

КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ *IN VITRO* САХАРНОЙ СВЕКЛЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К КУЛЬТУРАЛЬНОМУ ФИЛЬТРАТУ ГРИБА *FUSARIUM OXYSPORUM*

Р.С. ЕРЖЕБАЕВА¹, А.М. АБЕКОВА¹, Г.Х. БЕРСИМБАЕВА¹, К.Т. КОНЫСБЕКОВ¹,
Ш.О. БАСТАУБАЕВА¹, Н.В. РОИК², К.Р. УРАЗАЛИЕВ¹

¹ Казахский НИИ земледелия и растениеводства, с. Алмалыбак Алматинская область, Республика Казахстан,

² Институт биоэнергетических культур и сахарной свеклы НААНУ, г. Киев, Украина

E-mail: raushan_2008@mail.ru

Проведена ступенчатая клеточная селекция *in vitro* на хорошо пролиферирующей каллусной ткани сахарной свеклы способной к морфогенезу. В качестве селективного агента использовали 20-дневный культуральный фильтрат гриба *Fusarium oxysporum*. Установлены общие особенности поведения каллусных клеток сахарной свеклы, культивируемых в стрессовых условиях на возрастающих концентрациях культурального фильтрата – 5, 10, 15 и 20 %. В работе выявлено, что низкая концентрация КФ (культуральный фильтрат) патогена (5 %) значительно стимулирует процесс каллусогенеза, в то время как высокие концентрации (10–20 %) оказывают ингибирующий эффект. В результате клеточной и тканевой селекции были отобраны каллусы, которые сохраняли способность к нормальному росту в присутствии сублетальных концентраций селективного агента. Методом ступенчатой селекции отобрано 82 каллусные линии, которые характеризовались устойчивостью к токсическому воздействию КФ. Из выделенных каллусных линий получено 47 растений – регенерантов, адаптированных к грунту. Тестирования на устойчивость к грибу *Fusarium oxysporum* в условиях *in vivo* прошли только 24 растения.

Ключевые слова: сахарная свекла, корневая гниль, культуральный фильтрат, устойчивость, каллус, клеточная и тканевая селекция, регенерация.

Введение. Сахарная свекла (*Beta vulgaris L.*) – одна из важнейших корневых культур, используемая в качестве сырья для производства белого сахара, этанола, биогаза, кормовых добавок [1]. В Казахстане это традиционный и основной отечественный источник получения сахара. Основными регионами выращивания сахарной свеклы являются Алматинская и Жамбылская

области, но одним из факторов уменьшающих урожайность и рентабельность возделывания сахарной свеклы является пораженность почв различными возбудителями корневой гнили. Бессменное выращивание сахарной свеклы привело к созданию естественного инфицированного фона на свекловичных плантациях, накоплению патогенных микроорганизмов вызывающих корневые гнили. По данным исследований мицелиальных грибов в почве и ризосфере сахарной свеклы Алматинской области установлено преобладание фитопатогенных грибов родов *Fusarium* (20,3–28,4 %) и *Alternaria* (12,1–16 %) и доминирование среди грибов рода *Fusarium* вида *Fusarium oxysporum* до 30,4 % [2]. Для свеклосеющих регионов Казахстана необходимо создание и внедрение гибридов сахарной свеклы, устойчивых к корневым гнилям, вызываемым грибами рода *Fusarium*. При создании новых гибридов в комплексе с современными методами селекции необходимо применение методов биотехнологии, которые не уменьшают значения методов селекционной практики, а наоборот, способствует ускорению и улучшению селекционного процесса путем расширения генетического спектра полученного исходного материала, оценки и отбора полезных комбинаций [3]. Такой метод биотехнологии как клеточная селекция *in vitro* позволяет расширить спектр исходного материала и активизировать селекционный процесс, направленный на создание высокопродуктивных устойчивых к различным возбудителям линий. Генетическое варьирование в этом случае отличается более широким спектром, а отбор искомым признаков в жестких селективных условиях клетки происходит целенаправленно на уровне отдельных клеток

© Р.С. ЕРЖЕБАЕВА, А.М. АБЕКОВА,
Г.Х. БЕРСИМБАЕВА, К.Т., КОНЫСБЕКОВ,
Ш.О. БАСТАУБАЕВА, Н.В. РОИК, К.Р. УРАЗАЛИЕВ,
2019

и тканей [4]. Метод клеточной селекции широко используется для создания устойчивых к болезням линий важных для человека растений [5].

В настоящее время селективные системы *in vitro* для отбора форм устойчивых к культуральному фильтрату гриба фузариум разработаны для таких культур как: люцерна [6], ячмень [7], соя [8], пшеница [9], нут [10], сахарный тростник [11], абака [12], гвоздика [13], амарант [14] и др. Исследования по получению методом клеточной и тканевой селекции *in vitro* сахарной свеклы крайне ограничены. В опубликованных работах показана главным образом только возможность проведения регенерации растений из различных эксплантов сахарной свеклы *in vitro* как важного этапа генетической трансформации.

Целью настоящих исследований являлось получение устойчивых к культуральному фильтрату гриба *Fusarium oxysporum* линий сахарной свеклы с использованием ступенчатой клеточной селекции *in vitro*.

Материалы и методы. В исследованиях были использованы 2 материнские мужскостерильные линии – ЧС97 и ЧС1631, полученные из Института биоэнергетических культур и сахарной свеклы (г. Киев, Украина). В качестве эксплантов для получения первичных каллусов были использованы гипокотили 15–20 дневных проростков сахарной свеклы, выращенных в тепличном комплексе.

