

УДК 631.147:582.951.4

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИЗОЛЯТОВ ГРИБА *PHYTOPHTHORA INFESTANS* В КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ КАРТОФЕЛЯ

В.К. Каримова, Н.Л. Нечай, А.К. Есимсеитова, А.Н. Нурмаганбетова,
А.Ж. Измаганбетова, А.А. Какимжанова

РГП «Национальный центр биотехнологии», г. Астана, РК

Проблема селекции по созданию фитофтороустойчивых сортов картофеля сложна тем, что гриб имеет многочисленное число рас и среди них появляются новые, агрессивные и устойчивые к пестицидам, поражающие сорта, обладающие устойчивостью к другим расам. С помощью методов биотехнологии можно создавать новые формы картофеля с заданными полезными свойствами.

В результате проведенных исследований изучены токсичность и патогенность 6 изолятов гриба *Ph. Infestans*, выделенных из пораженных клубней картофеля с производственных хранилищ 3-х областей Казахстана. Высокую фитотоксическую активность наблюдали при использовании изолятов *Ph5*, *Ph4*, которые ингибировали рост корней на 44, 33%. По устойчивому сорту Латона изолят *Ph5* был средне агрессивным. Таким образом, выделены фитотоксичные и фитопатогенные изоляты *Ph5*, *Ph4*, которые использовали для клеточной селекции на устойчивость к фитофторозу.

Проведена лабораторная оценка 15 гибридов картофеля на устойчивость к фитофторозу. При использовании одноступенчатой селекции на устойчивость к фитофторозу оптимальными концентрациями КФ в среде для получения устойчивых каллусов были 10, 20%. Оптимальные концентрации для ступенчатой селекции на устойчивость к фитофторозу - 30, 50% КФ. Для получения регенерантов устойчивые каллусные линии к грибу *Ph.infestans* с эмбриоидами пересадили на среды МС для регенерации, затем микроклонально размножали.

Ключевые слова: картофель, *Phytophthora infestans*, фитофтороз, культуральный фильтрат, каллус, эксплант, клеточная селекция.

ВВЕДЕНИЕ

Картофель в качестве продовольственной культуры потребляют более 3-х млрд. человек населения планеты, и его выращивают в 150 странах мира. Одна из проблем производства картофеля состоит в том, что он в значительной степени поражается вирусными, бактериальными и грибными заболеваниями и вредителями [1].

Восприимчивость картофеля к болезням и вредителям сделала его культурой номер два в мире по использованию пестицидов. Современные сорта должны обладать комплексной устойчивостью к вирусным заболеваниям, к фитофторозу, колорадскому жуку и к цистообразующим нематодам. Кроме того, в каждой конкретной зоне возделывания картофеля существуют патогены локального значения.

Фитофтороз (возбудитель – *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary), несмотря на длительную историю изучения со времени появления его в Европе в 1845 году, не стал менее вредоносным. Болезнь и сегодня приносит ощутимые потери во всех картофелеводческих странах мира [2]. Ежегодный недобор урожая от этого заболевания и затраты на борьбу с ним в настоящее время оцениваются примерно в 3 млрд. долларов [3].

Оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) deBary – возбудитель фитофтороза картофеля и томата – уже более полутора столетий привлекает пристальное внимание исследователей из разных стран. Внезапно появившись в Европе в середине XIX столетия, он вызвал эпидемию картофеля, оставшуюся в памяти многих поколений. До сих пор его часто называют «гриб ирландского голода». В годы эпифитотий продуктивность растений без применения защитных средств снижается в 2–3 раза и более, а приемлемый уровень контроля заболевания может быть обеспечен только при увеличении числа обработок. По мнению отечественных фитопатологов, в основе неудач борьбы с заболеванием лежат, прежде всего, опережающие изменения, происходящие в биологии возбудителя, в его высокой пластичности и адаптивности, усилении агрессивных свойств. Это выражается в более раннем начале эпифитотий, в уменьшении продолжительности инкубационного периода в тканях растения-хозяина, в меньшей зависимости от факторов внешней среды, что приводит к увеличению числа генераций патогена в течение вегетации. Следствием этого является существенное нарастание скорости заболевания и инфекционной нагрузки на посадки картофеля [2, 4].

Так, *P.infestans* в настоящее время поражает картофель на протяжении всего периода вегетации, начиная с момента появления всходов до естественного отмирания ботвы. В последние 10–15 лет первые признаки

фитофтороза отмечаются на 20–30 дней раньше обычного (конец мая – первая половина июня), причем одновременно на сортах всех групп спелости и устойчивости. Кроме того, начальные симптомы болезни чаще стали проявляться на верхних листьях и стеблях, и только затем на средних и нижних [2]. Эта особенность в развитии возбудителя сделала его еще более вредоносным, поскольку гибель верхних, наиболее функционально активных тканей растений снижает их продуктивность в несколько раз сильнее, чем физиологически ослабленных.

Проблема селекции по созданию фитофтороустойчивых сортов картофеля сложна тем, что гриб имеет многочисленное число рас, и среди них появляются новые, более агрессивные и устойчивые к пестицидам, которые поражают сорта, обладающие устойчивостью к другим расам [5, 6]. Grünwald N.J. с соавторами идентифицировал 568 изолятов гриба *Phytophthora infestans*, выделенных в Центральной Мексике с помощью молекулярного анализа. Определили, что они генетически дифференцированы в зависимости от среды обитания [7]. Кроме этого, главная опасность фитофторы обусловлена ее высокой вариабельностью и внутривидовой изменчивостью в зависимости от окружающей среды [8].

