

**НОВІ ПІДХОДИ ДО СТВОРЕННЯ СТІЙКИХ ПРОТИ ПАТОГЕНІВ
КЛІТИННИХ ЛІНІЙ КАРТОПЛІ
УДК 635. 21: 581.143.6.**

**Н.А. Захарчук, кандидат біологічних наук, Інститут картоплярства
УААН**

Т.М.Олійник, кандидат сільськогосподарських наук, ІПДО НУХТ

Розроблено селективні середовища з використанням штучно синтезованих речовин в якості селективного фактора. В культурі in vitro отримано стійкі до даних речовин клітинні лінії та рослини-регенеранти.

Selective media are developed when artificial substances is used as a selective factor. Cell lines and regenerated plants resistant to given substances are obtained in in vitro culture.

Серед біотехнологічних напрямків особливу увагу привертає метод клітинної селекції. Він дає можливість розробити нові технології поліпшення сільськогосподарських рослин і значно підвищити ефективність селекційних робіт зі створення стійких проти патогенів сортів. У зв'язку з цим виникає проблема підбору селективних факторів, які б підвищували стійкість у культурі in vitro за умови збереження ознаки в бульбових поколіннях.

Методика досліджень. Об'єктами досліджень була калусна тканина листового і стеблового походження контрастних за стійкістю сортів картоплі: стійкі – “Віриня”, “Дубравка”; сприйнятливі – “Зов”, “Незабудка”. Суспензійну культуру отримували шляхом перенесення недиференційованого крихкого калуса на рідке живильне середовище Мурасіге-Скуга (МС) [1] і вирощували на качалці [2]. Для одержання клітинних ліній картоплі суспензійну культуру змішували з живильним середовищем у співвідношенні 1/5 і висівали в чашки Петрі. Колонії пересаджували на середовища для росту. Після того, як калуси досягали розмірів 8-10 мм, їх використовували в подальших дослідженнях у клітинній селекції. Кількість висаджених калусів для кожного сорту становила 100 експлантів.

В якості селективних факторів використовували штучно синтезовані речовини ДФСБ-11, ДБОР-2, ДЭКЭ-2 (автор П.Г. Дульнєв, Інститут біоорганічної хімії). Токсичність даних сполук перевіряли на ізольованих листових пластинках рослин картоплі. Листки розкладали

на фільтрувальному папері, а потім разом з папером переносили на скло, покрите вологою марлею, кінці якої занурювали в фотокувети з водою для постійного зволоження. Водні розчини речовин наносили на зворотну поверхню листків. Проявлення активності спостерігали через 8 діб. Оцінку проводили по шкалі: “-” – реакція відсутня, “+” – слабка, “++” – середня, “+++” – сильна, “++++” – дуже сильна реакція [3].

Результати досліджень. Селекцію картоплі на тканинному рівні розпочинали з відпрацьованих селективних концентрацій даних речовин, у межах яких проявляється різна життєздатність клітин (Табл.).

Речовини в концентраціях 0,05-0,5; 5-15% вносили в стерильне середовище МС шляхом фільтрування через мембранні фільтри Millex –YS з розміром пор 0,22 μm.

Вплив селективного фактора почали спостерігати через 7 діб після посадки калусної тканини. Дія речовин проявлялась у побурінні калусної тканини, зменшенні кількості життєздатних клітин. Слід зазначити, що дія використаних речовин впливала на сорти по-різному.

Таблиця

Дія різних концентрацій штучно синтезованих речовин на ізольовані пластинки листа картоплі

Концентрації речовин, %	Ступінь проявлення токсичності на 8 добу			
	Сорти			
	“Зов”	“Незабудка”	“Віриня”	“Дубравка”
ДФЦБ-11				
5	-	+++	-	-
10	++	++++	+	++
15	+++	++++	+++	+++
ДБОР-2				
5	-	-	-	-
10	+++	+++	++	++
15	++++	++++	+++	+++
ДЭКЭ-2				
0,05	+	+	-	-
0,1	+++	+++	++	++
0,5	++++	++++	+++	+++

В контролі (без селективного фактора) калуси сорту “Незабудка” мали яскраво-зелене забарвлення і гладеньку, з окремими щільними глобулами, поверхню, приріст калусної тканини складав 3-5мм. Калусні лінії на середовищах, що містили 10 і 15%-ну концентраціїДФСБ-11, повністю втрачали свою життєздатність. На середовищі з 5%-ною концентрацією даної речовини, приріст калусної тканини хоча і був дуже пригніченим, проте навіть після 3-го селективного циклу залишався зеленим, з поодинокими глобулами.

