

УДК 606:635.64

Застосування методу клітинної селекції для оцінки якості й стійкості сортів томатів (*Lycopersicon esculentum* Mill.) проти збудників бактеріальних хвороб

Ю. В. Коломієць, кандидат біологічних наук
julyja@i.ua

І. П. Григорюк, доктор біологічних наук, член-кореспондент НАН України
Національний університет біоресурсів і природокористування України

Л. М. Буценко, кандидат біологічних наук
Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України

Мета. Оцінити ступінь стійкості проти збудників бактеріальних хвороб в умовах *in vitro* сортів томатів, які внесено до Державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення в Україні на 2015 рік. Визначити інтегральні біохімічні показники якості плодів томатів з різною стійкістю проти збудників бактеріозів. **Методи.** У процесі виконання роботи використано біотехнологічні методи для відбору калюсних клітин з підвищеною стійкістю проти збудників бактеріальних хвороб, біохімічні – визначення якісних і кількісних показників якості плодів томатів, статистичні – обробки експериментальних даних. **Результати.** Досліджені сорти томатів української селекції мали різну стійкість проти прогрітих клітин збудників бактеріальної крапчастості й чорної бактеріальної плямистості та екзополісахаридів збудників бактеріального раку. Високими смаковими та якісними властивостями відзначилися сорти 'Чайка', 'Клондайк', 'Зореслав', 'Фландрія', 'Легінь', 'Оберіг', 'Атласний', 'Господар' та 'Кіммерієць'. **Висновки.** Встановлено, що сорти томатів 'Чайка', 'Клондайк' і 'Зореслав' є стійкими проти бактеріального раку, бактеріальної крапчастості та бактеріальної плямистості; 'Фландрія' й 'Легінь' – проти бактеріальної плямистості, 'Оберіг', 'Атласний', 'Господар' та 'Кіммерієць' – проти бактеріальної крапчастості.

Ключові слова: клітинна селекція, сорти томатів, бактеріальні хвороби, стійкість, якість плодів.

Вступ. Культура томата в Україні посідає одне з провідних місць у забезпеченні населення високовітамінними продуктами харчування. Популярність цієї культури зумовлена її екологічною пластичністю, високою врожайністю та біологічною цінністю плодів. Плоди використовують для споживання у свіжому вигляді, у переробній промисловості, для консервування, сушіння, заморожування, виготовлення соків, томатної пасти, соусів тощо [1].

Основні біохімічні критерії оцінки якості плодів томата визначаються агрокліматичними умовами вирощування, віком, біологічними особливостями сортів та рівнем стійкості проти хвороб. Бактеріози вважають одними з найнебезпечніших хвороб рослини томата, а препаратів для застосування проти таких уражень, немає.

На цей час виявлено вісім видів фітопатогенних бактерій, які уражують томати [2]. В Україні найпоширенішими є збудники бактеріального раку (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), бактеріальної крапчастості (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) та чорної бактеріальної плямистості (*Xanthomonas vesicatoria*) [3–5].

Перелік сортів і гібридів рослин томата є надзвичайно різноманітним. У 2015 р. до Державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення в Україні (далі – Державний реєстр сортів рослин) занесено понад 300 сортів і гібридів вітчизняної та зарубіжної селекції, які відрізняються за стійкістю проти хвороб. Формування врожайності та стійкості плодів томата проти хвороб значною мірою залежить від сортових особливостей. Ключовою відмінністю між стійкими й сприйнятливими сортами рослин є швидкість передачі білками-рецепторами, які розпізнають метаболіти фітопатогенів, первинного сигналу, що вводить у дію процеси індукції та регуляції фітоімунітету. На кінцевому етапі передачі сигналу відбувається перепрограмування експресії генів і зміни в синтезі вторинних метаболітів, що є основою диференціації клітин, морфогенезу та адаптації організмів [6].

Метод клітинної селекції дає можливість розширити генетичне різноманіття, полегшити й прискорити селекційний процес, конструювати й добирати рослини, стійкі проти біо- та абіотичних стресових чинників, значно швидше, ніж методами традиційної селекції. Основна перевага клітинної селек-

ції полягає в можливості ведення цілеспрямованого добору генотипів у контрольованих умовах, зокрема на селективному фоні, який створюють за участю токсичних продуктів життєдіяльності фітопатогенних бактерій. Патогени секретують різноманітні за хімічною структурою і функціями компоненти, зокрема оліго- та полісахариди, поліпептиди, глікопротеїни, ліпіди тощо. Селективними чинниками для добору генотипів, стійких проти фітопатогенних грамнегативних бактерій, є молекули ліпополісахариду (ЛПС) [7, 8], проти грампозитивних виступають бактеріальні екзополісахариди (ЕПС) [9].

