

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ**

**ІНСТИТУТ ОВОЧІВНИЦТВА І БАШТАННИЦТВА**

**Метод оцінки і добору джерел  
стресотолерантності помідора для  
альтернативних технологій**

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**

**Селекційне – 2020**

Результати роботи розглянуто Координаційно-методичною радою ІОБ НААН, протокол № 3 від 18 листопада 2020 р.

Метод оцінки і добору джерел стресотолерантності помідора для альтернативних технологій : методичні рекомендації / Авт. кол. : методичні рекомендації. Т. В. Івченко, Т. М. Мірошніченко, Г. В. Мозговська, Н. О. Баштан, Р. В. Крутько. Селекційне : ІОБ НААН. 2020. 9 с.

**Авторський колектив:** Т. В. Івченко, доктор с.-г. наук, Т. М. Мірошніченко, кандидат с.-г. наук, Г. В. Мозговська, кандидат с.-г. наук, Н. О. Баштан, кандидат с.-г. наук, Р. В. Крутько, кандидат с.-г. наук

**Рецензенти:** С. І. Кондратенко, доктор с.-г. наук, с.н.с.  
О. М. Шабетя, доктор с.-г. наук, с.н.с.

В методичних рекомендаціях викладено послідовність проведення прийомів в культурі *in vitro*, які включають стерилізацію насіння помідора, культивування пробіркових рослин, мікроживцювання, проведення біометричних вимірів у рослин-регенерантів, визначення активності пероксидази у пробіркових рослин, культивованих на селективних середовищах та ранжування зразків на основі математичного моделювання.

Методичні рекомендації можуть бути використані фахівцями-біотехнологами під час проведення дослідницьких робіт з овочевими рослинами, селекціонерами, насіннєводами, викладачами і здобувачами II і III рівня акредитації під час проведення навчальних курсів за спеціальністю 201 «Агрономія»

Відповідальні за випуск: Л. А. Терьохіна, О. Д. Вітанов

© Інститут овочівництва і баштанництва НААН, 2020  
© Івченко Т. В., Мірошніченко Т. М., Мозговська Г. В.,  
Баштан Н. О., Р. В. Крутько, 2020

## ЗМІСТ

ВСТУП	4
1. ЛАБОРАТОРНА ОЦІНКА СТРЕСОТОЛЕРАНТНИХ ФОРМ ПОМІДОРА	5
І ЕТАП: Підготовка рослинного матеріалу для проведення оцінки та добору джерел помідора	5
ІІ ЕТАП: Культивування на селективних середовищах	5
ІІІ ЕТАП Аналізування активності пероксидази	8
2. АНАЛІЗ ГЕНОТИПІВ НА ОСНОВІ РОЗРОБЛЕНОЇ СИСТЕМИ ДИСКРИМІНАНТНИХ РІВНЯНЬ	9
3. ПРИКЛАД ПЕРЕВІРКИ СИСТЕМИ ДИСКРИМІНАНТНИХ РІВНЯНЬ	10
БІБЛІОГРАФІЯ	11

## ВСТУП

Глобальні зміни клімату негативно впливають на виробництво помідора в усьому світі та в Україні, через що щорічні втрати продукції цієї культури через хвороби та екстремальні погодні умови становлять 12 – 30 %. Крім того, за останнє десятиліття, одним з основних напрямів розвитку овочівництва є постійно зростаючий ринок продукції, вирощеної за альтернативних технологій. Питома вага господарств, що постачають натуральну сільськогосподарську продукцію, в загальній площі земель і в структурі сільськогосподарських підприємств України також стає дедалі більшою. Тому актуальним є створення сортів і гібридів помідора, придатних для вирощування для різних рівнів інтенсивності виробництва, як конвенціональних, так і альтернативних [1-2]. І, хоча, значна частина господарських ознак є однаково важливою як для традиційних, так і альтернативних технологій, безперечно актуальною є розробка способів створення високоадаптивних, стійких до абіотичних і біотичних факторів джерел, придатних до технологій альтернативного землеробства.