Культивирование гриба. Для приготовления культурального фильтрата (КФ) был использован гриб *Fusarium oxysporum* Schecht. Emend. Shyd. Et Hans. var. *Orthoceras* который был выделен из пораженных корневой гнилью корнеплодов сахарной свеклы, очищен, изучен и идентифицирован в предыдущих исследованиях [15]. Субкультивирование проводили на высокоскошенной агаризованной среде Чапека при температуре +4 °С.

Приготовление культурального фильтрата. Культуральный фильтрат (КФ) был получен путем выращивания кусочков колоний гриба *Fusarium oxysporum* размером 1,0 × 1,0 см, содержащего 10⁶ спор в жидкой питательной среде Чапека, в колбах объемом 250 мл. Среда Чапека с изолятом гриба культивирована в течение

20 дней, со скоростью вращения 100 об/мин, рН 6,6–7,2. По истечении 20-ти дней раствор грибов был отфильтрован через мелкопористый бумажный фильтр плотностью 80 г/м² и уровень рН был доведен до 5,8–5,9 [15, 16].

Получение первичных каллусов. Растения сахарной свеклы проращивали в условиях теплицы при освещенности 10 000 люкс, температуре воздуха 23–24 °С и 70 % влажности до стадии 15-ти дневных проростков. После отсечения корешка и первичных листьев сегмент гипокотили, длиной 2 см подвергали стерилизации и в асептических условиях помещали на стандартную питательную среду Murashige и Skoog (1962) [17] с сочетанием фитогормонов: 2 мг/л 2,4 Д и 0,4 мг/л БАП и добавлением 2,5 мг/л аскорбиновой кислоты, 30 г/л сахарозы и 5 г/л PhytoGel™, рН –5,6–5,8. Стерилизацию эксплантов проводили 0,1%-ным раствором дихлорида ртути в течение 6 мин на шейкере, а затем трижды по 3 мин промывали стерильной дистиллированной водой в ламинарном боксе. Сегменты гипокотили культивировали в течение месяца до получения первичных каллусов. Полученные каллусы отделяли от экспланта и пассировали на новую среду, того же состава для размножения.

Клеточная селекции *in vitro* с возрастающими концентрациями 5, 10, 15, 20 % КФ гриба *Fusarium oxysporum*. Полученные 100 первичных каллуса, белого цвета, размером 0,3–0,4 см пассировали в чашки Петри размером 90 см (10 каллусов/чашка Петри) на питательную среду, содержащую 5 % КФ. Культуральный фильтрат добавляли в питательную среду в концентрациях 5, 10, 15, 20 % от конечного объема перед автоклавированием. В контрольном варианте питательной среды КФ был заменен равным объемом среды Чапека. На контрольный вариант посажено так же 100 каллусов. В общей сложности посажено 400 каллусов 2 линий. Каллусы инкубировали при температуре 23 ± 2 °С, в темноте, в течение 30 дней. Каждые 10 дней проводились наблюдения за цветом каллусов, оценкой размера каллусов и наличием некрозов. Все параметры оценивались в начале и конце пассажа. Выжившие каллусы ступенчато пассировались на более высокие концентрации КФ. Процент

выживших каллусов на селективной среде был высчитан из общего количества пересаженных каллусов. Устойчивые каллусы после селективной среды с 20 % концентрацией КФ были выращены с целью размножения в течение 30 дней на безселективной среде содержащей 0,1 % активированного угля.

Регенерация растений. Полученные устойчивые каллусы были перенесены на питательную среду Murashige & Skoog содержащую 15 мг/л БАП, 1 мг/л НУК, 2,5 мг/л аскорбиновой кислоты, 30 г/л сахарозы и 6 г/л агар, рН – 5,6–5,7. Каллусы культивировали при освещенности 8–10 тыс. люкс, 70 % влажности и температуре 16–18 °С [18]. Для укоренения полученные побеги (длиной 2–3 см) переносили на среду Murashige & Skoog, содержащую 2 мг/л НУК, 0,1 мг/л гиббереллиновой кислоты, 40 г/л сахарозы, 7 г/л агара. Культивирование растений проводили при температуре воздуха 16–18 °С.

Адаптация к грунту. После развития корневой системы растения переносили в торфяные стаканчики, заполненные простерилизованной почвой. Для почвы были взяты торф,

вермикулит и песок (1 : 1 : 1). Высаженные растения помещались в климатическую камеру (BINDER, Германия) где были созданы условия для их адаптации – поддерживались температурный режим 20 °С, освещение 8–10 тыс. люкс и 80 % влажности. В течение первых двух недель (период адаптации) растения-регенеранты опрыскивали раствором фитогормонов (0,5 мг/л кинетин, 2 мг/л гиббереллиновая кислота, 3 мг/л никотинамид).