Для створення стійких проти стресових чинників рослин томатів біотехнологічним шляхом необхідна ефективна система *in vitro*, яка ґрунтується на використанні певного типу експлантата. Калюсна тканина є легкодоступним матеріалом, який найчастіше використовують для клітинної селекції. Як правило, експерименти проводять на первинному або пасованому калюсі, який не втрачає здатності до регенерації протягом ряду субкультивувань.

Мета досліджень – перевірити сорти томатів вітчизняної селекції, які внесено до Державного реєстру сортів рослин станом на 2015 р., на стійкість проти збудників бактеріальних хвороб в умовах *in vitro*, а також визначити інтегральні біохімічні показники якості плодів томатів з різною стійкістю проти збудників бактеріозів.

Матеріали та методи досліджень. Об'єктами досліджень були 16 детермінантних сортів томатів української селекції, які внесено до Державного реєстру сортів рослин станом на 2015 р., стійких проти основних грибових захворювань, зокрема 'Чайка', 'Малиновий дзвін', 'Флора', 'Клондайк', 'Елеонора', 'Оберіг', 'Атласний', 'Зореслав', 'Господар', 'Кіммерієць', 'Дама', 'Легінь', 'Любимий', 'Талан', 'Фландрія' та 'Кумач'.

У дослідженнях використовували фітопатогенні бактерії *Xanthomonas vesicatoria* (Doiidge 1920) Vauterin et al. 1995 штамп 9098 з колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України*, штами *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith 1910) Davis et al. 1984 штамп 4999 і *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe 1933) Young et al. 1978 штамп Pst2, які отримано

з Інституту пестицидів та захисту рослин (Республіка Сербія). Для визначення ступеня стійкості сортів томатів проти бактеріальної крапчастості й чорної бактеріальної плямистості як селективний чинник застосовували суспензію бактеріальних клітин (20 млрд кл./мл), які прогрівали за температури 100 °C протягом 2,5 год, ПК штампів *P. syringae* pv. *tomato* Pst2 та *X. vesicatoria* 9098 [10]. Для визначення ступеня стійкості сортів томатів проти бактеріального раку використовували ЕПС штаму *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 4999 [9].

Для прискореного одержання рихлого калюсу живильне середовище Мурашіге і Скуга доповнювали 8,0 мг/л 6-БАП й 4,0 мг/л ІОК. 50 насінин сортів томатів стерилізували 17% розчином H_2O_2 15 хв. і висаджували за загальноприйнятою методикою. Для добору калюсних клітин томатів селективні чинники вносили в середовище в концентрації 0,4; 0,8; 2,0; 4,0; 6,0; 10,0% та культивували за температури 25 ± 2 °C без освітлення. Після чотирьох тижнів вирощування підраховували приріст калюсної маси й життєздатні колонії. Добір калюсних колоній здійснювали методом змішування з агаром у триразовій повторності [11].

Вміст сухої речовини в дозрілих плодах томатів визначали гравіметричним методом (ГОСТ 13586.5–93), цукрів – за Бертраном (ГОСТ 8756.13–87), вітаміну С (аскорбінової кислоти) – згідно з Муррі (ГОСТ 24556–89), загальної кислотності – титруванням витяжки розчином лугу (ГОСТ 25555.0–82), нітратів – потенціометрично за допомогою іон-селективного електрода (ГОСТ 29270–95), цукрово-кислотний коефіцієнт – співвідношенням цукрів та кислотності плодів [12].

Статистичний аналіз результатів здійснювали за допомогою пакету прикладних програм STATISTICA v. 6.0.

Результати досліджень. Ми провели порівняльне визначення стійкості калюсних тканин томатів проти ПК штампів *P. syringae* pv. *tomato* Pst2, *X. vesicatoria* 9098 та ЕПС *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 4999 у діапазоні концентрацій від 0,4 до 10%. Одночасно здійснено контрольний висів на живильне середовище без селективного чинника. Наявність ПК і ЕПС зумовлювало різке зменшення кількості утворених калюсних колоній порівняно з контролем, оскільки лише незначна частина агрегатів, завдяки генетичним або адаптаційним змінам, була здатна до поділу та проліферації у за наявності чинників патогенності бактерій.