В сучасній селекційній практиці для створення джерел стійкості до фітопатогенів й екстремальних погодних умов використовують спектр різних методологічних підходів. Методи традиційної селекції зазвичай є трудомісткими і результатом їх застосування є створення генотипів зі значною кількістю у створених генотипах гетерогенних генетичних компонентів. Високу ефективність для оцінки генотипів помідора на стійкість до хвороб і різних екстремальних факторів навколишнього середовища забезпечує використання лабораторних методів в культурі *in vitro* [3-5], які дозволяють добирати клітинні популяції, стійкі до селективного фактора, а потім регенерувати з них цілі рослини. Рослина, або її тканина чи орган, які виживають під тиском селективного добору, є потенційними джерелами стійкості/толерантності. Результатом соматональної мінливості в культурі *in vitro* є утворення клітинних варіантів, які відрізняються від вихідних форм за такими важливими в селекції ознаками як продуктивність і розмір плодів; різний рівень стійкості до абіотичних факторів (наприклад, стійкості до засолення) [6-8] і біотичних стресів, у тому числі хвороб або патогенів [9-11]. Недоліком методу клітинної селекції є низький вихід стійких форм, а також швидка втрата рослинами набутої стійкості за їх вирощування у ґрунтових умовах.

На даний час існують розрізнені експериментальні дані щодо складу селективних середовищ і методів добору стресотолерантного вихідного матеріалу для селекції помідора. Тому дані методичні рекомендації присвячені вирішенню проблеми інтенсифікації процесу створення та розмноження висококонкурентних генотипів овочевих культур шляхом комплексного використання лабораторних методів в культурі *in vitro* на різних селективних середовищах (соле, посухостійкість, стійкість до хвороб і дефіциту/надлишку елементів живлення) та методів математичного моделювання для оцінки і диференціації селекційного матеріалу при створенні нових генотипів, придатних до технологій альтернативного землеробства.

# 1. ЛАБОРАТОРНА ОЦІНКА СТРЕСОТОЛЕРАНТНИХ ФОРМ ПОМІДОРА

Застосування лабораторної оцінки генотипів помідора в культурі *in vitro* проводять шляхом багаторазової комплексної експрес-оцінки на селективних середовищах MS (Murasige і Скуга) [12] показників життєздатності та біометричних параметрів калюсів і рослин-регенерантів.

Дослідження здійснюються за наступною методичною схемою:

**I ЕТАП:** Підготовка рослинного матеріалу для проведення оцінки та добору джерел помідора

1. Насіння досліджуваних зразків вводять у стерильну культуру шляхом послідовної стерилізації у 96% етанолі (1 хвилина), надалі - у 15% розчині гіпохлориду натрію (30 хвилин). Потім насіння промивають не менше п'яти разів стерильною дистильованою водою у стерильних умовах (ламінарий бокс) [13].

2. Простерилізовані насінини для ініціації їх проростання розміщують на твердому безгормональному поживному середовищі за прописом MS. Культивування проводять за освітлення 2000 лк при температурі 23 – 25°C протягом 4 тижнів (при недостатній для аналізу кількості вихідного матеріалу, пасаж повторюють).

**II ЕТАП:** Культивування на селективних середовищах

3. Стерильні мікроживці довжиною 10 мм висаджують на селективні середовища для оцінки біо- та абіотичного стресу. Культивування рослин-регенерантів проводили за освітлення 2000 лк, температура 23 – 25 °C. Вплив селективних факторів на біометричні показники пробіркових рослин – відсоток життєздатності і укоріненості експлантатів, висоту рослин-регенерантів і довжину їх кореневої системи проводять через 4 тижні культивування на селективних середовищах [4].

4. У якості тест-систем для оцінки реакції генотипів на стійкість до абіотичних факторів використовують селективні середовища MS, модифіковані: 10 г/л NaCl (сольовий стрес); 0,05 г/л гідроксипроліну (осмотичний стрес);  $1,5 \times \text{NH}_4\text{NO}_3 + 1,5 \times \text{KNO}_3 + 1,5 \times (\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O} + \text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{MgSO}_4)$  (надлишок елементів мінерального живлення, де компоненти збільшують у 1,5 раза від стандартного пропису середовища MS).

5. У якості тест-систем для оцінки біотичної стійкості генотипів використовують селективне середовище MS, доповнене 40% фільтрату культуральної рідини (ФКР) *Fusarium* spp. від об'єму живильного середовища.

