

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 1, Number 313 (2016), 55 – 63

***In vitro SELECTION OF POTATO CELL CULTURES
WITH CULTURAL FILTRATE OF *Fusarium solani****

N. P. Malakhova, L. D. Galieva, A. Khassein, A. A. Kalieva, B. K. Tezekbayeva, E. R. Maltseva

M. A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, CS MES RK, Almaty, Kazakhstan.
E-mail: tasha_malakhova@mail.ru

Keywords: potato, *in vitro* cultured cells, cell selection, cultural filtrate, *Fusarium solani*.

Abstract. Cell selection of potato callus and suspension cultures (varieties Aksor and Nevskiy) was carried out with the goal to create new lines of potato. Cultural filtrate was obtained from two isolates of *Fusarium solani* - №1066 and №1067. Conditions were optimized for the selection of potato cell cultures with cultural filtrate of fungus *Fusarium solani*. Cell (callus and suspension) cultures of potato from domestic varieties Aksor and Nevskiy were obtained. Selective activity of each cultural filtrate was evaluated depending on the cell culture yield. Optimal percent of cultural filtrate in the selective media was established for each isolate of the studied fungus. Lethal doses of cultural filtrate for cell cultures of each potato variety were established depending on the fungal isolate. Cell selection method with cultivation of potato cells in cultural filtrate of *Fusarium solani* isolates №1066 and № 1067 was used to acquire suspension and callus cultures of potato of both varieties with increased resistance to cultural filtrate of *Fusarium* sp.

УДК 57.085; 635.032

***In vitro СЕЛЕКЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР КАРТОФЕЛЯ
С КУЛЬТУРАЛЬНЫМ ФИЛЬТРАТОМ ГРИБА *Fusarium solani****

Н. П. Малахова, Л. Д. Галиева, А. Хасейн, А. А. Калиева, Б. К. Тезекбаева, Э. Р. Мальцева

РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина» КН МОН РК,
Алматы, Казахстан

Ключевые слова: картофель, культивируемые *in vitro* клетки, клеточная селекция, культуральный фильтрат *Fusarium solani*.

Аннотация. Для получения новых линий картофеля отечественных сортов с повышенной устойчивостью к фузариозному заболеванию проведена клеточная селекция каллусных и суспензионных культур картофеля отечественных сортов «Аксор» и «Невский». Наработан культуральный фильтрат двух изолятов, обозначенных как №1066 и №1067 гриба *Fusarium solani*. Проведен подбор условий для селекции клеточных культур картофеля с культуральным фильтратом гриба *Fusarium solani*. Получены клеточные (каллусные и суспензионные) культуры картофеля отечественных сортов «Аксор» и «Невский». Проведена оценка селективной активности каждого культурального фильтрата в зависимости от прироста клеточной культуры. Выявлено оптимальное процентное содержание культурального фильтрата в селективной среде для каждого изолята исследуемого гриба. Определены летальные дозы культурального фильтрата использованного для клеточных культур каждого сорта картофеля в зависимости от изолята гриба. Методом клеточной селекции при культивировании с культуральным фильтратом исследуемых изолятов №1066 и № 1067 гриба *Fusarium solani*, получены селективные суспензионные и каллусные культуры картофеля обоих сортов, с повышенной устойчивостью к культуральному фильтрату *Fusarium solani*.

Введение. В связи с исключительной значимостью картофеля как продуктowego кормового ресурса, обусловленного высоким содержанием крахмала, белка, витаминов и прочих ценных веществ, снижение потерь урожая этой сельскохозяйственно важной культуры является одной из наиболее актуальных задач современной биотехнологии и агротехники.