* Висловлюємо подяку за допомогу в проведенні досліджень завідувачу відділу фітопатогенних бактерій ІМВ НАНУ доктору біологічних наук, професору, академіку НААН України Патиці В. П.

Низька (0,4%) концентрація ПК і ЕПС збудників не виявляла значного токсичного впливу на системи життєздатності калюсної культури. Виживання становило 30–45%, що не давало можливості проводити добір клітин на стійкість. Починаючи з концентрації 0,8%, відбувалося побуріння калюсної тканини та зменшення кількості життєздатних клітин (див. рисунок). Повністю пригнічувала розвиток калюсів 10% концентрація ПК та ЕПС. У наших експериментах

для добору стійких калюсних клітин максимально-граничними виявились концентрації від 0,8 до 6% ПК штамів *P. syringae* pv. *tomato* Pst2, *X. vesicatoria* 9098 і ЕПС *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 4999, за яких визначено 80–88% зменшення життєздатних колоній залежно від сортових особливостей (табл. 1).

Потім життєздатні колонії переносили на селективні середовища з максимально-граничними концентраціями і культивували

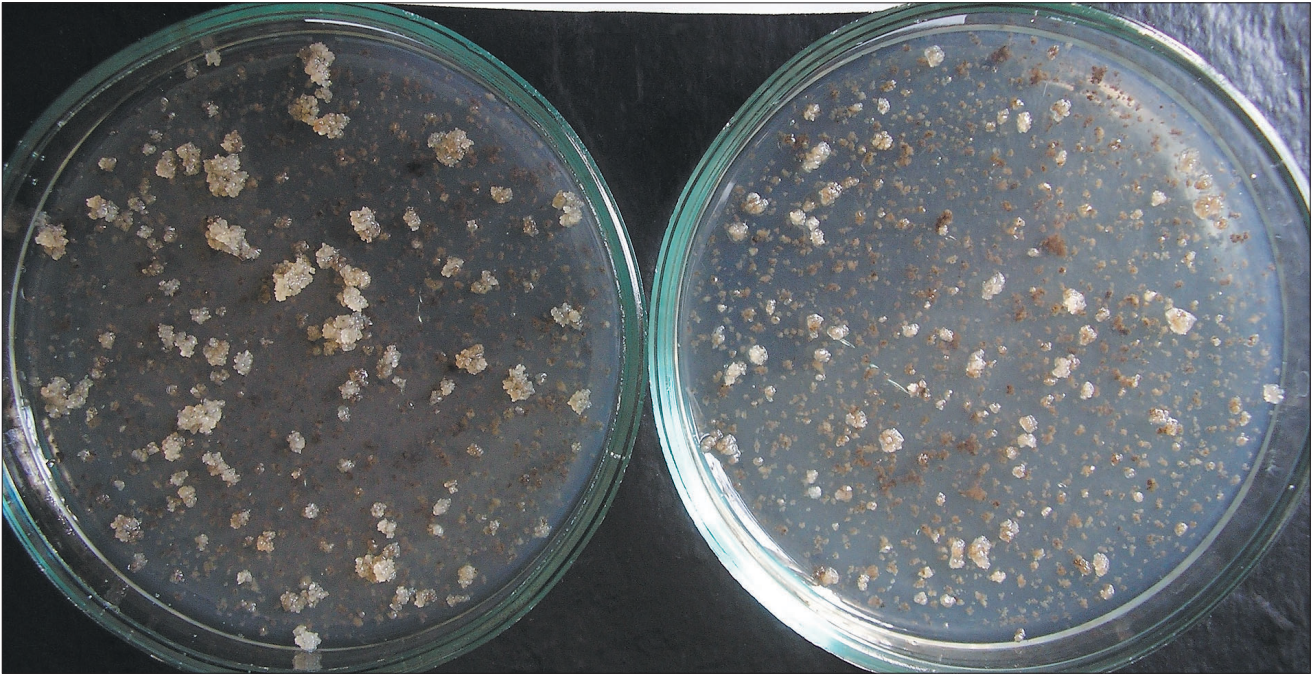


Рис. Дія 0,8% ЕПС на формування калюсних тканин томата сорту 'Чайка':
ліворуч – контроль, праворуч – 0,8% ЕПС *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 4999

Таблиця 1
Гетерогенність реакцій сортів томатів на бактеріальні чинники патогенності

