

***ПРИГОТУВАННЯ ФІЛЬТРАТИВ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ ГРИБА
FUSARIUM SOLANI SACC. ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ В КЛІТИННІЙ
СЕЛЕКЦІЇ БАКЛАЖАНА НА СТІЙКІСТЬ ПРОТИ ФУЗАРІОЗНОГО
В'ЯНЕННЯ***

Т. В. Івченко, Г. В. Мозговська
Інститут овочівництва і баштанництва НААН

Досліджено різні способи отримання фільтратів культуральної рідини збудника фузаріозного в'янення *Fusarium solani* Sacc. Встановлено, що в дослідженнях з клітинної селекції баклажана оптимальними є добори на селективних середовищах з 40 або 50 % вмістом фільтратів культуральної рідини, культивованих на середовищі за прописом Річардсона

Баклажан, фільтрат культуральної рідини (ФКР), поживне середовище Чапека і Річардсона, культивування, токсичність

Баклажан відноситься до числа найбільш цінних овочевих культур завдяки високому вмісту в плодах заліза, сахарози (2,2–4,6 %), білку (0,6–1,4 %), жиру (0,1–0,4 %), клітковини (1–2 %), зольних речовин (0,4–0,7 %), води (91–94 %) [1]. Але в останні п'ять років виробництво та продуктивність цієї культури зазнає негативного впливу біотичних та абіотичних факторів, що позначається на зменшенні врожайності та якості продукції. Найбільш шкочинним захворюванням баклажана є фузаріозне в'янення, збудник якого сапрофітний паразит *Fusarium solani* Sacc., призводить до загибелі рослин внаслідок закупорення провідних судин рослин гіфами гриба. У боротьбі з фузаріозним в'яненням створення стійких сортів визнано найбільш ефективною стратегією [2], так як обмеження розвитку цієї хвороби за допомогою фунгіцидів не є ефективним. Крім того, деякі хімічно синтезовані фунгіциди можуть призвести до екологічного забруднення. Оскільки діяльність людини призвела до прискорення мікроеволюції патогенів, тому для селекції нових сортів активно залучати нові сучасні методи, в тому числі клітинну селекцію *in vitro*. Доступність достатньої генетичної мінливості і ефективні процедури добору – дві головні можливості, які забезпечує ця технологія. Велике значення для оцінки і добору стійких форм має пошук оптимального селективного фактору *in vitro*, пов'язаного з механізмом патогенезу *in vivo*. Він має велике значення для оцінки і добору. В науковій літературі представлено результати селекції стійких до фузаріозного

в'янення генотипів з використанням ФКР збудників хвороб [3]. Перспективність даного напрямку досліджень підтверджено вченими з Індії, створенням генотипів баклажана з підвищеною стійкістю проти фузаріозного в'янення [4], стійких сортів баклажана проти фомопсису [5] та вертицильозного в'янення [6].

Для успішного виконання роботи з клітинної селекції необхідно, насамперед, підготувати ФКР збудника та підібрати таку його концентрацію, яка б дозволяла виявляти чітку різницю у стійкості до селективного агенту різних ліній, але не призводила до летального впливу на клітини. Саме тому метою досліджень було розробити методіку приготування селективних середовищ з ФКР патогенних штамів *Fusarium solani* та визначити їх оптимальні концентрації у середовищах для проведення доборів стійких калосних клонів баклажана.

Методика проведення досліджень. Досліди виконували за загальноприйнятими біотехнологічними методами при використанні стандартного обладнання [7]. У дослідженнях використовували різний за рівнем толерантності до фузаріозного в'янення селекційний матеріал баклажана: районовані сорти Прем'єр і Алмаз, гібриди покоління F₄ з селекційного розсаднику ЮБ НААН та міжвидовий гібрид F₄ – ♀*S. melongena* L. / ♂*S. aethiopicum* gr. Gilo. Чисті культури *F. solani* отримували за стандартною методикою Білай [8]. Ідентифікацію збудників фузаріозного в'янення проводили за морфолого-культуральними ознаками (колір і характер росту міцелію, колір строми) та при мікроскопічному дослідженні з урахуванням морфологічних особливостей та розмірів макроконідій. З колекції ізолятів патогенів виділяли моноспоріві культури, які додатково розмножували 3 пасажі у чашках Петрі. Для приготування ФКР патогену у чашки Петрі з популяцією гриба додавали по 5 мл автоклавованої води, після чого за допомогою шпателя з поверхні середовища змивали конідії. Отриману суспензію в стерильних умовах фільтрували і проводили підрахунок спор під мікроскопом у камері Горяєва. Визначивши необхідну концентрацію конідій ($2 \cdot 10^7$ /мл), по 1 мл суспензії додавали до 200 мл рідких середовищ приготованих за прописом Чапека [8] та Річардсона [9], які інкубували 21 день у термостаті за температури 26 °С. Контролем слугували колби зі стерильною водою. Фітотоксичність одержаних на різних середовищах фільтратів проводили за рекомендаціями К. М. Черненко [10] на семидобових проростках різних за ступенем стійкості сортів баклажана: Прем'єр – сприйнятливий, Алмаз – стійкий. Повторність дослідів чотириразова, у кожній повторності по 50 насінин. Для оцінки токсичності фільтратів проростки 10 діб інкубували у чашках Петрі з додаванням одержаного на середовищах Чапека та Річардсона ФКР у концентраціях 25, 50 % та 100 % і на середовищах Чапека та Річардсона без патогену. В якості контролю слугувала дистильована вода. Культивування матеріалу проводили за температур 22 - 24 °С та денному освітленні. Щоденно відмічали життєздатність проростків, довжину кореня та ознаки прояву хвороби.