Виділення грибів роду *Fusarium* spp. проводять на гербарних зразках помідора, зібраних в полі та у плівкових теплицях Інституту овочівництва і баштанництва НААН за методикою Білай В.І. [14]. В стерильних чашках Петрі на фільтрувальному папері розміщують простерилізований гербарний матеріал, який інкубують за температури 20°C при розсіяному світлі.



Рис 1. Підготовка рослин-регенерантів до вимірювання довжини коренів



Рис 2. Витяжки із рослин-регенерантів для визначення рівня активності пероксидази





Рис 3. Нова лінія Т-5

Отриманий через 48 годин на межі ураженої та здорової частини тканини пухнастий, павутиноподібний міцелій для отримання чистої культури пересаджують у чашки Петрі з агаризованим середовищем Чапека, рН середовища – 4-4,5. Матеріал розміщують у термостаті за температури 26 °С. За допомогою мікроскопу здійснюють визначення патогенів за розміром макроконідій. Для додаткового виділення грибів в чисту культуру проводять 3 пересадки через кожні дві доби, після чого чисті культури грибів розмножують 15 діб на аналогічних середовищах. Через два тижні культивування міцелій патогенів *Fusarium* spp. за допомогою шпателя та 5 мг автоклавованої води змивають з поверхні середовища для відокремлення макроконідій. Отриману суспензію в стерильних умовах фільтрують через фільтрувальний папір. Для підрахунку кількості конідій у ФКР, використовують камеру Горяєва. Визначивши необхідну концентрацію конідій ( $2 \cdot 10^7$  /мг), суспензію додають у колби у 200 мг рідких середовищ приготованих за прописом Чапека, які витримують 21 день у термостаті за температури 26 °С. Отриману чисту культуральну рідину для подальшого застосування відокремлюють від міцелію центрифугуванням (800 об/хв. впродовж 20 хв), після чого додатково очищують послідовним пропусканням через паперові фільтри (розмір пор до 1,2 мкм).

6. Для порівняння впливу на фенотип живців помідора селективних середовищ в культурі *in vitro* використовують вирощування рослин досліджуваних генотипів на контрольному варіанті, на якому живці культивують на стандартному складі поживного середовища за прописом MS.

7. Через 28 діб культивування *in vitro* на селективних середовищах визначають окремі показники пробіркових рослин: на середовищах 10 г/л NaCl; 0,05 г/л гідроксипроліну; 40 % ФКР *Fusarium* spp. – рівень активності пероксидази; на середовищі з надлишком елементів мінерального живлення – довжину кореневої системи рослин-регенерантів. Також визначають ці показники на контрольному варіанті.

### **III ЕТАП: Аналізування активності пероксидази**

8. Активність пероксидази у рослинах-регенерантах, культивованих на селективних середовищах (п. 6) протягом 28 діб, визначають за методом Бояркіна [15, 16]. Метод базується на визначенні швидкості реакції окиснення бензидину до утворення продукту окиснення синього кольору.

Наважку рослинного матеріалу масою 200 мг розтирають у фарфоровій ступці з ацетатним буфером (рН=5,4) і переливають у мірну колбу на 50 мл до мітки. Для визначення активності ферменту у кювету з робочою довжиною 20 мм доливають по 2 мл ферментативної витяжки, 2 мл буферного розчину та 2 мл бензидину. Кювету у фотокolorиметрі розташовують навпроти світлофільтрів. Вимірювання проводять з використанням червоного світлофільтра за довжини хвилі 670 нм. У кювету доливають 2 мл 0,03% пероксиду водню з піпетки з широким отвором. При цьому відбувається перемішування вмісту кювети, а розчин набуває синього кольору. Після цього фіксують зміну оптичної густини розчину через кожні



10 с впродовж наступних 60 с.

Активність ферменту розраховують за формулою:

$$A = D(\alpha \cdot \beta \cdot \gamma) t \cdot d \quad (1),$$

де  $D$  – оптична густина 0,250;  $d$  – товщина шару рідини у см (товщина кювети);  $t$  – час у сек;  $\alpha$  – фактор розведення, відношення кількості рідини, яку взяли для приготування витяжки, у мл до маси наважки у г);  $\beta$  – ступінь додаткового розведення витяжки;  $\gamma$  – ступінь постійного розведення витяжки у дослідній суміші. Активність пероксидази виражали в умовних одиницях густини на 1 г сирової маси за секунду (м моль/ г с).