Внедрение устойчивых сортов является основным звеном в системе мер защиты картофеля от фитофтороза. Прежде всего, это связано с задачей охраны окружающей среды от загрязнения химическими средствами защиты и повышением рентабельности картофелеводства. На сегодняшний день для выведения новых устойчивых к болезням сортов картофеля, наряду с традиционными методами селекции, используют биотехнологические методы [9]. Ограниченные возможности используемых земельных и водных ресурсов, стремительный демографический рост населения и растущие нагрузки на окружающую среду побуждают делать упор на использование биотехнологии, как основу для развития сельского хозяйства. Биотехнологические исследования имеют ключевое значение для создания и внедрения новых сортов сельскохозяйственных культур с повышенной урожайностью и продуктивностью.

В последние годы для получения новых сортов растений, устойчивых к болезням, вирусам, вредителям, отличающихся высокой урожайностью и продуктивностью, высокими питательными свойствами, все больше используются нетрадиционные технологии, такие как генная и клеточная биотехнологии [10, 11]. С помощью методов биотехнологии можем создавать новые линии и формы картофеля с заданными полезными свойствами. Растения, регенерированные из клеточных культур, отличаются от исходных форм, т.е. несут генетическую изменчивость, приобретенную в процессе культивирования *in vitro* [12, 13]. Исследователи изучили, что существуют специфические наследуемые метаболические изменения, которые связаны с факторами стресса при прохождении клеток огурца через *in vitro*. Растения-регенеранты огурца, полученные из каллусной культуры, подверглись наследственным изменениям и это подтвердилось ПЦР-анализом [14].

Aversano R. с соавторами (2009) выявили степень вариабельности уровня ядерной и цитоплазматической ДНК в растениях-регенерантах, принадлежащих к генотипу *Solanum*, с различными генетическими фонами и соматическим числом хромосом. При изучении ядерной ДНК 45 растений-регенерантов вида *Solanum* с помощью 13 ISSR праймеров обнаружили, что 66 локусов (18,5%) были полиморфными. Регенеранты, полученные из клонов smm 1Т, неустойчивые в культуре *in vitro*, подверглись сильной соматической вариации, по сравнению с другими регенерантами [15].

Каллусные культуры гороха разных генотипов (мутанты P-9, W-1 и сорт Viola) были использованы для регенерации растений. Регенеранты изменялись в качественном и количественном отношении. Наиболее заметные морфологические изменения и полная стерильность наблюдались у регенерантов сорта Viola. Для оценки генетических различий регенеранты и первоначальные линии анализировались с использованием RAPD и ISSR маркеров. Генетические различия регенерантов по сравнению с исходной формой отличались, у регенеранта W-1 составило не больше 1% по сравнению с исходной формой, у регенеранта P-9 – от 0,7 до 5,3%, у стерильного регенеранта сорта Viola – от 10 до 15% [16].

Разработаны протоколы в клеточной селекции томата, улучшающие хозяйственно-биологические свойства при создании стрессоустойчивых сортов. Морфогенетическая способность томатов сильно зависела от регулятора роста растений PGRs, которая добавлялась в питательную среду [17].

Для получения новых форм ячменя, устойчивых к алюминию и засухе, провели отбор каллусных культур ячменя с селективных сред, лимитирующих стрессовые условия. Растения-регенеранты ячменя, полученные из селективных систем, отличались от контрольных растений более высоким содержанием хлорофилла и каротиноидов, эффективно использовали воду и отличались высокой продуктивностью [18]. В результате исследований использование местных штаммов гриба *Phytophthora infestans* позволит получить ценные формы картофеля, устойчивые к фитофторозу, которые будут идентифицированы и паспортизированы с помощью молекулярно-генетического анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследований для получения растений-регенерантов картофеля использовали 21 гибрид казахстанской селекции, которые переданы селекционерами КазНИИКО: 2-10-09, 6-10-03, 9-10-03, 2-10-12, 22-10-11, 26-10-07, 9-10-04, 15-09-2, 23-10-03, 2-10-06, 4-10-01, 23-10-10, 18-10-03, 21-10-06, 21-10-

03, 18-10-02, 26-09-03, 23-10-01, 29-10-03, 23-10-02, 23-10-12. Гибриды отличались между собой по морфологическим особенностям, по форме, окраске, коже клубня, по окраске и глубине залегания глазков клубня. В качестве фитопатогенного материала использовали 6 выделенных изолятов гриба *Ph.infestans* (*Phytophthora infestans*) с больных клубней.

Для выявления возбудителя фитофтороза использовали больные клубни картофеля, которые помещали во влажную камеру на 4-5 дней при температуре 18-20°C. Через 4-5 дней с ломтиков клубней образованный мицелий культивировали на следующие питательные среды: 1) овсяная среда (овсяная крупа – 100 г, агар – 10 г, дистиллированная вода – 1000 мл); 2) овсяно-гороховая среда (овсяная крупа – 100 г, замороженный зеленый горошек – 250 г, агар – 20 г, сахара – 10 г, дистиллированная вода – 1000 мл); 3) агаровая среда (агар – 20 г, дистиллированная вода – 1000 мл). Идентифицировали возбудителей фитофтороза с помощью микроскопического анализа. Использовали для идентификации микроскоп Micros Austria с компьютерным изображением (Anti-Mould CCD Camera).

Для получения культурального фильтрата (КФ) гриба *Ph.infestans* культивировали изоляты на жидкую питательную среду Хелла, содержащую KH_2PO_4 – 0,5 г, MgSO_4 – 0,25 г, FeSO_4 – 0,01 г, глюкоза – 25 г, аспарагин – 0,5 г, тиамин – 0,002 г, рибофлавин – 0,002 г в состоянии покоя при t 18-20°C в течение 30 дней. Затем отфильтровали культуральную жидкость и автоклавировали при 120°C в течение 30 минут.