Сорт	Максимальна концентрація селективного чинника (%), за якої виживає 12–20% калюсних колоній		
	ЕПС 4999	ПК Pst2	ПК 9098
'Чайка'	6,0	6,0	6,0
'Малиновий дзвін'	0,8	0,8	2,0
'Флора'	0,8	2,0	2,0
'Клондайк'	6,0	4,0	6,0
'Елеонора'	0,8	0,8	0,8
'Оберіг'	4,0	4,0	4,0
'Атласний'	4,0	4,0	4,0
'Зореслав'	4,0	4,0	6,0
'Господар'	0,8	4,0	0,8
'Кіммерієць'	2,0	4,0	4,0
'Дама'	0,8	0,8	0,8
'Легінь'	2,0	2,0	4,0
'Любимий'	0,8	0,8	0,8
'Талан'	0,8	2,0	2,0
'Фландрія'	0,8	2,0	4,0
'Кумач'	2,0	0,8	2,0

протягом 4 тижнів для визначення приросту калюсної маси. Ми встановили, що внесення селективних компонентів бактеріально походження в живильне середовище пригнічувало формування й приріст калюсної маси рослин томатів. Крім того, виявлено зменшення діаметра калюсних колоній за наявності селективного чинника порівняно з контролем (табл. 2).

За концентрації 6% ПК *Xanthomonas vesicatoria* 9098 приріст калюсної маси в сортів томата 'Чайка', 'Клондайк' і 'Зореслав' становив 13–15%, 4% ПК *Xanthomonas vesicatoria* 9098 – 'Оберіг', 'Атласний', 'Кіммерієць' і 'Фландрія' – 10–13%.

Так, за умов додавання 4% ЕПС *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 4999 приріст калюсної маси становив 9,7–12%, у сортів 'Малиновий дзвін', 'Флора', 'Елеонора', 'Господар', 'Дама', 'Любимий', 'Талан' і 'Фландрія' відбувалась повна загибель

Таблиця 2

**Приріст і діаметр калюсу сортів томатів на середовищах з максимальними концентраціями
ПК штамів *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Pst2, *Xanthomonas vesicatoria* 9098 та ЕПС
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* 4999**

Сорт	Діаметр калюсу, мм				Приріст маси калюсу, г			
	Контроль	ЕПС 4999	ПК Pst2	ПК 9098	Контроль	ЕПС 4999	ПК Pst2	ПК 9098
'Чайка'	10,00	6,06	7,04	6,99	1,240	0,175	0,208	0,186
'Малиновий дзвін'	7,00	4,10	4,51	4,37	0,705	0,120	0,120	0,120
'Флора'	7,10	4,24	4,47	4,39	0,700	0,164	0,182	0,172
'Клондайк'	9,50	6,52	7,05	7,21	1,415	0,170	0,192	0,184
'Елеонора'	8,00	5,45	4,51	4,41	1,520	0,148	0,152	0,156
'Оберіг'	7,60	4,48	5,61	5,57	1,540	0,150	0,158	0,154
'Атласний'	7,50	4,45	5,55	5,50	1,381	0,149	0,156	0,152
'Зореслав'	9,40	6,54	6,98	7,19	1,333	0,168	0,195	0,200
'Господар'	8,20	5,49	5,56	5,34	0,736	0,156	0,162	0,157
'Кіммерієць'	8,25	5,49	5,57	5,52	1,308	0,150	0,164	0,157
'Дама'	7,30	4,39	4,41	4,30	1,270	0,127	0,133	0,139
'Легінь'	7,80	4,46	5,17	5,84	0,850	0,145	0,153	0,175
'Любимий'	7,00	4,39	4,40	4,34	1,236	0,129	0,136	0,134
'Талан'	7,00	4,19	4,41	4,34	1,533	0,133	0,138	0,136
'Фландрія'	8,00	4,10	5,17	5,66	1,253	0,146	0,154	0,163
'Кумач'	7,15	4,69	4,39	4,30	1,083	0,130	0,143	0,128
НІР ₀₅	0,87	1,08	1,04	0,54	3,31	3,33	3,31	6,66

калюсних колоній на 3–7 добу культивування.

На селективних живильних середовищах з додаванням 6% ПК *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Pst2 стабільні клітинні лінії відбирали лише у сорту 'Чайка', водночас приріст калюсної маси становив 16,77%. За концентрації 4% ПК *P. syringae* pv. *tomato* Pst2 він зростає на 10,25–22% у генотипів 'Клондайк', 'Оберіг', 'Атласний', 'Зореслав', 'Господар' та 'Кіммерієць'. Внесення 2% ПК *P. syringae* pv. *tomato* Pst2 забезпечило зменшення приросту калюсної маси на 74–91% у сортів томата 'Флора', 'Легінь', 'Талан' та 'Фландрія'.