9. При вимірюванні довжини кореневої системи рослини-регенеранти через 28 днів культивування виймають з пробірок, відмивають від залишків середовища водою, розкладають на рівній поверхні. Заміри проводять з використанням лінійки.

## 2. АНАЛІЗ ГЕНОТИПІВ НА ОСНОВІ РОЗРОБЛЕНОЇ СИСТЕМИ ДИСКРИМІНАНТНИХ РІВНЯНЬ

Отримані результати нормують по відношенню до контролю з одержанням індексів, що дозволяє аналізувати різні показники разом.

Для добору джерел комплексної стійкості отримані індекси за комплексом ознак рослин-регенерантів в культурі *in vitro* обраховують за використання системи класифікаційних рівнянь [17] для коректного розподілу зразків на групи :

**Група А** =  $-13,84 - 7,90 \cdot (\text{PNa}10) - 3,82 \cdot (\text{PH}0.05) + 5,91 \cdot (\text{PF}40) + 30,24 \cdot (\text{RLII})$   
(рекомендовано вирощувати за альтернативної системи виробництва),

**Група В** =  $-25,04 + 7,00 \cdot (\text{PNa}10) + 5,10 \cdot (\text{PH}0.05) + 1,51 \cdot (\text{PF}40) - 6,33 \cdot (\text{RLII})$   
(рекомендовано вирощувати за інтенсивної системи виробництва)

де, **PNa10** - показник активності пероксидази на селективному середовищі із додаванням NaCl 10 г/л;

**PH0.05** - показник активності пероксидази на селективному середовищі із додаванням гідроксипроліну (0,05 г/л);

**PF40** - показник активності пероксидази на селективному середовищі із додаванням 40% ФКР *Fusarium*;

**RLII** - довжина кореня на модифікованому середовищі MS із підвищеним вмістом елементів мінерального живлення у 1,5 раза (1,5 x NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> + 1,5 x KNO<sub>3</sub> + 1,5 x CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + MgSO<sub>4</sub>).

Відповідність генотипу до певної групи визначають за максимальним значенням результату рівняння. Якщо числовий результат рівняння А більший, ніж у рівнянні В, то генотип потрапляє в групу А, якщо – ні, генотип розподіляється в групу В. Використання даної системи рівнянь дає

можливість надавати рекомендації стосовно напряму використання нових генотипів помідора і їх придатності до вирощування за різних рівнів інтенсивності виробництва.

### 3. ПРИКЛАД ПЕРЕВІРКИ СИСТЕМИ ДИСКРИМІНАНТНИХ РІВНЯНЬ

Система дискримінантних рівнянь також пройшла перевірку під час аналізу досліджуваних 12 зразків: еталон біотичної стійкості – дикорослий вид *Solanum chilense*; еталон абіотичної стійкості – створена в ІОБ НААН жаростійка лінія К-7311; рекомендовані для інтенсивних технологій гібриди F<sub>1</sub> Есміра і Зульфія (Rijk Zwaan); рекомендовані для виробництва за органічних технологій сорти Golden koningin “Reine D’or”, Potiron ecarlate, районовані сорти вітчизняної селекції Севен, Дама, Гейзер і перспективні селекційні лінії Т-2, Т-4, Т-5 (табл.).

Таблиця – Перевірка системи дискримінантних рівнянь за розробленою моделлю

	Група А	Група В	Розподіл по групам
<i>S. chilense em.</i>	7,83	-14,54	А
К-7311, ет.	7,05	14,44	В
Зульфія F <sub>1</sub>	2,48	21,09	В
Есміра F <sub>1</sub>	5,78	29,65	В
Goldene koningin «Reine D'Or»	23,10	3,21	А
Potiron ecarlate	11,88	-14,25	А
Севен	-2,63	27,64	В
Дама	14,34	-3,81	А
Т-5	8,14	-12,08	А
Т-2	11,61	-6,59	А

За результатами проведеного аналізування у **групу А** увійшли зразки *S.chilense*, Goldene koningin «Reine D'Or», Potiron ecarlate, Дама, Т-5, Т-2, які характеризувались високою стійкістю до хвороб. У **групу В** увійшли високо урожайні генотипи (іноземні гібриди Зульфія F<sub>1</sub>, Есміра F<sub>1</sub>, К-7311, Севен), які рекомендуються для інтенсивних технологій виробництва овочевої продукції.