Оцінку впливу ФКР на калюсогенез проводили на чотирьох генотипах баклажана з різною польовою стійкістю до хвороби. В якості донорського матеріалу використовували сім'ядолі семиденних проростків, які висаджували на розроблене індукційне середовище Мурасиге-Скуга [11], модифіковане регуляторами росту (2 мл/л ІОцК і 4 мл/л БАП) без додавання ФКР (контроль) та з концентрацією селективного агенту 20 %, 40 %, 60 % від об'єму середовища. Культивування калюсів відбувалось за температури 22 - 24 °С та 16-годинного фотоперіоду за освітлення 2 тис. люкс. Вплив різних концентрацій ФКР визначали за морфометричними показниками розвитку калюсної тканини на селективних середовищах у відсотках до контролю та за показниками життєздатності експлантатів після чотирьох тижнів культивування.

Результати досліджень і їх обговорення. У результаті досліджень встановлено, що на 10 день після закладання досліду спостерігалась загибель значного відсотку проростків баклажана у варіантах з додаванням ФКР, тоді як на контролі (вода дистильована) та на варіантах 2 і 6 (середовища Чапека і Річардсона без ФКР) всі проростки були життєздатними (табл. 1). При інкубуванні насіння баклажану досліджуваних генотипів у нерозведеному фільтраті культуральної рідини проростки набували антоціанового забарвлення, корінці буріли (вар. 5 і 9) і на дев'ятий день дослідження загнивали і відмирили.

На варіантах з меншими концентраціями ФКР проростки були гетерогенними у чутливості до фільтрату. Найвищий відсоток життєздатних проростків спостерігався за використанням ФКР, одержаному на середовищі Чапека, від 37 % до 52 % за культивування при додаванні 20 % ФКР та 18,4 – 34,0 % при 50 % ФКР. У варіантах, де використовували фільтрати, одержані на середовищі Річардсона, відсоток життєздатних проростків був меншим – від 29 % до 43 % при додаванні 20 % ФКР та 14,0 – 22,0 при 50 % ФКР. Вплив фільтратів культуральної рідини гриба проявився також у пригніченні росту корінців у життєздатних проростків. На варіантах, де насіння пророщували на середовищах Чапека і Річардсона без фітопатогену довжина коренів проростків на 10 день становила $3,4 \pm 0,3$ – $3,6 \pm 0,3$ см і значно перевищувала аналогічний показник на контролі $2,2 \pm 0,2$ – $2,4 \pm 0,2$ см, що пояснюється використанням проростками для розвитку комплексу мінеральних речовин та вуглеводів, які входили до складу середовищ. Проростки використаних у досліді генотипів баклажана проявили також різну чутливість до ФКР. Для сприйнятливого сорту Прем'єр дія ФКР на середовищі за прописом Річардсона (варіанти 7-8) була більш токсичною, ніж для стійкого сорту Алмаз, що проявилось як у низькій життєздатності насінин (від 14 % до 29 %), так і у відставанні у розвитку корінців ($1,1 \pm 0,1$ – $1,4 \pm 0,1$ см). Рослини сорту Алмаз на середовищі Річардсона з ФКР мали вищі показники як за життєздатністю (від 22,0 % до 43,0 %), так і за довжиною корінців ($1,3 \pm 0,1$ – $1,6 \pm 0,1$ см), що співпадає з польовою оцінкою використаних генотипів до фузаріозного в'янення.