Определяли фитотоксическую активность изолятов гриба *Ph.infestans*. Для этого предварительно продезинфицированные 96% этиловым спиртом семена томатов восприимчивого сорта Ляна (по 20 шт. для каждого варианта) замачивали в дистиллированной воде в течение 24 часов [19]. Чашки Петри с семенами закрывали и инкубировали в термостате при температуре 18-20°C в течение 5 суток. Через 5 дней проростки семян погружали в фильтрат культуральной жидкости изолятов гриба *Ph. Infestans* и выдерживали в нем в течение 2-х часов. Затем проростки инкубировали при 18-20°C в темноте. Через 48 часов измеряли длину корней проростков. Фитотоксическую активность культурального фильтрата (ФАКФ) рассчитывали по степени ингибирования роста корней, используя формулу:

$$\text{ФАКФ (\%)} = 100 - (\text{Дх/Дк} \cdot 100),$$

где Дх – средняя длина корней через 48 ч. в опыте;

Дк – средняя длина корней проростков через 48 ч. в контрольном образце.

Токсичными принято считать культуральные жидкости, вызывающие 30% снижение учитываемых показателей. Отрицательные значения ФАКФ означают стимуляцию роста корней.

Определяли фитопатогенность изолятов гриба *Ph.infestans*. Для этого предварительно готовили суспензию конидий изолятов гриба *Ph.infestans*. В чашку Петри с мицелием гриба наливали стерильную дистиллированную воду, слегка стряхивали и сливали в колбу. Под микроскопом определяли количество конидий в суспензиях. Необходимо, чтобы суспензии имели не менее 20-30 конидий в поле зрения микроскопа при малом увеличении.

В чашки Петри с фильтровальной бумагой помещали по два ломтика клубней картофеля устойчивого и неустойчивого сорта толщиной 1,5-2 см. В каждый ломтик через надрез стерильной пипеткой вносили суспензию конидий изолятов гриба *Ph.infestans*. Затем помещали в термостат при температуре 20°C. Через 7 суток проводили учет поражения, отмечали размеры поражения, интенсивность спороношения и агрессивность изолятов гриба *Ph.infestans*.

Проводили оценку устойчивости картофеля к фитофторозу по отделенным листьям. Предварительно у листьев отделяли верхнюю часть, состоящую из трех-четырех долек. На нижнюю сторону долек листа наносили по одной капле суспензии. После нанесения инокулюма на листья чашки Петри закрывали и ставили на освещенное место при температуре 18-22°C. Результаты поражения определяли через 6 сут. Учитывали наличие поражения по шкале (таблица 1).

Таблица 1. Шкала оценки устойчивости к фитофторозу листьев картофеля

| Интенсивность спороношения | Устойчивость, балл | Степень устойчивости |
|--|--------------------|-----------------------------------|
| Отсутствие спороношения | 9 | Очень высокая устойчивость |
| Единичные конидиеносцы | 8 | Высокая устойчивость |
| Спороношение занимает до 25% площади листа | 7 | Относительно высокая устойчивость |
| Спороношение занимает от 25 до 50% площади листа | 5 | Средняя устойчивость |
| Спороношение занимает от 50 до 75% площади листа | 3 | Низкая устойчивость |

| | | |
|---|---|---------------------------|
| Спороношение занимает свыше 75% площади листа | 1 | Очень низкая устойчивость |
|---|---|---------------------------|

Для получения каллусной культуры использовали сегменты листьев, стеблей растений картофеля. Каллус выращивали в темноте при t 22-25°C и 70%-ной относительной влажности воздуха. Пассирование каллуса на свежую питательную среду МС осуществляли через каждые 30-40 дней.

Использовали этапы однократной и многократной клеточной селекции для получения каллусных линий картофеля, устойчивых к КФ гриба *Ph.infestans*. При однократной клеточной селекции культивировали экспланты сразу на среду МС с КФ гриба *Ph.infestans* в следующих концентрациях – 5; 10; 20; 30%. При многократной селекции на устойчивость к фитофторозу использовали следующие схемы клеточной селекции – МС→МС+5%КФ, МС→МС+10%КФ, МС→МС+20%КФ, МС→МС+30%КФ, МС→МС+50%КФ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе эксперимента проводили сбор пораженных клубней картофеля с производственных хранилищ для выделения возбудителя фитофтороза. 2011 год был благоприятным по погодно-климатическим условиям для развития и распространения фитофтороза на растениях картофеля. Для определения поражения болезнями клубней продовольственного картофеля из Акмолинской, Карагандинской и Павлодарской областей были отобраны точечные пробы клубней картофеля. Точечная проба каждого мешка продовольственного картофеля составила 6 клубней, которые были взяты из мешка сверху, в середине и снизу. Из 248 мешков продовольственного картофеля отобрано 1487 клубней, которые проанализированы на грибную инфекцию. При внешнем осмотре отобранные клубни были поражены паршой, сухой фузариозной гнилью и фитофторозом. Процент поражения грибными болезнями по трем областям в среднем составил 25,7%.

Проанализировано 1487 клубней из точечной пробы, из них здоровые – 1187, поражены паршой – 178 (12%), сухой фузариозной гнилью – 74 (5%), фитофторозом – 48 клубней (3,2%). Наибольший процент поражения фитофторозом в Акмолинской области составил 4,4%. Средний процент поражения клубней фитофторозом по трем областям составил – 3,2%. Это выше нормы, что допустимо на основании ГОСТ 7176-85 «Картофель свежий продовольственный заготавливаемый и поставляемый. Технические условия». При заготовках партий позднего картофеля в районах распространения фитофторы допускается наличие клубней, пораженных болезнью, не более 2%. Также партии, содержащие 2-5% зараженных клубней, можно хранить не более 3 месяцев, более 5% - не подлежат длительному хранению. Таким образом, процент поражения клубней продовольственного картофеля фитофторозом превысил нормы и составил 3,2%, допустимо по ГОСТУ - не более 2%, приводящей к гниению в период хранения.