Тестирование растений – регенерантов на устойчивость к патогену *in vivo*. Искусственное заражения *F. oxysporum* проводили по Walker J.C. Plant Pathology (1950) [19]. Проростки растений сахарной свеклы высаживали в стерилизованную нагреванием торфяную почву (120 °С) в рассадочных кассетах. Выращивали растения сахарной свеклы при температуре 24–30 °С в теплице. Когда проростки достигли стадии 3–4-х листьев, их корни повреждали продольным срезом стерильного скальпеля. В сделанную ножом бороздку вводили суспензию конидий и фрагментов гифов гриба *F. oxysporum*, приготовленную из свежепересажен-

Таблица 1. Многоступенчатая клеточная и тканевая селекция на устойчивость КФ гриба *Fusarium oxysporum* в условиях *in vitro*

Генотип	Прирост размера каллуса, см		Количество каллусов с высокой степенью потемнения цвета, %		Количество каллусов с высокой степенью некроза, %		Количество выживших каллусов, шт., %	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
5 % КФ								
ЧС1631	0,25	0,30	0	29,0	0	54,0	100	51
ЧС97	0,24	0,66	0	36,0	0	38,0	100	57
10 % КФ								
ЧС1631	0,28	0,10	0	45,0	0	53,0	100	64
ЧС97	0,33	0,19	0	10,0	0	19,0	100	79
15 % КФ								
ЧС1631	0,28	0,08	0	58,0	0	52,0	98	75
ЧС97	0,27	0,09	0	44,0	0	48,0	100	84
20 % КФ								
ЧС1631	0,23	0,11	0	10,0	0	0	100	96
ЧС97	0,25	0,12	0	2	0	0	100	100

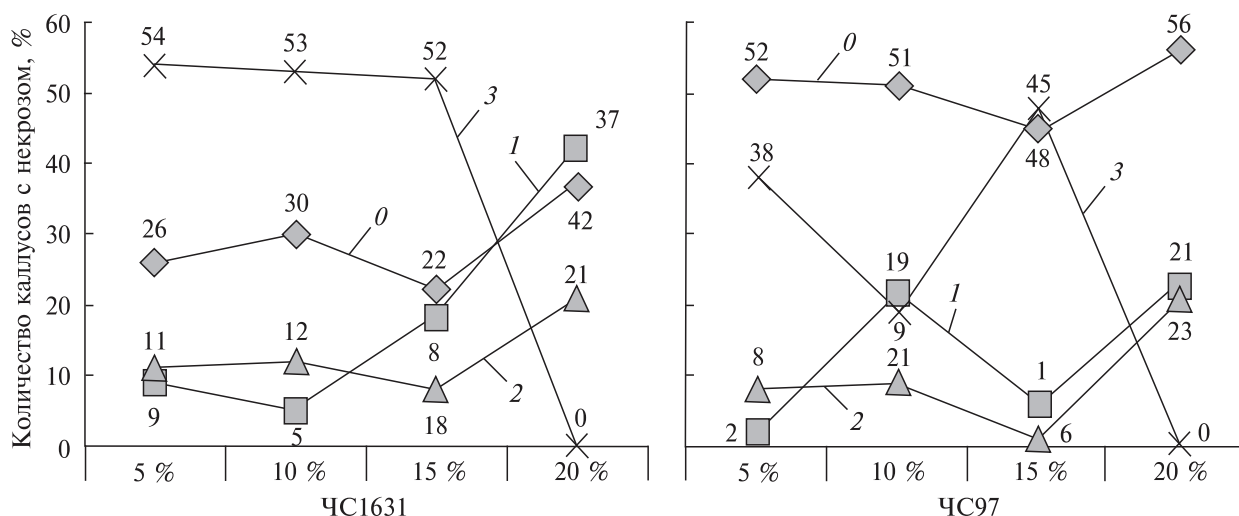


Рис. 1. Проявление некроза каллуса на возрастающих концентрациях КФ гриба на конец пассажа (0 – отсутствие некроза; 1 – локальный некроз; 2 – средний некроз; 3 – тотальный некроз)

ных на среде Чапека быстро растущих культур. Заражение повторили через 10 дней. Через 30 дней после первого заражения учитывали симптомы поражения. Проводили визуальную оценку по степени увядания листьев проростков и почернения черешков у основания листьев и загнивания корневой системы по шкале: 0 – Высокоустойчивые (УУ) – слабое пожелтение листьев 0–15 %; 1 – Устойчивые (У) – увядание нижних листьев и почернение черешков на 16–30 %; 2 – среднеустойчивые (С) – увядание листьев и почернение черешков на 31–50 %; 3 – восприимчивые (В), усыхание листьев на 51–70 %; 4 – высоковосприимчивые (ВВ), усыхание листьев на 71–100 % и гибель растения.

Статистический анализ. Статистическая обработка выполнена на языке программирования R (R version 3.2.3 (2015-12-10) – «Wooden Christmas-Tree») с открытым исходным кодом. Проведены стандартные параметрические тесты с использованием встроенных библиотек и дополнительных пакетов (dplyr, ggplot, psch и др.): регрессионный анализ и статистическая достоверность – Analysis of Variance (ANOVA). Введена номенклатура морфологических признаков каллуса: цвет каллуса: 2 – белый; 3 – желтый; 4 – серо-белый; 5 – темно-серый; 6 – коричневый; 7 – темно-коричневый); некроз: 0 – отсутствие некроза; 1 – локальный некроз; 2 – средний некроз; 3 – тотальный некроз.

Результаты исследований и их обсуждение. Для получения стабильно устойчивых к культуральному фильтрату гриба *Fusarium oxysporum* каллусных линий проведена ступенчатая клеточная селекция с каллусами двух линий ЧС 1631 и ЧС97. На селективной среде содержащей 5 % КФ зафиксирован интенсивный рост каллусов, при этом у линии ЧС1631 он составил 0,3 см, а у линии ЧС97 0,66 см (табл. 1). Прирост каллусов линии ЧС97 превышал прирост контроля на 175 %. Культивирование каллусов на селективной среде 5 % КФ приводило к потемнению до 29–36 % каллусов и появлению некротических изменений, приводящих к гибели. Процент выживших каллусов на данной селективной среде составил 57 % у ЧС97 и 51 % у ЧС1631. Все выжившие каллусы были выделены, если требовалось разделение, были разделены до 0,4 см и пересажены на следующую ступень клеточной селекции – 10 % КФ.