Инфекционные болезни картофеля вызываются различными организмами: грибами, бактериями, вирусами, вироидами, фитоплазмами, нематодами и др. Их отличительным признаком является способность передаваться от одного растения к другому. Среди всех грибных болезней, наиболее значительный вред картофелеводству причиняет фузариоз, или сухая гниль картофеля. Заболевание вызывается фитопатогенными грибами рода *Fusarium solani*, которые присутствуют в почвах разных типов и могут сохраняться в виде спор в течение многих лет. По вредоносности сухая гниль занимает второе место после фитофтороза. Основным источником инфекции являются растительные остатки, почва и слабозаражённые клубни. Больные посадочные клубни являются причиной изреживания всходов, замедленного роста и развития растений. Хозяйственный ущерб при проявлении этой болезни выражается в потере большого количества клубней на протяжении всего срока хранения, которое может достигать 20-30 % от общей массы. Сложность борьбы с фузариозом, заключается в том, что признаки болезни проявляются лишь по истечении 2-3 месяцев хранения. Фузариоз картофеля распространен повсеместно и является причиной потерь картофеля в течение зимне-весеннего сезона [1, 2].

В мировом генофонде картофеля отсутствуют сортовые и межвидовые образцы картофеля абсолютно устойчивые к данному патогену. Особенно сильно от данной болезни страдают восприимчивые, но ценные сорта картофеля, качество клубней которых значительно снижается в процессе хранения. Повышение устойчивости перспективных сортов картофеля к фузариозу можно осуществлять за счет использования современных методов биотехнологии и клеточной биологии [3].

Использование клеточной селекции для получения новых форм сельскохозяйственно важных растений является широко распространенной практикой в крупных коммерческих организациях по производству овощей и фруктов во всем мире. Применяемые методы клеточной селекции позволяют в короткий срок производить отбор клеток, устойчивых к интересующему селективному фактору. Преимущество отбора в культуре *in vitro* клеток с заданными свойствами достигается клеточной селекцией, при использовании в качестве селективного агента токсинов белковой и небелковой природы, выделенных из патогенных грибов. В клеточной селекции растений часто используют токсины, продуцируемые фитопатогенными грибами. Например, фитотоксины, продуцируемые грибами рода *Fusarium* (фузариевая кислота, кульмомаразмин, ликомаразмин, мартицин), были использованы в клеточной селекции томатов и картофеля, вызывая симптомы, аналогичные при непосредственном (прямом) контакте с патогеном [4-9]. На бобовых культурах Huang Y.H., Hartman G.L. для получения болезнеустойчивых форм использовали культуральный фильтрат токсигенного штамма *F. solani* f. sp. *glycines* [10]. Одним из токсинов, продуцируемых грибами рода *Fusarium*, является фузариевая кислота, которая проявляет умеренную токсичность в отношении животных, но вызывает симптомы фузариоза на растениях [11]. Фузариевая кислота была использована для создания толерантных к фузариозу растений банана (*Musa acuminata*), гладиолуса (*Gladiolus communis*), томата (*Solanum lycopersicum*) [12, 13]. На горохе (*Pisum sativum* L.) методы клеточной селекции на устойчивость к фузариозу были описаны в работах [12, 14].

Целью данного исследования являлось проведение *in vitro* селекции клеточных культур картофеля с культуральным фильтратом двух изолятов гриба *Fusarium* spp. для получения новых форм отечественных сортов картофеля «Аксор» и «Невский» с повышенной устойчивостью к фузариозу.

Материалы и методы исследований

Объектами исследований служили клеточные культуры картофеля отечественных сортов «Аксор» и «Невский».

Получение первичной каллусной культуры (КК) проводилось из эксплантов здоровых пробирочных растений, полученных из верхушечных (апикальных) меристем подготовленных стерилизованных клубней картофеля, культивируемых на искусственных питательных средах в

помещении с контролируемым световым и температурным режимом [14, 15]. Для получения каллусных культур картофеля использована универсальная среда Мурасиге и Скуга (МС) с содержанием витаминов - 5,0 мг/л, сахарозы 30 г/л и гормонов: кинетина - 0,5 мг/л; БАП - 2,0 мг/л, НУК - 0,5 мг/л. Каллусы высаживались в чашки Петри с агаризованной средой и культивировались в термостате при постоянной температуре 24⁰С и 70%-ной влажности воздуха, без освещения [16, 17].

Для получения суспензионной культуры (СК) из каллусов вычленяли морфогенные участки и культивировали в 50 мл жидкой питательной среды МС с добавлением витаминов - 5,0 мг/л, кинетина - 0,2 мг/л, 2,4 Д - 3,0 мг/л и гибберелловой кислоты - 0,1 мг/л. Суспензию культивировали на шейкере при режиме 120 об/мин при 27+1⁰С на рассеянном свету до 4-6 месяцев и получали активно растущую суспензионную культуру. Субкультивирование суспензионных клеток проводили через 7 суток.