Таблиця 1

Вплив різних концентрацій ФКР, приготованих за прописами Чапека і Річарсона, на життєздатність і довжину корінців проростків баклажана через 10 діб культивування

№ вар.	Середовище для проростання насіння	Генотипи			
		Прем'єр		Алмаз	
		Життєздатних проростків, %	Довжина корінців проростків, см	Життєздатних проростків, %	Довжина корінців проростків, см
1	Вода дистильована (контроль)	100,0	2,2±0,1	100,0	2,4±0,2
2	Чапека без ФКР	100,0	3,4±0,3	100,0	3,6±0,3
3	Чапека з 25 % ФКР	37,0	1,6±0,2	52,0	1,9±0,2
4	Чапека з 50 % ФКР	18,4	1,3±0,1	34,0	1,6±0,1
4	Чапека з 100 % ФКР	0	0	0	0
5	Річарсона без ФКР	100,0	3,5±0,3	100,0	3,7±0,3
6	Річарсона з 25 % ФКР	29,0	1,4±0,1	43,0	1,6±0,1
7	Річарсона з 50 % ФКР	14,0	1,1±0,1	22,0	1,3±0,1
8	Річарсона з 100 % ФКР	0	0	0	0

При пророщуванні насіння сорту Алмаз з додаванням ФКР за прописом Чапека відсоток життєздатності був більше на 11 %, ніж на середовищі Річарсона, що свідчить про більшу фітотоксичність фільтратів використаних у варіантах 7 та 9 над фільтратами у варіантах 3 і 5 за прописом Чапека, для обох використаних в досліді генотипів.

На другому етапі досліджень проведено додаткову оцінку ефективності використання фільтратів одержаних на середовищах Чапека і Річарсона для добору в культурі *in vitro* за двохступінчастою схемою стійких проти ФКР *F. solani* соматоклонів баклажана.

Як показав експеримент (табл. 2), на контрольному варіанті досліді при використанні базового середовища МС, модифікованого регуляторами росту 2 мл/л ЮцК і 4 мл/л БАП, у всіх генотипів відмічалась індукція калюсогенезу з показниками ліміту мінливості ознаки від 862,3 ±3,15 до 1283,1±2,33 мм³, що підтвердило ефективність розробленої нами регенераційної системи для проведення клітинної селекції баклажана. На середовищах з додаванням ФКР фітотоксична дія фільтратів проявилась у зменшенні об'єму індукованої калюсної тканини у всіх досліджуваних генотипів та зниженні життєздатності експлантатів.

Отримані результати свідчать про гетерогенність сприйнятливості експлантатів використаних в досліді генотипів до дії ФКР. Так, реакція в умовах *in vitro* стійкого проти фузаріозного в'янення генотипу – міжвидового гібрида б. к. 13 (*S. melongena* L / *S. aethiopicum* gr. Gilo.) на присутність у середовищі ФКР патогену відповідала результатам польової оцінки - калюси цього генотипу були слабо сприйнятливими до дії низьких (20 %) і високіх концентрацій (40 % ФКР) у середовищі. За отриманими показниками життєздатності генотип б. к. 13 перевищував генотип західно-азійського походження б. к. 40. На середовищах з 20 і 40 % ФКР його експлантати були слабо сприйнятливими до дії селективного фактору. При культивуванні на селективному середовищі з 40 % ФКР цей генотип мав найбільші показники калюсогенезу: 853,2±5,16 мм³ на середовищі з ФКР за прописом Річардсона та 1100,3±5,22 мм³ на середовищі з ФКР за прописом Чапека. Експлантати генотипу б. к. 29 проявили себе як толерантні до дії ФКР. На селективних середовищах у цього генотипу спостерігалось значно більше зниження життєздатності: від 55,8 % до 61,3 % на середовищі з 20 % ФКР та від 34,8 – 54, 5 % на середовищі з 40 % ФКР, та невисокі темпи наростання біомаси калюсних клітин. Найбільшу чутливість до дії ФКР показав себе генотип східно – азійського походження б. к. 2, для якого культивування на всіх варіантах з ФКР виявились летальними. Висока концентрація фільтрату культуральної рідини у селективних середовищах - 60 %, виявилась летальною для всіх генотипів.

Сім'ядолі генотипів б. к. 29 та б. к. 40 поживкли вже на другому тижні культивування, а сім'ядолі генотипів б. к. 13 та б. к. 40 на четвертому тижні, після чого вони некротизувались і загинули.