На 10 % КФ проведен жесткий отбор по устойчивости к селективному агенту. Интенсивное потемнение цвета каллусов к концу пассажа было зафиксировано у линии ЧС1631 29 % с темно коричневым цветом и 16 % с коричневым цветом), при этом у линии ЧС97 потемнение отмечено только у 10 % каллусов (рис. 1). Тотальные некротические образования наблюдались у 19–53 % каллусов (табл. 1 и рис. 2). Не устойчивые каллусные клетки погибали,

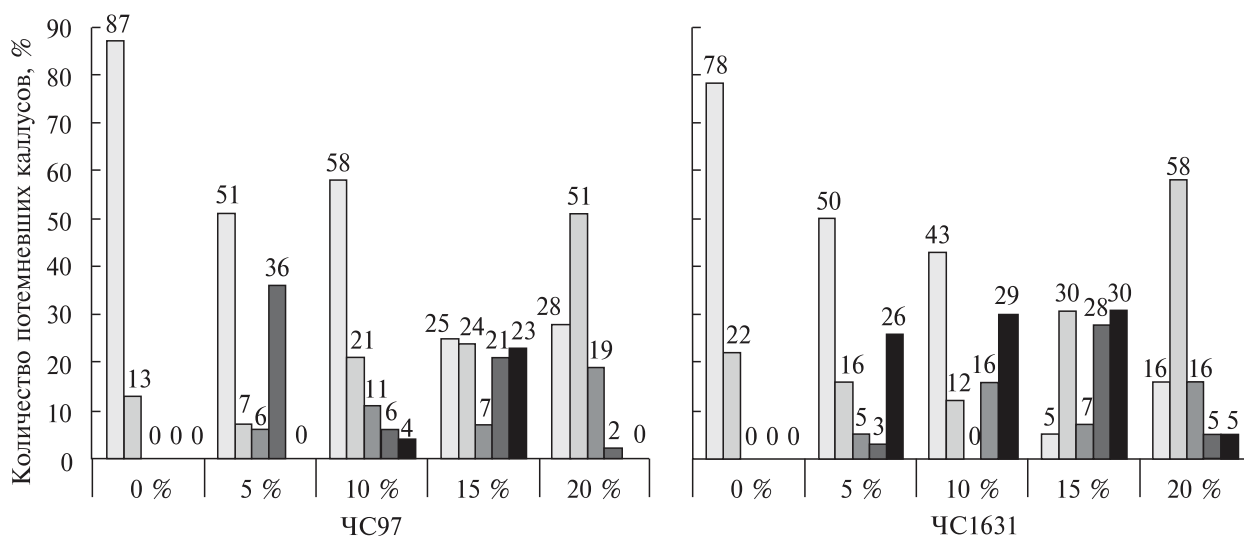


Рис. 2. Цвет каллуса на возрастающих концентрациях КФ гриба

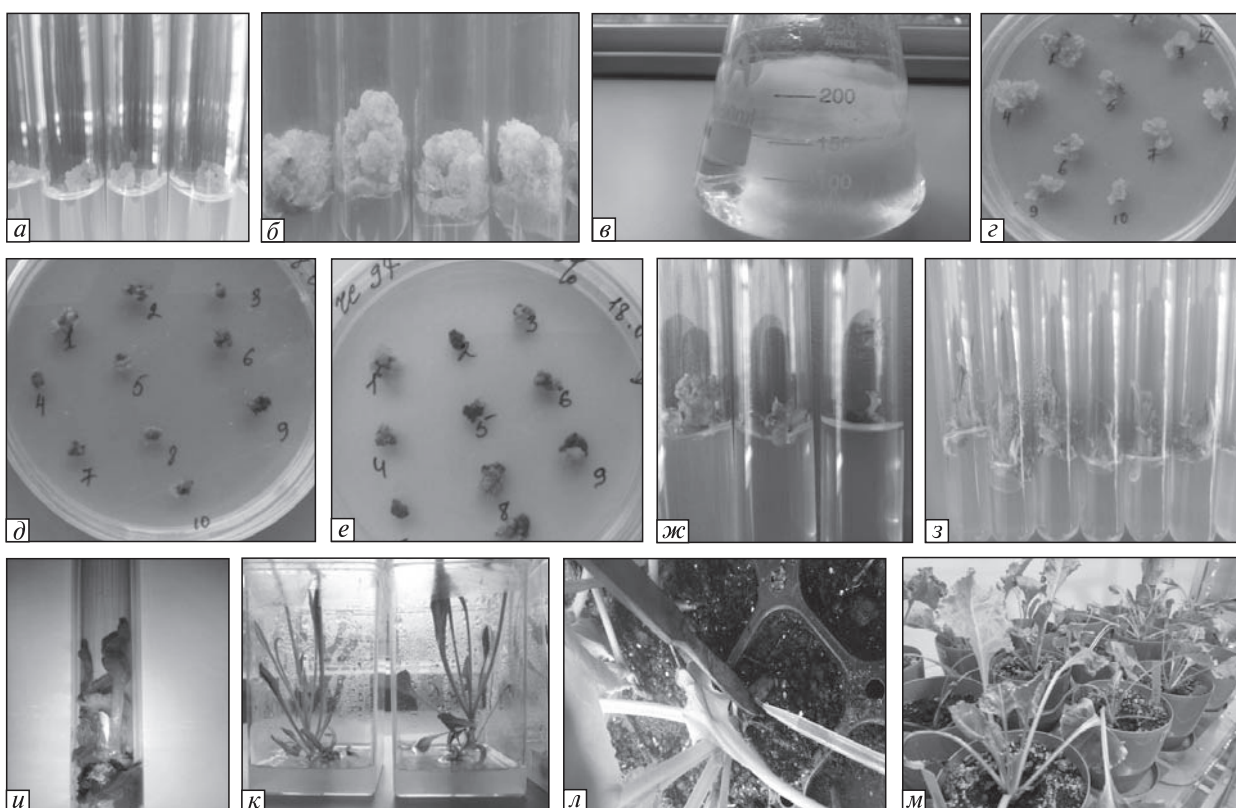


Рис. 3. Различные этапы многоступенчатой тканевой селекции сахарной свеклы: а, б – первичные каллусы (30 дней и 60 дней культивирования); в – культуральный фильтрат гриба *Fusarium oxysporum*; г – каллусы на питательной среде без селективного агента; д – каллусы на питательной среде с 10 % КФ; е – выжившие каллусы на среде с 15 % КФ; ж – морфогенез, формирование почек; з, и – регенерация побега; к – растения сахарной свеклы на среде для корнеобразования; л – искусственное заражение растений суспензией спор и гифов гриба; м – устойчивые растения в светокультуральной комнате

а устойчивые каллусные клетки продолжали расти, и имели белый цвет (рис. 3). Прирост размера каллусов составил 0,10–0,19 см, что составляет 35,7–58 % от контроля.

Все устойчивые каллусные линии были отобраны и пассированы на сублетальную дозу, селективную среду с 15 % КФ. Высокая концентрация селективного агента к концу пассажа вызвала некроз 48–52 % и потемнение каллусов до 44–58 % культивируемых каллусов, но за счет того, что среди некротированных каллусов были выделены группы клеток, продолжавших расти, и делится на селективном фоне (рис. 3, е), выживаемость каллусов составила 75–84 %.

На последней ступени селекции с высоким содержанием КФ (20 %) отобранные каллусные линии продолжали расти. Прирост составил 0,11–0,12 см. Тотальный некроз не был зафиксирован, на некоторых каллусах наблюдали частичный локальный некроз. Выживаемость каллусных линий, культивируемых на данной ступени, была высокая – 96–100 %.

Проведен статистический анализ (дисперсионный и регрессионный) по влиянию трех факторов – различных концентраций КФ, продолжительности культивирования и генотипа на такие показатели как рост размеров кал-