Даний методичний підхід для ідентифікації генотипів можливо застосовувати на культурі помідора як на ранніх, так і на заключних етапах селекції. Створена в ІОБ НААН лінія Т-5 для вирощування в захищеному (плівкових теплицях) і відкритому ґрунті, за результатами лабораторної оцінки відповідає **групі А** і тому може бути рекомендованою для вирощування за технологій органічного овочівництва.

## БІБЛІОГРАФІЯ

1. Reisvik, S. World map of vegetable crops. Global industry trends [Електронний ресурс] // URL: [www.agroxxi.ru/mirovye-agronovosti/vsemirnaja-karta-ovoschnyh-kultur-globalnye-tendencii-otrasli.html](http://www.agroxxi.ru/mirovye-agronovosti/vsemirnaja-karta-ovoschnyh-kultur-globalnye-tendencii-otrasli.html).
2. Phillips, S.L.; Wolfe, M.S. (2005). Evolutionary plant breeding for low input systems. *Journal of Agricultural Science*. Vol. 143. pp. 245–254.
3. García-González, R., Quiroz, K., Carrasco, B. (2010). Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Ciencia e Investigación Agraria*. Vol. 37(3). pp. 5-30.
4. Івченко, Т.В. (2013). Клітинні технології створення вихідного селекційного матеріалу основних овочевих рослин в культурі *in vitro*: методичні рекомендації. Харків : Плеяда. 47 с.
5. Ігнатова, С.А. (2011). Клеточные технологии растениеводства, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*. Одесса : Астропринт. 224 с.
6. Hassan, N.M., Serag, M.S., El-Feky, F.M. (2008). In vitro selection of mung bean and tomato for improving tolerance to NaCl. *Annals of Applied Biology*. Vol. 152. pp. 319–330.
7. Rashed, M.R., Mallika, R.R. (2016). *In vitro* Screening of Salt Tolerant Genotypes in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Horticulture*. 2016. Vol. 3 (4). doi: 10.4172/2376-0354.1000186.
8. Kashyap, S.P., Prasanna, H.C. (2020). Understanding salt tolerance mechanism using transcriptome profiling and de novo assembly of wild tomato *Solanum chilense*. *Scientific reports*. Vol. 10 (10). doi: 10.1038/s41598-020-72474-w.
9. Švábová, A., Lebeda, J. (2005). In vitro selection for improved plant resistance to toxin-producing pathogens. *Phytopathol.* Vol. 153. pp. 52–64.
10. Івченко, Т.В. (2016). Використання клітинних технологій *in vitro* для добору стійкого до фузаріозного в'янення (*Fusarium oxysporum*) вихідного матеріалу огірка. Наукові доповіді НУБІП. № 2 (59). 12 с.
11. Ivchenko, T.V. (2014). The Usage of Cell Selection for Creation of Tomato and Eggplants Breeding Lines with Resistance to *Fusarium*. *Agricultural Science and Practice*. Vol. 1. № 3. С. 15–21.
12. Murashige, T.A. (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol.plant.* Vol. 15. pp. 473–497.
13. Мірошніченко, Т. М., Самовол, О. П., Івченко, Т. В. (2018). Клональне мікророзмноження в культурі *in vitro* стерильних генотипів томата. Методичні рекомендації. Селекційне: ІОБ НААН. 15 с.
14. Билай, В.И. (1990). Методы экспериментальной микологии. К.: Наукова думка. 156 с.
15. Бояркин, А.Н. (1961). Колориметрическое определение активности пероксидазы. *Биохимия*. Т. 16. № 2. С. 252-254.
16. Переверзева, В.Ф. (2003). Лабораторная техника и методы биохимических исследований в фитопатологии и фитоиммунологии. 59 с.
17. Goodman, L.A., Kruskal, W.H. (1954). Measures of association for cross classifications. *Journal of the American Statistical Association*. Vol. 49 (268). pp. 732–764. doi.org/10.1080/01621459.1954.10501231.