При внешнем осмотре на клубнях картофеля, пораженных фитофторозом, отмечались твердые, слегка вдавленные пятна неправильной формы, окрашенные в бурый цвет. От поверхности клубня пятно распространялось вглубь ткани в виде затеков, мякоть приобретала ржаво-коричневый цвет (рис. 1).

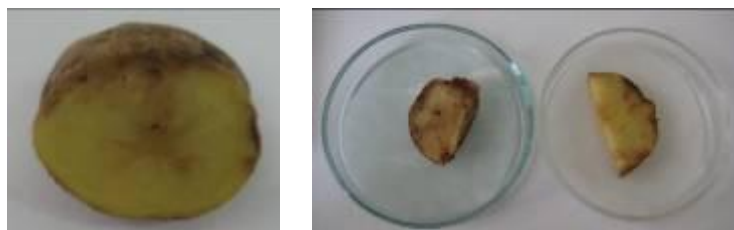
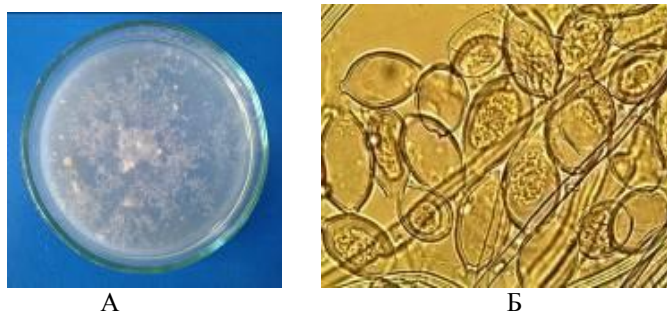


Рис. 1. Клубни картофеля с признаками заражения фитофторозом

Культурально-морфологические признаки 6-ти изолятов были типичными для *Ph. Infestans*. Изоляты *Ph. infestans*. на агаризованной овсяной среде формировали колонии округлой формы, равномерно растущие во всех направлениях, окраска воздушного мицелия белая, реверс был не окрашен. Мицелий стелился по поверхности питательной среды, образуя паутиноистые налеты тесно сплетенных гиф (рис. 2).



А – чистая культура, 14 сут; Б – микроструктуры *Ph. infestans* x 1000
Рис. 2. Культурально-морфологические признаки изолята гриба *Ph. infestans*

Микроскопическое исследование изолятов гриба показало: мицелий несептированный бесцветный, образуются хламидоспоры и хламидоспороподобные тела. Спорангиеносцы длинные или короткие, монопоидально или неправильно разветвленные, ветви, способные к возобновлению роста с характерными, четко видными субконициальными коническими вздутиями, остающимися в местах отчленения зооспорангиев. Зооспорангии обильные, бесцветные, лимонovidные, овальные, слегка суживающиеся у основания, одноклеточные с сосочковидным бугорком на вершине, размером 28x18 (56x29) мкм.

Для получения КФ изолятов гриба *Ph. infestans* проведен подбор питательной среды. Использовали жидкие питательные среды Чапека, Хелла и среду на овсяном отваре. Наиболее оптимальной для роста и развития гриба *Ph. infestans* была среда Хелла, на этом варианте получены хорошо сформировавшиеся, интенсивно развитые колонии. Данный вариант среды использовали для получения КФ гриба *Ph. infestans*.

Культивировали изоляты гриба *Ph. infestans* при температуре 18-20°C, в течение 30 суток при рассеянном свете в состоянии покоя для интенсивного накопления биомассы гриба в культуральной среде. В результате исследований получено 12 литров КФ гриба *Ph. infestans*, которые использовали для определения фитотоксичности изолятов гриба и в клеточной селекции картофеля на устойчивость к фитофторозу.

Проведен эксперимент по определению токсичности КФ шести изолятов гриба *Ph. infestans* методом биопроб с целью отбора наиболее токсичного изолята. Токсичными принято считать культуральные жидкости, вызывающие 30%-ное снижение учитываемых показателей. Для определения фитотоксичности шести изолятов гриба *Ph. infestans* использовали культуральную жидкость, где семена томатов проращивали (рис. 3). Через 48 часов измеряли длину корней проростков.

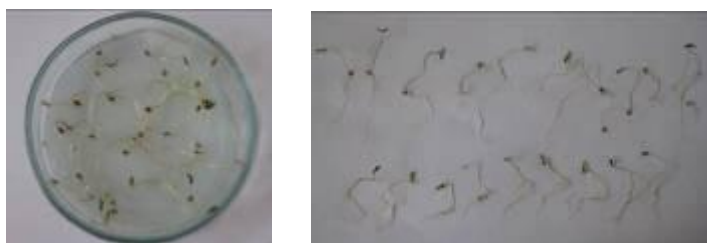


Рис. 3. Проращивание семян томатов в культуральной жидкости

Средняя длина корней в зависимости от изолята варьировала от 2,4±0,12 до 3,6±0,20 см (табл. 2). Фитотоксическую активность культурального фильтрата (ФАКФ) рассчитывали по степени ингибирования роста корней. ФАКФ на степень ингибирования корней варьировала от 16 до 44% в зависимости от изолята гриба. Высокую фитотоксическую активность наблюдали при использовании изолятов *Ph5*, *Ph4*, ингибирующие рост корней на 44, 33%. Токсичные изоляты гриба *Ph5*, *Ph4* в дальнейшем использовали в клеточной селекции картофеля на устойчивость к фитофторозу.