луса, некроз и цвет. Результаты показали высокую достоверность, за исключением доли влияния генотипа на изменения цвета при культивировании (табл. 2 и 3).

Все устойчивые каллусы были отобраны и пересажены на питательную среду без селективного агента и субкультивировались 2 пассажа. По истечении 40 дней проведен отбор истинно устойчивых клеток каллуса при повторном возврате на селективную среду с 15 % КФ. Культивирование длилось 30 дней. Выявлены каллусы, у которых наблюдалась адаптация, и после среды без селективного агента устойчивость не проявилась. Из посаженных 90 шт. каллусов устойчивость проявили 82. Устойчивые каллусы после селективной среды с 15 % концентрацией КФ были выращены в течение 60 дней на безселективной среде содержащей 0,1 % активированного угля с целью размножения и в дальнейшем пересажены на питательную среду для инициации регенерации растений.

При использовании высоких концентраций фитогормона БАП и соблюдении условий культивирования согласно протокола Ху, Q.L., 2009 г. [17] зафиксирована регенерация растений сахарной свеклы, при которой у одного каллуса отмечалось несколько меристематичес-

Таблица 2. Дисперсионный анализ

Факторы	Степень свободы Df	Сумма квадратов SS	Среднее по квадрату MS	F-критерий	Pr(> F)
<i>Размер каллуса</i>					
Питательная среда, % КФ	4	17,568	4,3919	167,42	< 2,2e-16 ***
Продолжительность культивирования, дни	2	23,091	11,5454	440,11	< 2,2e-16 ***
Генотип	1	4,027	4,0269	153,51	< 2,2e-16 ***
<i>Цвет каллуса</i>					
Питательная среда, % КФ	4	981,75	245,437	171,6612	< 2,2e-16 ***
Продолжительность культивирования, дни	2	419,09	209,547	146,5598	< 2,2e-16 ***
Генотип	1	2,67	2,666	1,8647	0,1722
<i>Некроз каллуса</i>					
Питательная среда, % КФ	4	237,65	59,412	89,923	< 2,2e-16 ***
Продолжительность культивирования, дни	2	293,69	146,847	222,260	< 2,2e-16 ***
Генотип	1	10,70	10,701	16,196	5,916e-05 ***

Примечание. Достоверность опыта Pr(> F) 0 ***, 0,001 **, 0,01 *.

ких очагов и регенерировало от 3 до 6 растений. По итогам регенерации получено 85 растений-регенерантов сахарной свеклы, из устойчивых к действию культурального фильтрата каллусов и 126 растений контроля (табл. 4 и рис. 3, ж, з).

Среди полученных 211 растений укоренение было зафиксировано у 127 (61 %). Сложный процесс адаптации грунту в условиях климатической камеры прошли 109 растений (86 %), из них 47 растений опыта и 62 растения контроля.

