об'єму калюсу, та 27,2 % повністю некротичних калюсних клонів.

На середовищі з 20 % ФКР частка зелених калюсів становила в середньому 20,0 %, частка калюсів з некрозами – 48,0 %, цілком некротичних – 32,0 %. Виявлено, що в межах кожного зразка спостерігали значну мінливість калюсних клонів за стійкістю проти фільтрату культуральної рідини *Alternaria radicina*, що дає можливість ефективного добору калюсних клонів за цією ознакою. Істотно вищу від середнього по досліді частку живих (зелених) калюсів відмічено у генотипів 318 і 319.

У 5-му пасажі зелені калюси та неушкоджені зони з частково некротичних калюсів розміщували на індукційному середовищі без ФКР чорної гнилі. У досліджуваних генотипів виявлено різну інтенсивність росту калюсів та післядію ФКР. Найвищу інтенсивність росту на середовищі з 10 % ФКР чорної гнилі у порівнянні з контролем мали калюси генотипів 318 і 319 (табл. 2). У цьому середовищі об'єм калюсів коливався від 1,7 % у генотипу 321 до 84,2 % у генотипу 318. На середовищі з 20 % ФКР чорної гнилі у генотипу 318 спостерігали найвищий приріст калюсу, який був на рівні 79,8% від контролю, і 40,6 % від контролю становив приріст калюсу у генотипу 319. Для генотипів 317, 320 і 321 вміст 20 % ФКР виявився критичним, приросту об'ємів калюсу не спостерігалось і всі вони загинули протягом наступного культивування у 5-му пасажі.

Середовище з 10% ФКР чорної гнилі забезпечувало достатнє інфекційне навантаження і давало можливість для добору, та вміст 20 % ФКР чорної гнилі у селективному середовищі забезпечило більш жорстке навантаження і можливість одержати життєздатні калюси.

Таким чином, експериментальні дані дозволяють виділити стійкі до ФКР чорної гнилі генотипи моркви.

З калюсів №№ 318 і 319, які виявили стійкість до ФКР чорної гнилі на клітинному рівні, одержали соматичні ембріоїди, а з них – рослини-регенеранти. Порівняння ембріогенної здатності контрольних калюсів і дібраних на ФКР виявило, що означений показник генотипу 318 був значно вищим, ніж у калюсів, які культивували на середовищі, що містило 20 % фільтрат культуральної рідини *Alternaria radicina* (табл. 3). У генотипу 319 з калюсів, культивованих на ФКР, регенерацію ембріоїдів взагалі не одержали, хоча у контрольному варіанті кількість їх становила $5,4 \pm 1,6$ шт./кал. Отже, виявлено суттєвий

вплив післядії ФКР чорної гнилі на ембріогенну здатність калюсів. З ембріодів зразка 318 у культурі *in vitro* регенеровано 50 рослин.

Висновки. Дослідження агресивності ФКР *Alternaria radicina* на калюсній культурі виявили суттєвий вплив фільтрату культуральної рідини *Alternaria radicina M.D. et E.* на життєздатність соматичних калюсних клонів, який дозволив провести скринінг калюсного матеріалу за цією ознакою. Виявлено також вплив культурального фільтрату на ембріогенну здатність соматичних калюсів після культивування на селективному середовищі, а у результаті додавання 20 % ФКР чорної гнилі дібрано 2 резистентні соматичні калюсні клони моркви. На одному з них вдалося одержати 50 рослин-регенерантів.

Бібліографія.

1. Сазонова Л. В. Корнеплодные растения: морковь, сельдерей, петрушка, пастернак, редис, редька / Л. В. Сазонова, З. А. Власова. – Л.: Агропромиздат, 1990. – С. 72–83.

2. Кукушкина Л. Н. Изучение и оценка регенерантов картофеля по устойчивости к фитофторе *in vitro* и *in vivo* / Л. Н. Кукушкина, А. А. Дорошенко // Использование клеточных технологий в селекции картофеля. – М., 1987. – С. 52–56.

3. Аврова А. О. Физиолого-биохимические особенности взаимодействия томатов с *Alternaria solani* и селекция *in vitro* на устойчивость к альтернариозу: автореф. на соискание науч. степени канд. биол. наук. / А. О. Аврова. – ВИРЗ, 1994. – 18 с.

4. Лети Джонс. Получение форм пшеницы (*Triticum aestivum*) устойчивых к грибу *Septoria nodurum* в условиях *in vitro*: автореф. на соискание науч. степени канд. биол. наук / Лети Джонс. – М., 1998. – 22 с.

5. Калашникова Е. А. Разработка методических подходов в клеточной селекции моркови на устойчивость к альтернариозу / Е. А. Калашникова, Н. Мбудри, В. А. Раскалиева // Известия ТСХА. - 1998. - № 1. - С. 112 - 119.

6. Раскалиева В. А. Использование методов биотехнологии в получении форм моркови, устойчивых к альтернариозу / В. А. Раскалиева, Е. А. Калашникова // Сельскохозяйственная биотехнология. Избранные работы. – М.: Воскресенье, 2001. – Т. 2. – С. 81 - 91.