Ми визначили максимально-критичні концентрації селективних чинників для кожного сорту, водночас відібрані колонії відзначалися активним приростом маси калюсу, що є однією з інтегральних характеристик стійкості рослин проти стресових чинників [13].

Застосована методика дає можливість достовірно визначати в лабораторних умовах генотипи томатів з більшим відсотком виживання калюсних клітин за високих концентрацій чинників бактеріального походження із захисними функціями від збудників. В основі цього процесу лежить багаторівнева активація сигнальних систем, що беруть участь у трансдукції сигналів у відповідь на біотичний стрес та формуванні механізмів хворобостійкості рослин [6].

Ми провели біохімічну оцінку якості плодів сортів томатів української селекції. Аналіз свідчить, що вміст сухої речовини

в дозрілих плодах томатів, стійких проти збудників бактеріального раку, бактеріальної крапчастості та бактеріальної плямистості, сортів 'Чайка', 'Оберіг', 'Господар' та 'Фландрія' коливається в межах від 5,00 до 5,37% (табл. 3). Розчинні вуглеводи становлять значну частину сухої речовини плодів томата. У наших дослідженнях найбільший показник кількості сумарних цукрів був характерним для плодів томата сорту 'Легінь', який є стійким проти збудника бактеріальної плямистості. Для оцінки смакових і харчових властивостей ми розраховували цукрово-кислотний коефіцієнт, який коливався в межах від 5,78 до 8,95 балів у плодах сортів томатів 'Чайка', 'Клондайк', 'Оберіг', 'Атласний', 'Кіммерієць' і 'Легінь', які проявляли стійкість проти збудників бактеріального раку, бактеріальної крапчастості та бактеріальної плямистості. Вміст залишкових кількостей нітратів у плодах томатів становив 1,73–3,85 мг/кг сирої маси і не перевищував допустимо граничні концентрації, які встановлено Медико-біологічними вимогами та санітарними нормами якості продуктової сировини і харчових продуктів [12], що внесені до Державного стандарту України. Стійкість рослин томата проти хвороб не завжди корелює із швидкістю та високою продуктивністю рослин. Таким чином, високими смаковими та якісними властивостями відзначилися сорти 'Чайка', 'Клондайк', 'Зореслав', 'Фландрія', 'Легінь', 'Оберіг', 'Атласний', 'Господар' та 'Кіммерієць'.

Таблиця 3

Якісні показники плодів томатів з різною стійкістю проти збудників *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Pst2, *Xanthomonas vesicatoria* 9098 та *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 4999

Сорт	Суша речовина, %	Нітрати, мг/кг сирової маси	Сума цукрів, %	Органічні кислоти, %	Смаковий індекс, бали	Вітамін С, мг %	β-каротин, мг %
'Чайка'	5,01	1,90	7,20	1,07	7,58	52,8	1,63
'Малиновий дзвін'	4,80	3,38	7,79	1,04	7,50	53,8	1,27
'Флора'	4,41	2,00	6,74	1,01	6,68	47,0	1,21
'Клондайк'	4,95	2,15	6,61	1,13	5,84	51,9	1,25
'Елеонора'	4,77	2,83	7,10	1,14	5,81	48,6	1,38
'Оберіг'	5,10	2,38	7,48	1,09	6,23	52,9	1,63
'Атласний'	4,93	2,65	7,32	1,05	6,18	52,6	1,65
'Зореслав'	4,88	2,21	6,32	0,99	6,37	49,6	1,22
'Господар'	5,37	2,46	6,54	0,86	6,93	47,3	1,65
'Кіммерієць'	4,81	2,76	7,35	1,06	5,78	53,6	1,30
'Дама'	4,42	3,85	8,50	1,00	6,12	47,5	1,22
'Легінь'	4,38	1,73	8,81	0,98	8,95	52,4	1,30
'Любимий'	4,56	3,09	6,86	0,96	5,80	51,4	1,36
'Талан'	4,75	2,12	6,84	0,98	6,43	48,6	1,25
'Фландрія'	5,00	1,95	7,59	1,19	6,38	48,3	1,38
'Кумач'	4,48	3,10	6,95	0,86	5,68	48,3	1,42
НІР ₀₅	0,42	0,40	0,39	0,37	0,35	0,42	0,37