Таблица 2. Действие КФ изолятов гриба *Phytophthora infestans* на развитие корней проростков томата

| Изолят | Средняя длина корней, см | ФАКФ на степень ингибирования корней, % |
|------------|--------------------------|---|
| Контроль | 4,3±0,22 | - |
| <i>Ph1</i> | 3,6±0,20 | 16 |
| <i>Ph2</i> | 3,3±0,18 | 23 |
| <i>Ph3</i> | 3,6±0,15 | 16 |
| <i>Ph4</i> | 2,9±0,17 | 33 |

| | | |
|--|----------|----|
| <i>Ph5</i> | 2,4±0,12 | 44 |
| <i>Ph6</i> | 3,0±0,14 | 30 |
| Примечание: ФАКФ - фитотоксическая активность культурального фильтрата | | |

В результате исследований определяли фитопатогенность 6 изолятов гриба *Ph.infestans* суспензией зооспор на зараженных ломтиках клубней двух сортов картофеля Латона (устойчивый) и Романо (восприимчивый).

Из таблицы 3 видно, что по устойчивому сорту Латона размеры поражения фитофторозом варьировали от 2,0 до 4,0 мм в зависимости от изолята гриба. По изоляту *Ph5* размер поражения составил 4,0 мм, интенсивность спороношения – 2 балла, был средне агрессивным. Пять изолятов по отношению к ломтикам клубней сорта Латона были менее агрессивными, кроме изолята *Ph5*.

По восприимчивому сорту Романо размеры поражения фитофторозом варьировали от 4,0 до 7,8 мм в зависимости от изолята гриба *Ph.infestans*. Наибольшие размеры поражения вызывали изоляты *Ph5* – 7,8 мм, *Ph2* – 6,0 мм, *Ph4* – 6,0 мм, интенсивность спороношения – 3 балла, были агрессивными. Три изолята *Ph1*, *Ph3*, *Ph6* по отношению к ломтикам клубней картофеля сорта Романо были средне агрессивными.

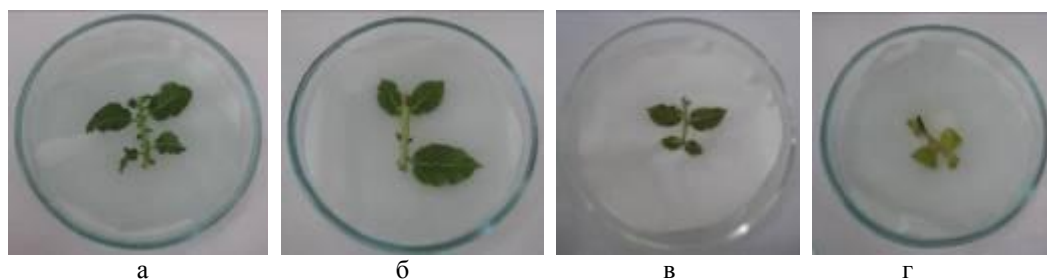
Таблица 3. Определение патогенных свойств изолятов гриба *Ph.infestans* на ломтиках клубней картофеля

| Вариант опыта | Размеры поражения, мм | Интенсивность спороношения, балл | Агрессивность |
|---------------|-----------------------|----------------------------------|--------------------|
| Сорт Латона | | | |
| Контроль | 1,5 | - | |
| <i>Ph1</i> | 2,0 | 1 | Менее агрессивный |
| <i>Ph2</i> | 3,7 | 1 | Менее агрессивный |
| <i>Ph3</i> | 2,3 | 1 | Менее агрессивный |
| <i>Ph4</i> | 2,7 | 1 | Менее агрессивный |
| <i>Ph5</i> | 4,0 | 2 | Средне агрессивный |
| <i>Ph6</i> | 2,0 | 1 | Менее агрессивный |
| Сорт Романо | | | |
| Контроль | 1,5 | - | |
| <i>Ph1</i> | 4,0 | 2 | Средне агрессивный |
| <i>Ph2</i> | 6,0 | 3 | Агрессивный |
| <i>Ph3</i> | 4,0 | 2 | Средне агрессивный |
| <i>Ph4</i> | 6,0 | 3 | Агрессивный |
| <i>Ph5</i> | 7,8 | 3 | Агрессивный |
| <i>Ph6</i> | 5,3 | 2 | Средне агрессивный |

Следовательно, при сравнении шести изолятов гриба на проявление патогенных свойств на ломтиках клубней показано, что изоляты *Ph5*, *Ph2*, *Ph4* по восприимчивому сорту Романо сильнее угнетали растения. По устойчивому сорту Латона только изолят *Ph5* был средне агрессивным. Таким образом, изолят *Ph5* был фитопатогенным по отношению к клубням картофеля.

В результате исследований провели оценку устойчивости к фитофторозу 15 гибридов картофеля казахстанской селекции (рис. 4). Для этого использовали части листа картофеля, состоящего из трех-четырёх долек. Затем на нижнюю сторону долек листа наносили по одной капле суспензии. Через 6 сут. определяли степень поражения, характеристику устойчивости по шкале, приведенной в таблице 1.

Гибрид 21-10-12 был относительно высоко устойчивым, спороношение заняло 25% листа. Низко устойчивым (3 балла) к фитофторозу был гибрид 22-10-11. Четыре гибрида 15-09-2, 9-10-03, 18-10-02, 29-10-03 не были устойчивыми к фитофторозу, размер пятна варьировал от 9 до 12 мм.