После адаптации растений к грунту проведено тестирование полученных растений-регенерантов на устойчивость грибу *Fusarium oxysporum* в условиях *in vivo*. Устойчивость полученных растений-регенерантов оценивали по шкале 0–4 баллов в зависимости от состояния растений после искусственного заражения. По результатам оценки устойчивости выделено 24 растения из 36, показавшие 1–2 балла устойчивости. Интересно отметить, что из 62 контрольных растений устойчивость показали, лишь 10.

Таблица 3. Регрессионный анализ

Статистические параметры	Питательная среда				
	Контроль, 0 % КФ, свободный коэффициент	5 % КФ	10 % КФ	15 % КФ	20 % КФ
<i>Размер каллуса</i>					
Коэффициент регрессии	0,322258	0,139000	-0,076086	-0,113469	0,083616
Стандартная ошибка	0,009042	0,009351	0,010884	0,010864	0,013808
t-критерий	35,640	14,865	-6,991	-10,444	6,056
Pr(> t)	< 2e-16 ***	< 2e-16 ***	3,67e-12 ***	< 2e-16 ***	1,65e-09 ***
<i>Цвет каллуса</i>					
Коэффициент регрессии	1,54842	0,87000	1,14044	1,96820	1,68716
Стандартная ошибка	0,06675	0,06904	0,08035	0,08021	0,10194
t-критерий	23,196	12,602	14,193	24,539	16,551
Pr(> t)	< 2e-16 ***	< 2e-16 ***	< 2e-16 ***	< 2e-16 ***	< 2e-16 ***
<i>Некроз каллуса</i>					
Коэффициент регрессии	-0,32424	0,60167	0,75882	0,92422	0,67493
Стандартная ошибка	0,04538	0,04693	0,05462	0,05452	0,06930
t-критерий	-7,145	12,821	13,892	16,951	9,740
Pr(> t)	1,23e-12 ***	< 2e-16 ***	< 2e-16 ***	< 2e-16 ***	< 2e-16 ***

Таблица 4. Результаты регенерации растений и их тестирования на устойчивость к КФ в условиях *in vivo*

Генотип	Вариант опыта	Количество полученных растений, шт., % регенерации	Укоренение, шт., %	Адаптация к грунту, шт., %	Количество устойчивых к КФ растений, шт., балл
ЧС1631	опыт	38 (10,8)	26 (68)	22 (85)	13
	контроль	60 (37)	34 (57)	28 (82)	6
ЧС97	опыт	47 (16,7)	29 (62)	25 (86)	11
	контроль	66 (40,6)	38 (58)	34 (89)	4
Итого		211 (26,2)	127(61)	109 (86)	34

На начальной ступени культивирования каллусов с низкой концентрацией 5 % КФ отмечен интенсивный рост каллусов. Регрессионный анализ показал положительный коэффициент регрессии 0,139000, при контроле 0,322258. Это возможно свидетельствует о том, что 5 % КФ стимулировал рост каллусных клеток. Данные результаты согласуются с результатами исследований Калашниковой Е.А., проводимых на пшенице, моркови и картофеле [16]. При этом данная концентрация КФ позволила выделить устойчивые группы каллусных клеток (43–49 %). В дальнейшем селекция была проведена уже с более устойчивыми каллусами и процент выживаемости был выше. На рост и деление каллусных клеток наиболее сильное ингибирующее действие оказали 10 и 15 % концентрация КФ, о чем свидетельствует отрицательный коэффициент регрессии $-0,076086$ и $-0,113469$ соответственно.

Анализ роста размеров каллусов показал, что после пересадки на селективную среду (5, 10, 15 % КФ) в течение первых 10 дней идет адаптация каллусов и дальнейший более интенсивный рост наблюдается к 20–30 дням культивирования. На последней ступени селекции *in vitro* с высокой концентрацией 20 % КФ отобранные устойчивые каллусные линии начинали расти сразу после пассирования на селективную среду.

Проведенный регрессионный анализ по влиянию возрастающих концентраций на цвет и некроз каллусов показал, что с увеличением концентрации зафиксировано увеличение некрозов и потемнения каллусов. Исключением является последняя ступень – 20 % КФ, на которой культивировались наиболее устойчивые каллусы, у которых потемнение каллуса и некротические образования проявлялись в меньшей степени, чем при более низких концентрациях КФ.

Инициация регенерации растения, это один из важных этапов любой клеточной технологии. Регенерация растений сахарной свеклы из различных эксплантов (прямая регенерация и каллусы) один из широко изучаемых вопросов. По данным исследователей регенерация из каллусов сахарной свеклы составля-

ет 10–51 % [20–24]. В наших исследованиях регенерация побегов из каллусов составила 26,2 %, в том числе из каллусов в контрольном варианте контроля в пределах 37–40,6 %, из каллусов на экспериментальных средах 10,8–16,7 %. Снижение и потеря морфогенетического потенциала каллусов вероятно является следствием негативного влияния селективного фактора на процессы регенерации селективируемых каллусных культур [4, 16].

Не менее важным этапом является процесс укоренение и адаптации к грунту. Культивирование растений на этапе укоренения при высоких концентрациях сахарозы (40 г/л) и температуре воздуха 16–18 °С позволило достигнуть адаптации 86 % пересаженных растений.

Ценность полученных растений была подтверждена путем оценки на устойчивость грибу *Fusarium oxysporum* в условиях *in vivo*.