На середовищі з 5%-ною концентрацієюДБОР-2 ми спостерігали приріст маси калуса на 3 мм. Калусна тканина не втрачала забарвлення та компактності. 10%-на концентрація в середовищі призводила до повного пригнічення приросту калуса, проте він залишався зеленим, глобулярним, тоді як при 15%-на концентрація викликала повну загибель калусної тканини.

На контрольному середовищі у сорті «Зов» відмічали приріст калуса до 5 мм. Калусна тканина була крихкою, світло-зеленого забарвлення. 5%-на концентраціяДФЦБ-11 не мала токсичного впливу на життєздатність калусної культури. У калусів листового експланта спостерігали утворення окремих зелених зон з білим опушенням. При внесенні у середовище 10%-ної концентрації спостерігали пригнічення росту калуса і утворення поодиноких зелених глобул. Таку ж тенденцію спостерігали і при використанні найвищої концентрації – 15%. Проте частка калусів, здатних до росту після першого селективного циклу, була дещо нижчою і складала всього 1,3% від загальної кількості висаджених експлантів.

При використанні в якості селективного фактора речовиниДБОР-2 в 5%-ній концентрації ріст, забарвлення та консистенція калуса були ідентичні контролю. 15%-на концентрація призводила до повної загибелі калусних експлантів. Оптимальною виявилась 10%-на концентрація, при якій спостерігали незначний приріст калусної маси. На калусах листового експланта утворювались зони з білим опушенням, стеблового – поодинокі зелені глобули.

У сорті «Дубравка» в контролі спостерігали приріст калусної тканини до 8 мм, яка була крихкою, соковитою з сіро-зеленим забарвленням. Внесення 5%-ної концентраціїДФЦБ-11 у середовище фактично не впливало на приріст калуса та морфогенез. Цікаво зазначити, що 10%-на концентрація призводила до повної втрати

життєздатності калусної тканини, тоді як при застосуванні 15%-ної концентрації ріст калусів був пригнічений на 80-90%, проте на окремих з них формувались поодинокі морфогенні зони.

Калусна тканина на середовищі з речовиною ДБОР-2 в концентрації 5% була ідентична контролю. При внесенні в селективне середовище 10%-ної концентрації спостерігали пригнічення росту калуса на 50%. Колір варіював від зеленого до світло-коричневого. Оптимальною виявилась 15%-на концентрація. Приріст калусної тканини складав близько 10% порівняно до контролю. Калус набув коричневого забарвлення з поодинокими глобулярними зонами на експланті стеблового походження.

Для сорту «Віриня» в контролі спостерігали приріст калусної маси до 8 мм з характерним антоціановим забарвленням. При використанні речовин ДФЦБ-11 і ДБОР-2 оптимальною виявилась найвища концентрація - 15%. Приріст калусної маси в обох випадках був майже відсутній. Калуси були коричнево-зелені з ореолом антоціанового забарвлення, компактні, щільні. Експланти стеблового походження характеризувались глобулярністю.

Речовина ДЭКЭ-2 характеризувалась більшою токсичністю, тому її використовували в концентраціях: 0,05; 0,1 та 0,5%. Для сортів Зов і Незабудка сублетальна концентрація ДЭКЭ-2 становила 0,1%, за якої гинуло не менше 90% калусної тканини. Для сортів «Віриня» і «Дубравка» оптимальною виявилась 0,5% концентрація.

Висновки. В результаті проведених досліджень визначили максимально-критичні концентрації селективних речовин для кожного сорту. Після 3-4 селективних циклів одержали калусні лінії залучених сортів, що характеризувалися стійкістю до даних речовин.

На калусах усіх сортів спостерігали розвиток морфогенних зон. Через 2-3 пасажі на регенераційному середовищі на калусній тканині сортів «Віриня» і «Дубравка» утворювались пагоноподібні структури. У сорті «Незабудка» на середовищі з 5% і 10%-ними концентраціями ДБОР-2 отримали поодинокі рослини-регенеранти.

Література

1. Murashige T., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol.plant.* - 1962. – V.15. –N13.-P.473-497.
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. Stolle K., Schober B. Wirkung eines Toxins Von *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary aut Kartoffelknollengewebe // *Potato Research.* – 1984. –№ 27.-P.173-184.