а – гибрид 23-10-10 (очень высоко устойчивый); б – 2-10-12 (относительно высоко устойчивый);
в – 22-10-11 (низко устойчивый); г – 15-09-2 (очень низко устойчивый)

Рис. 4. Оценка устойчивости гибридов картофеля к фитофторозу

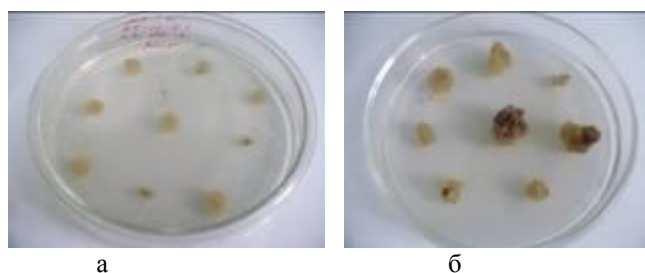
Следовательно, из 15 гибридов картофеля высоко устойчивыми являлись 9 гибридов, не устойчивые гибриды: 22-10-11, 15-09-2, 9-10-03, 18-10-02, 29-10-03.

При проведении эксперимента для получения каллусных линий картофеля, устойчивых к КФ гриба *Ph.infestans*, использовали одноступенчатую и многоступенчатую селекцию (рис. 5). Для этого использовали разрезанные на сегменты листья и стебли пробирочных растений гибридов, которые культивировали на питательной среде МС и на селективной среде МС с различными концентрациями КФ гриба *Ph.infestans*. Для отбора каллусных линий, устойчивых к КФ, культивировали 795 эксплантов на селективные среды. В качестве материала использовали пять гибридов, неустойчивых к фитофторозу.

В зависимости от увеличения концентрации токсичного КФ в питательной среде МС процент каллусообразования снижился, например, по гибриду 9-10-03 на 10% КФ каллусогенез составил 73,0%, начиная с 20% КФ наблюдали резкое снижение до 47,6%. По 4 анализируемым гибридам: 9-10-03 – 47,6%; 2-10-12 – 50%; 29-10-03 – 56%; 15-09-2 – 53,3% при использовании 20% КФ наблюдали снижение роста каллусной ткани почти в два раза по сравнению с контролем.

Из рисунка 6 видно, что процент каллусогенеза в среднем по шести гибридам на МС составил 95,6%; 5% КФ – 96,4%; 10% КФ – 75,0; 20% КФ – 55,3%; 30% КФ – 26,6%. При культивировании эксплантов на 5% КФ наблюдали стимуляцию роста каллусов. Следовательно, оптимальными концентрациями КФ для получения устойчивых каллусных линий являются 10, 20%. На 30% КФ процент растущих и выживших каллусов из эксплантов составил всего 26,6%, в связи с этим для получения морфогенных каллусов решили использовать многоступенчатую селекцию. Также использовали селективную среду МС с 50% КФ, на этой среде единичные экспланты образовали каллус.

Кроме этого, использовали первичные каллусы гибридов для получения устойчивых каллусных линий к фитофторозу. При сравнении двух графиков 6 и 7 видно, что процент каллусогенеза в среднем через первичный каллус по шести гибридам составил на 5% КФ – 91,4%; 10% КФ – 77,8; 20% КФ – 63,6%; 30% КФ – 47,2%; 50% КФ – 21,2%.



а – каллусные линии на МС; б – каллусные линии на среде МС с 20% КФ

Рис. 5. Каллусные линии на среде МС с КФ гриба *Ph.infestans*

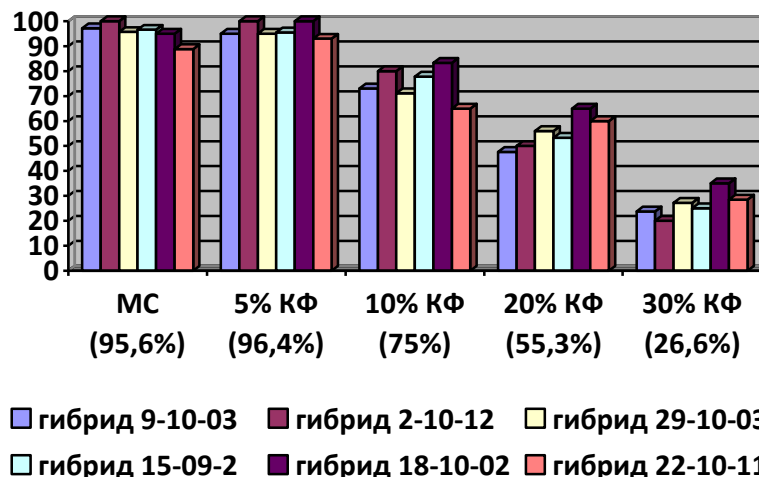


Рис. 6. Влияние КФ гриба *Ph.infestans* на рост морфогенной каллусной ткани при использовании эксплантов