Выводы. В результате клеточной и тканевой селекции были отобраны каллусы, которые сохраняли способность к нормальному росту в присутствии сублетальных концентраций селективного агента. Методом ступенчатой селекции отобрано 82 каллусные линии, которые характеризовались устойчивостью к токсическому воздействию КФ. Из выделенных каллусных линий получено 47 растений – регенерантов, адаптированных к грунту. Тестирования на устойчивость к грибу *Fusarium oxysporum* в условиях *in vivo* прошли только 24 растения.

Соответствие этическим стандартам. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют никакого конфликта интересов нет.

Финансирование. Работа выполнена в рамках финансирования Комитета науки МОН РК по бюджетной программе 217 «Развитие науки», подпрограмме 102 «Грантовое финансирование научных исследований» проекту № 4785/ГФ4.

CELL SELECTION OF SUGAR BEET
IN VITRO FOR RESISTANCE TO CULTURAL
FILTRATE OF *FUSARIUM OXYSPORUM*

R.S. Yerzhebayeva, A.M. Abekova,

G.H. Bersimbaeva, K.T. Konysbekov,
S.O. Bastaubaeva, N.V. Roik, K.R. Urazaliev

Kazakh Scientific Research Institute of Agriculture
and Plant Growing, Almalyk village, Almaty Region,
Republic of Kazakhstan,
Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet,
NAAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

E-mail: raushan_2008@mail.ru

Stepwise selection *in vitro* was conducted on well-proliferating callus tissue of sugar beet, capable of morphogenesis. The 20-day-old cultural filtrate of *Fusarium oxysporum* was used as a selective agent. Common specificities of the behavior of sugar beet callus cells, cultivated in stress conditions with increasing concentrations of the cultural filtrate were determined – 5, 10, 15 and 20 %. The research revealed that low concentration of the cultural filtrate (CF) of the pathogen (5 %) stimulated callusogenesis process considerably, whereas high concentrations (10–20 %) had an inhibiting effect. Cell and tissue selection allowed selecting the calluses, which preserved their capability of normal growth in the presence of sublethal concentrations of the selective agent. The method of stepwise selection was used to select 82 callus lines, characterized by their resistance to the toxic impact of CF. The isolated callus lines were used to obtain 47 regenerant plants, adapted to soil conditions. Only 24 plants passed the testing for resistance to *Fusarium oxysporum in vivo*.

КЛІТИННА СЕЛЕКЦІЯ *IN VITRO* КАРТОПЛЯРСТВА НА СТІЙКІСТЬ ДО КУЛЬТУРАЛЬНОГО ФІЛЬТРАТУ ГРИБА *FUSARIUM OXYSPORUM*

Р.С. Ержебаєва, А.М. Абекова, Г.Х. Берсимбаєва,
К.Т. Конисбеков, Ш.О. Бастаубаєва,
Н.В. Роїк, К.Р. Уразалієв

Проведено ступінчасту клітинну селекцію *in vitro* на добре проліферуючій калусній тканині цукрових буряків, здатної до морфогенезу. Як селективний агент використовували 20-денний культуральний фільтрат гриба *Fusarium oxysporum*. Встановлено загальні особливості поведінки калусних клітин цукрових буряків, що культивуються в стресових умовах на зростаючих концентраціях культурального фільтрату – 5, 10, 15 і 20 %. У роботі виявлено, що низька концентрація КФ (культуральний фільтрат) патогена (5 %) значно стимулює процес калусогенеза, в той час як високі концентрації (10–20 %) надають інгібуючий ефект. В результаті клітинної і тканинної селекції було відібрано калуси, які зберігали здатність до нормального зростання

в присутності сублетальних концентрацій селективного агента. Методом ступінчастої селекції відібрано 82 калусних лінії, які характеризувалися стійкістю до токсичного впливу КФ. З виділених калусних ліній отримано 47 рослин – регенерантів, адаптованих до ґрунту. Тестування на стійкість до грибу *Fusarium oxysporum* в умовах *in vivo* пройшли тільки 24 рослини.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. McGrath J.M., Townsend B.J. Sugar Beet, Energy Beet, and Industrial Beet. Industrial Crops. Handbook of Plant Breeding, 2015, vol 9. Springer, New York, doi: 10.1007/978-1-4939-1447-0_5.
2. Maui, A., Urazaliev, K., and Abekova, A., Diseases of sugar beet in Kazakhstan In book: Agricultural research updates, 2016, *Nova sci. publ.*, New York, vol. 12, no. 9, pp. 143–71.
3. Podvigina, O.A., Teoreticheskoe obosnovanie i priemy ispol'zovaniya metodov biotekhnologii v selekcii saharnoi svekly: dis. dok. s.-h. nauk: 06.01.05/ Voronezhskii agrarnyi universitet. 2003, pp. 280. OD, 71:04-6/37-2.
4. Soboleva, G.V. Influence of osmotic stress on processes of growth and morphogenesis in long-term callus cultures of pea (*Pisum Sativum* L.). *Sci. Prod. J. «Grain legumes and cereal crops»*, 2013, no. 1(5), pp. 8–15. [In Russian].
5. Rao, S., Sandhya, H., *In Vitro* Selection of Disease-Resistant Plants. Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement, 2016, Springer, Singapore. doi: 10.1007/978-981-10-1917-3_17.
6. Binarová, P., Nedělník, J., Fellner, M., and Nedbálková, B., Selection for resistance to filtrates of *Fusarium* spp. in embryogenic cell suspension culture of *Medicago sativa* L., *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1990, vol. 22, no. 3, pp. 191–6. doi: 10.1007/BF00033635.
7. Chawla, H.S., Wenzel, G., *In vitro* selection for fusaric acid resistant barley plants, *Plant Breed*, 1987, vol. 99, pp.159–163. doi: 10.1111/j.1439-0523.1987.tb01166.x.
8. Hashem, E.A, Abdalla, H.E, Hussein, Y.A, and Abd-Elnabi, M.A., *In vitro* selection of soybean callus resistant to *Fusarium oxysporum* metabolites. Proceedings Third Environment Conference, Faculty of Sci., Zagazig Univ., 2008, pp 1–19.
9. Kasem, Z.A., Mesterházy, B., Bartyk, T., and Sági F., *In vitro* techniques for selecting wheat (*Triticum aestivum* L.) for *Fusarium*-resistance. II. Culture filtrate technique and inheritance of *Fusarium*-resistance in the somaclones, *Euphytica*, 1996, vol. 91, no. 3, pp. 341–9. doi: 10.1007/BF00033096.