7. Сергиенко О. Ф. Селекция моркови на устойчивость к альтернариозу в калусной культуре / О. Ф. Сергиенко, Е. М. Черненко // Генетика и селекция на рубеже XXI века: сб. работ молодых ученых. - Минск: ИПЭ, 1999. - С. 70-72.

8. Белянская С. Л. Морфогенез в клонах риса, резистентных к стрессовым факторам / С. Л. Белянская, З. Б. Шамина, Л. А. Кучеренко // Физиология растений. – 1994. – № 4. – С. 573 – 577.

9. Левенко Б. А. Клеточная селекция растений на устойчивость к стрессовым факторам: автореферат на соискание науч. степени д-ра биол. наук / Б. А. Левенко. – Киев, 1991. – 41 с.

9. Методика досліджень в культурі ізольованих тканин овочевих рослин / [В. П. Мірошніченко, О. Ф. Сергієнко, Т. В. Івченко, С. А. Гончарова, С. І. Кондратенко, Н. О. Баштан]. —Мерефа: ІОБ УААН, 2004. - 25 с

10. Сергієнко О.Ф. Методика мікроклонування селекційних зразків моркви / О. Ф. Сергієнко, В. Б. Баштан, Т. К. Горова. - Мерефа: ІОБ УААН, 2004. - 12 с

11. Gamborg O. L. Nutrients requirements of suspension culture of soybean root cells / O. L. Gamborg, R. A. Miller, K. Ojima // Experimental Cell Researches. – 1968. – Vol. 50. – P. 151-158.

12. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. - М.: Высшая школа, 1990. - С. 18-237.

13. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. - М.: Агропромиздат, 1985. - С.351.

Т. И. Виценья, О. Ф. Сергиенко

Влияние фильтрата культуральной жидкости *Alternaria radicina* на индукцию каллуса и регенерацию растений моркови в культуре *in vitro*.

Резюме. Приведены результаты исследований влияния фильтрата культуральной жидкости *Alternaria radicina* на каллусогенез и эмбриогенез в культуре изолированных тканей моркови в течение нескольких пассажей. Выявлены сублетальные концентрации фильтрата культуральной жидкости *Alternaria radicina* для соматических каллусов, произведен отбор резистентных каллусов. Получены растения-регенеранты из резистентных каллусов.

T. I. Vitsenja, O. F. Sergienko

Agency of a filtrate of culture fluid *Alternaria radicina* on induction of a callus and recuperation of plants of carrot in crop *in vitro*.

Summary. Outcomes of probes of agency of a filtrate of culture fluid *Alternaria radicina* on callusogenesis and an embryogenesis in crop of isolated tissues of carrot during several passages are resulted. Sublethal concentrations of a filtrate of culture fluid *Alternaria radicina* 4 somatic callus are revealed, takeoff of refractory callus is effected. Plants-regeneranty from refractory callus are received.

1. – Життєздатність калосів моркви у 4-му пасажі на середовищі з ФКР чорної гнилі %, 2011 р.

№ біотехнологічного каталогу	Без ФКР(контроль)			10 % ФКР			20 % ФКР		
	зелені калоси	калоси із некротичними зонами	некротичні калоси	зелені калоси	калоси із некротичними зонами	некротичні калоси	зелені калоси	калоси із некротичними зонами	некротичні калоси
321	100,0	0	0	0	50,0	50,0	0	87,5	12,5
320	100,0	0	0	10,0	80,0	10,0	0	55,4	44,6
319	100,0	0	0	25,0	75,0	0	26,7	73,3	0
318	100,0	0	0	76,9	23,1	0	73,3	20,0	6,7
317	65,7	34,3	0	6,0	18,0	76,0	0	4,0	96,0
Середнє	93,1	6,9	0	23,6	49,2	27,2	20,0	48,0	32,0

НІР_{0,05} для порівняння середніх за варіантами – 5,9 %.

2. – Приріст об'ємів калусів моркви у 5-му пасажі після культивування на середовищі з ФКР чорної гнилі, 2011р.

Зразок	Вміст ФКР у живильному середовищі					
	без ФКР (контроль)		10 % ФКР		20 % ФКР	
	мм ³	мм ³	мм ³	% до контролю	мм ³	% до контролю
321	1828,1±210,0	32,4±5,0	1,7		0	0
320	2500,1±135,0	151,3±30,4	6,1		0	0
319	4750,2±183,1	3055,3±211,0	83,3		1930,5±170,6	40,6
318	840,7±100,1	707,1±97,1	84,2		671,2±35,0	79,8
317	375,3±42,0	125,0±11,6	33,3		0	0
Середнє	2058,9	994,2	41,7		520,3	24,1

НІР_{0,05} для порівняння середніх за варіантами об'ємів калусів – 106,5 мм³

3. – Ембріогенна здатність соматичних калусів після культивування на селективному середовищі з додаванням ФКР *Alternaria radicina* шт./кал., 2012 р.

Зразок	Вихід ембріодів з 1 калосу на	
	В5 (контроль)	В5 з 20% ФКР <i>Alt. radicina</i>
318	15,3±2,1	3,4±0,9
319	5,4±1,6	0,0
НІР _{0,05}	4,5	