Таблиця 2

Вплив різних концентрацій ФКР гриба *Fusarium solani*, одержаних за прописами Чапека і Річарсона на індукцію калюсогенезу з сім'ядольних експлантатів різних генотипів баклажана

Каталог генотипу	Походження генотипу	Варіанти	Середовище Чапека			Середовище Річарсона		
			життє-здатність, %	середній діаметр калюсу, мм ³	у % до контролю	життє-здатність, %	середній діаметр калюсу, мм ³	у % до контролю
Б. к. 13	міжвидовий гібрид	Без ФКР (контроль)	100	1283,1±2,33	100	100	1281,6±2,35	100
		20 % ФКР	92,1	1225,4±6,11	95,5	48,4	856,3±3,20	66,8
		40 % ФКР	64,2	810,5±5,14	63,2	34,3	764,8±4,82	59,7
		60 % ФКР	0	0	0	0	0	0
Б. к. 40	західно-азіатський	Без ФКР (контроль)	100	1251,4±5,23	100	100	1274,1±6,56	100
		20 % ФКР	94,3	1210,2±5,31	96,7	76,8	1101,7±7,25	86,5
		40 % ФКР	76,1	1100,3±5,22	87,9	32,3	853±5,16	66,9
		60 % ФКР	0	0	0	0	0	0
Б. к. 29	східно-азіатський	Без ФКР (контроль)	100	940,2±5,23	100	100	939,1±5,21	100
		20 % ФКР	84,1	576,2±6,11	61,3	54,2	523,6±6,23	55,8
		40 % ФКР	63,5	512,3±5,15	54,5	25,4	327,25±8,44	34,8
		60 % ФКР	0	0	0	0	0	0
Б. к. 2	східно-азіатський	Без ФКР (контроль)	100	862,3±3,15	100	100	861,2±3,16	100
		20 % ФКР	65,2	729,6±4,56	84,6	30,1	632,50±4,12	73,4
		40 % ФКР	56,1	343,3±4,13	39,8	21,3	249,0±4,15	28,9
		60 % ФКР	0	0	0	0	0	0

Такі результати дозволили зробити висновок, що найбільш оптимальним для використання в дослідженнях з клітинної селекції стійких до ФКР пробіркових рослин баклажана є добори на селективних середовищах з 40 % або 50 % вмістом підготовлених за прописом Річардсона ФКР.

Більш жорсткий скринінг експлантів всіх досліджених у досліді генотипів відбувався при використанні ФКР, виготовленого за прописом Річардсона, у порівнянні з ФКР за прописом Чапека. Відмінності спостерігались як за параметрами життєздатності, так і за розвитком калусогенезу. Середовище Річардсона відрізнялось від середовища Чапека збільшеним у ньому в п'ять разів вмістом N, P, K, Mg, заміненою сульфатної форми заліза на хлоридну, збільшеною у два рази концентрацією сахарози і амінокислот. За рахунок модифікації умов культивування патогенного гриба *F. solani* у середовищі Річардсона створювалися умови для покращення умов культивування конідиальної суспензії у культуральному середовищі, підвищенню синтезу мікроміцетом мікотоксинів, за рахунок чого було отримано ФКР із високими фітотоксичними якостями.

Висновки: Найбільш оптимальним для використання в дослідженнях з клітинної селекції є добори на селективних середовищах з 40 % або 50 % вмістом ФКР, культивованому на середовищі за прописом Річардсона.

Список використаних джерел

1. Magioli C. Eggplant (*Solanum melongena* L.): tissue culture, genetic transformation and use as an alternative model plant Acta bot. Bras / C. Magioli, E. Mansur. – 2005. – P. 19(1): 139-148.
2. Исходный материал для селекции озимой мягкой пшеницы на групповую устойчивость к фитопатогенам / Л. Т. Бабаянц, О. В. Бабаянц, А. А. Васильев [та ін.] // 36. наукових праць СГІ-НЦНС. – Одеса, 2007. – Вип. 9 (49). – С. 224-237.
3. 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.
4. 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.
5. Kalda T. S. Resistance to *Phomopsis* blight in eggplant / T. S. Kalda, K. Swarup, B. Chowdhury. - Veg. Sci., 1977. – P. 90–101.
6. Melo I. S. Resistance reaction of aubergine progenies to *Verticillium albo-atrum* Reinkes Berth / I. S. Melo, C. D. Costa. - Summa, 1985. – P. 180–185.

7. Методика досліджень в культурі ізольованих тканин овочевих рослин / [В. П. Мірошніченко, О. Ф. Сергієнко, Т. В. Івченко та ін.]. – Мерефа: ІОБ УААН, 2004. – 25 с.
8. *Билай В. И. Фузарию / В. И. Билай.* – К. : Наукова думка, 1977. – 443 с.
9. *Richard P. Richard's solution / P. Richard // Plant Pathologists Pocketbook,* 1968.
10. *Черненко К. М. Діагностика стійкості моркви проти чорної гнилі експрес-методом за насінням / К. М. Черненко // Зб. наукових праць УААН відділення рослинництва і переробки продукції.* – Аграрна наука, 1999. – С. 209-210.
11. *Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog.* – *Plant Physiology,* 1962. – P. 473-497.