10. Khan, I.A., Alam, S.S., and Jabbar, A., Purification of phytotoxin from culture filtrates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* and its biological effects on chickpea, *Pak. J. Bot.*, 2004, vol. 36, pp. 871–80.
11. Mahlanza, Tendekai, Rutherford, R., Stuart, Snyman, Sandy J., and Watt, M.P., In vitro generation of somaclonal variant plants of sugarcane for tolerance to *Fusarium sacchari*, *Plant Cell Reports*, 2013, vol. 32, no. 2, pp. 249–62. doi: 10.1007/s00299-012-1359-0.
12. Purwati, R.D., Harran, S., and Sudarsono In vitro selection of abaca for resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense*, *Hayati J. Biosci*, 2007, vol. 14, no. 2, pp. 65–70. doi: 10.4308/hjb.14.2.65.
13. Esmaili, N.M., Al-Doss, A.A., and Barakat, M.N., In vitro selection for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and detection of genetic polymorphism via RAPD analysis in carnation, *Med. Plants Res.*, vol. 6, no. 23, pp. 3997–4004. doi: 10.5897/JMPR12.150.
14. Chen, W., Swart, W.J., The *in vitro* phytotoxicity of culture filtrates of *Fusarium oxysporum* to five genotypes of *Amaranthus hybridus*, *Euphytica*, 2002, vol. 127, pp. 61–7. doi: 10.1023/A:1019980600219.
15. Urazaliev, K., Abekova, A., Bazylova, T., Bersimbaeva, G., Daniyarova, A., and Massonichich-Shotunova, R., Somaclonal variation of sugar beet resistant to pathogenic root rot *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras*, *Genetika*, 2013, vol. 45, pp. 629–40. doi: 10.2298/genr1303629u.
16. Kalashnikova, E.A., Kletochnaya selekciya rastenii na ustoichivost k gribnym boleznyam: dis. ... dokt. biol. nauk: 03.00.23/Moskovskaya sel'skhozyaistvennaya akademiya im. K.A. Timiryazeva, M., 2003, 279 p. OD, 71:04-3/116.
17. Murashiga, T., Skoog F., A Revised medium for Rapid growth and Bio Assays with tobacco culture, *Physiol. Plantarum*, 1962, vol. 15, pp. 473–97. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
18. Xu, Q.L., Xie, Y.H., Ru, H., Hu, X., Wang, Ch.Y., and Wang, X.Yu., Efficient plant regeneration in vitro from red leaf beet via organogenesis, *Rus. J. Plant Physiol.*, 2009, vol. 56, no. 4, pp. 546–50. doi: 10.1134/S1021443709040153.
19. Walker, J.C., *Plant Pathology*, 1969 Third edition. NewYork: McGraw-Hill Book, 165 p.
20. Freytag, A. H., Anan S. C., Rao-Ardelli A. P., and Owens, L.D., An improved medium for adventitious shoot formation and callus induction in *Beta vulgaris* L. *in vitro*, *Plant. Cell. Rep.*, 1988, vol. 7, pp. 30–4. doi: 10.1007/BF00272972.
21. Golovko, A.E., Dovzhenko, A.A., Gleba, Yu.Yu., Genetic transformation of sugar beet: the evolution of attitudes and methodological approaches, *Cytol. Genet.*, 2005, vol. 39, no. 3, pp. 30–6. (In Russian).
22. Hisano, H., Kimoto, Y., Hayakawa, H. Takeichi, J., Domae, T., Hashimoto, R., Abe, J., Asano, S., Kanazawa, A., and Shimamoto, Y., High frequency Agrobacterium mediated transformation and plant regeneration via direct shoot formation from leaf explants in *Beta vulgaris* and *Beta maritima*, *Plant. Cell. Rep.*, 2004, vol. 22, pp. 910–18. doi: 10.1007/s00299-004-0773-3.
23. Dovzhenko, A., Koop, H., Sugarbeet (*Beta vulgaris* L.): shoot regeneration from callus and callus protoplasts, *Planta*, 2003, vol. 217, pp. 374–81. doi: 10.1007/s00425-003-1006.
24. Mishutkina, Ya. V., Gaponenko, A.K., Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) Morphogenesis in Vitro: Effects of Phytohormone Type and Concentration in the Culture Medium, Type of Explants, and Plant Genotype on Shoot Regeneration Frequency, *Rus. J. Genet.*, 2006, vol. 42, no. 2, pp. 150–7. doi: 10.1134/S1022795406020086.

Поступила в редакцию 06.09.17
После доработки 18.11.18
Принята в печать 18.07.19