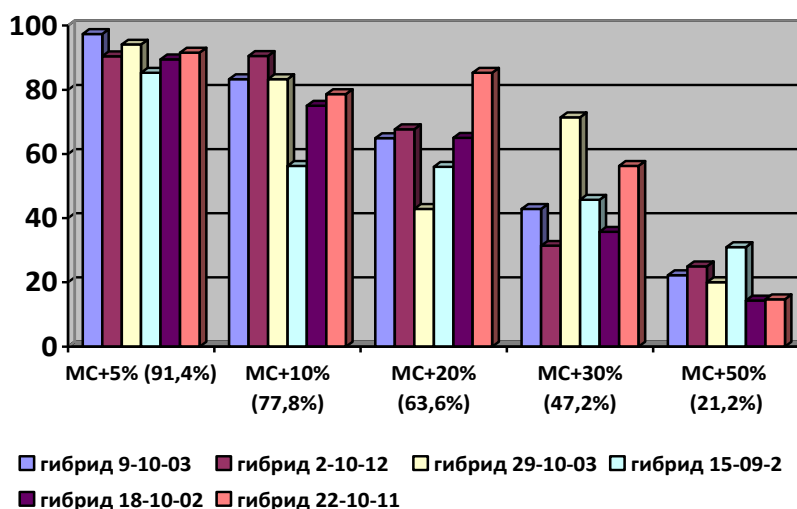


Рис. 7. Влияние КФ гриба *Ph.infestans* на рост морфогенной каллусной ткани при использовании первичного каллуса

При культивировании каллусов на среде с 20% КФ наблюдали прирост на 8,3%, на 30% КФ – 20,6%. Только культивируя через первичный каллус, возможно было получить выжившие каллусные линии на 50% КФ (21,2%). Оптимальными концентрациями для ступенчатой селекции являются 30, 50% КФ.

Для получения пробирочных растений-регенерантов устойчивые каллусные линии картофеля к КФ с эмбриоидами пересаживали на питательные среды МС для регенерации. В питательную среду МС добавляли фитогормоны ИУК – 1,0 мг/л, зеатин или БАП 1,0 мг/л. Полученные пробирочные растения-регенеранты гибридов картофеля микроклонально размножали.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Провели сбор пораженных клубней картофеля с производственных хранилищ для выделения возбудителей фитофтороза. В чистую культуру выделено 6 изолятов гриба *Ph. Infestans*.

Определена токсичность 6 изолятов гриба *Ph. infestans* методом биопроб. Высокую фитотоксическую активность наблюдали при использовании изолятов *Ph5*, *Ph4*, ингибирующий рост корней на 44, 33%, которые использовали в клеточной селекции картофеля на устойчивость к фитофторозу.

При сравнении 6 изолятов гриба на проявление патогенных свойств на ломтиках клубней выявлено, что изоляты *Ph5*, *Ph2*, *Ph4* по восприимчивому сорту Романо сильнее угнетали растения. По устойчивому сорту Латона только изолят *Ph5* был средне агрессивным. На основании этого, изолят *Ph5* был фитопатогенным по отношению к клубням картофеля.

Провели лабораторную оценку на устойчивость к фитофторозу 15 гибридов картофеля казахстанской селекции. Высоко устойчивыми были 9 гибридов. Не устойчивыми были гибриды 22-10-11, 15-09-2, 9-10-03, 18-10-02, 29-10-03, которые использовали для получения растений-регенерантов картофеля.

Для одноступенчатой селекции при использовании эксплантов оптимальными концентрациями КФ для получения устойчивых каллусных линий являются 10, 20%. Для многоступенчатой селекции при культивировании каллусов на среде с 20% КФ наблюдали прирост на 8,3%; на 30% КФ – 20,6%. Только культивируя через первичный каллус, получили выжившие каллусные линии на 50% КФ (21,2%). Оптимальными концентрациями для ступенчатой селекции являются 30, 50% КФ.

Для получения пробирочных регенерантов устойчивые каллусные линии картофеля к КФ гриба *Ph.infestans* с эмбриоидами пересаживали на питательные среды МС для регенерации и размножали путем микрочеренкования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Леонова Н.С. Изменчивость в культуре картофеля (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro* и возможности её использования в селекции и семеноводстве: автореф. ... канд. биол. наук. – Улан-удэ, 2010. – 24 с.
2. Бонадысев С.А., Иванюк В.Г., Журомский Г.К. Фитосанитарное состояние картофеля в Беларуси и пути его улучшения // Матер. междунар. юбилейной науч.-практ. конф.: научные труды. – Минск, 2003. – Ч. 2. – С.105-119.
3. Филлипов А.В. Фитофтороз картофеля // Защита и карантин растений. – 2005. – №4. – С.74-91.