Висновки. За допомогою методу клітинної селекції перевірено стійкість 16 детермінантних сортів томатів української селекції, які внесено до Державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення в Україні на 2015 рік, проти найпоширеніших збудників, зокрема бактеріально-го раку *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, бактеріальної крапчастості *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* та чорної бактеріальної плямистості *Xanthomonas vesicatoria*. Визначено максимально-критичні концентрації фітотоксичних речовин і встановлено, що сорти томатів 'Чайка', 'Клондайк' і 'Зореслав' є стійкими проти збудників бактеріального раку, бактеріальної крапчастості та бактеріальної плямистості; 'Фландрія', 'Легінь' – бактеріальної плямистості, 'Оберіг', 'Атласний', 'Господар' і 'Кіммерієць' – бактеріальної крапчастості. Зазначені сорти томатів відзначалися високими якісними й смаковими властивостями за вмістом сухої речовини (5–5,37%), нітратів (1,73–3,85 мг/кг сирової маси), цукрово-кислотним коефіцієнтом (5,78–8,95).

Використана література

- Кравченко В. А. Помідор: селекція, насінництво, технології / В. А. Кравченко, О. В. Приліпка. – К. : Аграрна наука, 2007. – 424 с.
 - Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин : монографія / Р. І. Гвоздяк, Л. А. Пасічник, Л. М. Яковлева [та ін.] ; за ред. В. П. Патики. – К. : ТОВ «НВП «Інтерсервіс», 2011. – 444 с.
 - Черненко Є. П. Бактеріальні хвороби томата і біологічне обґрунтування заходів з обмеження їхнього розвитку : авто-
- реф. дис. ... канд. біол. наук : спец. 06.01.11 «Фітопатологія» / Є. П. Черненко. – К., 2009. – 18 с.
 - Етіологія масового захворювання томатів у господарствах України / Р. І. Гвоздяк, С. М. Мороз, Л. М. Яковлева, Є. П. Черненко // Мікробіол. журн. – 2009. – Т. 71, № 5. – С. 33–40.
 - Аветисян Ю. Ф. Возбудители бактериальных болезней томата в хозяйствах Днепропетровской области / Ю. Ф. Аветисян, Ю. В. Коломиец // Глобализация науки: проблемы и перспективы : сб. статей Междунар. науч.-практ. конф. (7 февраля 2014 г.). – Уфа : РИЦ БашГУ, 2014. – Т. 3. – С. 186–189.
 - Сигнальні системи рослин та формування стійкості проти біотичного стресу / О. П. Дмитрів, Р. В. Ковбасенко, Л. В. Авдєєва [та ін.] ; Інститут кліт. біології та ген. інженерії НАНУ. – К. : Фенікс, 2015. – 192 с.
 - Структура і біологічна активність бактеріальних біополімерів / В. К. Позур, Д. В. Колибо, В. А. Борисов [та ін.] ; Київ. нац. ун-т ім. Т. Шевченка. – К., 2003. – 305 с.
 - Чугункова Т. В. Використання клітинної селекції для створення стійких форм буряків / Т. В. Чугункова // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – Т. 41, № 6. – С. 509–515.
 - Van den Bulk R. W. Characterization of the extracellular polysaccharide produced by *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* / R. W. van den Bulk, L. P. T. M. Zevenhuizen, J. H. G. Cordewener, J. J. M. Dons // Physiology and Biochemistry. – 1991. – Vol. 81, No. 6. – P. 619–623.
 - Матвеева Е. В. Бактериальные болезни томата и картофеля и меры борьбы с ними : метод. рекомендации / Е. В. Матвеева, Г. А. Быкова, А. М. Лазарев. – СПб., 1999. – 30 с.
 - Біотехнологія рослин. Практикум / М. Д. Мельничук, О. Л. Кляченко, Ю. В. Коломиець [та ін.]. – К. : Аграр Медіа Груп, 2011. – 216 с.
 - Методика державного сортовипробування сільськогосподарських культур / ред. В. В. Волкодав ; Держ. комісія України по випробуванню та охороні сортів рослин. – К. : АЛЕФА, 2000. – Вип. 7 : Методи визначення показників якості рослинницької продукції / ред. О. М. Гончар. – 144 с.
 - Сидоров В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция / В. А. Сидоров. – К. : Наук. думка, 1990. – 280 с.