4. Пляхневич М.П., Иванюк В.Г. Фитофтороз картофеля в Беларуси // *Картофелеводство: сб. науч. тр. РУП Науч.-практ. центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству*. – Минск, 2007. – Т.12. – С. 327-337.
5. Рогозина Е.В. Генетически различные устойчивые к фитофторозу гибриды картофеля – ценный исходный материал для селекции // *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. – 2007. – Т. 163. – С. 90-100.
6. Костина Л.И., Фомина В.Е., Королева Л.В., Косарева О.С. Многоступенчатый скрининг при выделении исходного материала для селекции картофеля на хозяйственно-ценные признаки // *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. – 2007. – Т. 163. – С.48-57.
7. Grünwald N.J., Flier W.G., Sturbaum A.K., Garay-Serrano E., van den Bosch T.B.M., Smart C.D., Matuszak J.M., Lozoya-Saldaña H., Turkensteen L.J., and Fry W.E. Population structure of *Ph. infestans* in the Toluca valley region of central Mexico // *Phytopathology*. – 2001. – Vol. 91. – P.882-890.
8. Abu-El Samen F.M., Secor G.A., and Gudmestad N.C. Variability in virulence among asexual progenies of *Phytophthora infestans* // *Phytopathology*. – 2003. – Vol. 93. – P.293-304.
9. Козлов В.А., Русецкий Н.В., Чащинский А.В., Игнатова Н.М. Использование генофонда картофеля ВИР в создании исходного материала, устойчивого к вирусным болезням, фитофторозу, с повышенным содержанием крахмала // *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. – 2007. – Т. 163. – С. 60-66.
10. Evenar D., Pressman E., Benyephet Y., Rappaport L. Somaclonal variation in celery and selection by coculturing toward resistance to *Septoria apicola* // *Plant Cell tissue and organ culture*. – 1994. –Vol. 39. – P. 203-210.
11. Zhu S., Vossen J.H., Visser R.G.F., Jacobsen E. Functional stacking of three resistance genes against *Ph. infestans* in potato // *Transgenic Res*. – 2011.
12. Лети Джос, Калашикова Е.З. Клеточная селекция пшеницы на устойчивость к септориозу // *Сельскохозяйственная биотехнология: избран. работы. «Евразия+»*. – 2000. – С.61–70.
13. Гавриленко Т.А., Рогозина Е.В., Антонова О.Ю. Создание устойчивых к вирусам растений картофеля на основе традиционных подходов и методов биотехнологии // *Идентифицированный генофонд растений и селекция*. – 2005. – С. 644-662.
14. Filipecki M., Wisniewska A., Yin Z., Malepszy S. The heritable changes in metabolic profiles of plants regenerated in different types of in vitro culture // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2005. – Vol. 82. – P. 349–356.
15. Aversano R., Savarese S., Maria De Nova J., Frusciantе L., Punzo M., Carputo D. Genetic stability at nuclear and plastid DNA level in regenerated plants of *Solanum* species and hybrids // *Euphytica*. - 2009. – Vol. 165. – P. 353–361.
16. Kuznetsova O.I., Ash O.A., Hartina G.A. and Gostimskij S.A. RAPD and ISSR analyses of regenerated pea *Pisum sativum* L. Plants // *Russian Journal of Genetics*. – 2005. - Vol. 41, №1. – P. 60–65; Translated from *Genetika*. – 2005. - Vol. 41, №1. - P. 71–77.
17. Bhatia P., Ashwath N., Senaratna T., Midmore D. Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*) // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. - 2004. – Vol. 78. -P.1–21.
18. Shirokikh I.G., Ogorodnikov S.Yu., Dal'ke I.V., Shupletsova O.N. Physiological and Biochemical Indices and Productivity of Barley Plants Regenerated from Callus in Selective Systems // *Russian Agricultural Sciences*. – 2011. - Vol. 37, №2. - P. 98–102. ISSN 1068-3674.
19. Лемеза Н.А. Иммуитет растений: практикум для студентов биол. факультета. – Минск, 2008. – 94 с.

ТҮЙІН

Селекцияда картоптың фитофторозға төзімді сорттарын алу мәселесі саңырауқұлақтардың көптеген түрлері, олардың арасындағы басқа саңырауқұлақ түріне төзімді сорттарды зақымдайтын агрессивті, пестицидтерге төзімді жаңа саңырауқұлақтардың пайда болу күрделілігімен ерекшеленеді. Биотехнологиялық әдістердің көмегімен картоптың пайдалы қасиеттерге ие жаңа формаларын құруға болады.

Жүргізілген зерттеулердің нәтижесінде Қазақстанның 3 облысындағы өндірістік қоймаларындағы картоптың зақымдалған түйнектерінен бөлініп алынған *Ph. Infestans* саңырауқұлағының 6 изолятының уыттылығы мен патогенділігі зерттелді. Жоғары фитотоксикалық белсенділік *Ph5*, *Ph4* изоляттарын қолдану кезінде байқалды, олар тамыр өсуін 44, 33% бәсеңдететті. Төзімді сорт Латона бойынша *Ph5* изоляты орташа агрессивті болды. Фитофторозға төзімді жасушалық селекция үшін *Ph5*, *Ph4* фитотоксикалық және фитопатогенді изоляттары бөлініп алынды.

Фитофторозға төзімді картоптың 15 гибридіне зерханалық баға берілді. Бірсатылы селекция кезінде фитофторозға төзімді каллустарды алу үшін 10%, 20% оптимальды КФ орта пайдаланылды. Фитофторозға төзімді сатылы селекцияға арналған оңтайлы қанықпапар - 30, 50% КФ. Регенерант алу үшін *Ph.infestans* саңырауқұлағына төзімді каллус линияларын эмбриондармен бірге МС қоректік ортасына отырғызып, микроклональды әдіспен көбейттік.

Кілтті сөздер: картоп, *Phytophthora infestans*, фитофтороз, культуральды филътрат, каллус, эксплант, жасушалық селекция.

SUMMARY

The problem of selection to create a late blight resistant potato varieties complicated by the fact that the fungus has the great number of races. Among them are new, aggressive and resistant to pesticides, amazing varieties that have resistance to other races. With the use of biotechnology can create new forms of potato with given useful properties.

The studies examined the toxicity and pathogenicity of six isolates of the fungus *Ph. Infestans*, isolated from infected potato tubers from production storage 3 regions of Kazakhstan. High phytotoxic activity was observed when using isolates Ph5, Ph4, which inhibited root growth by 44, 33%. Sustainable variety Latona isolate Ph5 medium was aggressive. Thus, isolated strains of pathogenic and toxicity Ph5, Ph4, which were used for cell selection for resistance to late blight.

For resistance to late blight conducted laboratory evaluation of 15 hybrids of potatoes. When using one-step selection for resistance to late blight in optimum concentrations of CF medium to produce resistant calli were 10, 20%. Optimal concentrations for stepwise selection for resistance to late blight – 30, 50% CF. For regenerants resistant callus lines to the fungus *Ph.infestans* with embryos transplanted to MS medium for regeneration, micropropagation then propagated.

Keywords: potato, *Phytophthora infestans*, late blight, culture filtrate, callus, explants, cell selection.