Подбор условий для проведения клеточной селекции с использованием культурального фильтрата грибов рода *Fusarium solani*

Для получения культурального фильтрата грибов рода фузариум, фитопатогенный гриб *Fusarium sp.* выращивали на чашках Петри со средой Чапека (15 г/л глюкозы, 2 г/л NaNO₃, 1 г/л KН₂РО₄, 0,5 г/л MgSO₄, 0,5 г/л KCl, 20 г/л агар-агара) в течение 7 дней при комнатной температуре. Для подавления бактериальной флоры в среду добавляли хлорамфеникол в концентрации 0,05 г/л. Видовую принадлежность гриба подтверждали микроскопированием культуры в капле воды при 40-кратном увеличении. Для наработки культурального фильтрата воздушный мицелий и споры, полученные на твердой питательной среде, переносили стерильной петлей в жидкую среду Чапека (15 г/л глюкозы, 2 г/л NaNO₃, 1 г/л KН₂РО₄, 0,5 г/л MgSO₄, 0,5 г/л KCl) и инкубировали в течение 2 недель при 22-24⁰С с перемешиванием. Полученный культуральный фильтрат, содержащий мицелий и суспензию спор, очищали от мицелия фильтрованием через стерильную марлю, а затем удаляли споры и другие возможные примеси с помощью фильтров с диаметром пор 0,45 нм. Стерильность культурального фильтрата проверяли посевом на твердую питательную среду Чапека [18, 19].

В основе клеточной селекции использовали принцип отбора генетически измененных клеток в присутствии селективного агента и последующей регенерации из них растений [20, 21]. Для проведения клеточной селекции на устойчивость к фузариозу в суспензионной культуре картофеля использовали различные концентрации культурального фильтрата грибов рода *Fusarium sp.*, которые добавлялись в жидкую питательную МС среду. Оценку влияния разных концентраций стресс-агента на рост клеток проводили по сравнению с контролем. Культивирование суспензионной культуры в стрессовых условиях проводили по классической ступенчатой схеме: культивирование клеток в неселективных условиях (14 суток); культивирование клеток в селективных условиях (2 субкультивирования с периодом 7 суток); перенос клеток в неселективные условия (14 суток); перенос клеток в селективные условия (2 субкультивирования по 7 суток). Клеточную селекцию проводили способом прямой (позитивной) селекции, при которой выживает лишь определенный искомый мутантный тип клеток.

Результаты исследований и их обсуждение

Для получения культуры клеток, способных к морфогенезу, использованы листья и черенки пробирочных растений картофеля и подобраны условия их культивирования. Из эксплантов, помещенных на питательную среду МС-5 для каллусогенеза, содержащую 2,4-Д 5 мг/мл и различные концентрации гормонов и витаминов, без освещения, при постоянной температуре 26⁰С, в течение 10-15 суток, получены первичные каллусные культуры. Наиболее активный рост каллусных клеток отмечен на среде МС-5 у обоих сортов картофеля. Каллусы высаживали в чашки Петри с агаризованной средой и культивировали при постоянной температуре 26⁰С в течение 14-16 суток, без освещения. Субкультивирование каллусных культур проводили в течение 2-3 месяцев через 5 суток. В процессе субкультивирования отбирали клетки, способные к регенерации растений.

Для получения суспензионной культуры из каллусов вычленяли морфогенные участки и культивировали в 50 мл жидкой питательной среды МС с добавлением кинетина и гибберелловой

кислоты. Сусpenзию культивировали на шейкере при режиме 120 об/мин при 27+1⁰С на рассеянном свету и через 4-6 месяцев получали активно растущую, мелко агрегированную, морфологически однородную сусpenзионную культуру, образованную из клеток меристемоидного типа с плотной цитоплазмой и тонкой клеточной стенкой. Субкультивирование сусpenзионных клеток проводили через 7 суток - для увеличения количества клеток и повышения генетического разнообразия. В основе клеточной селекции использован принцип отбора генетически измененных клеток в присутствии селективного агента и последующей регенерации из них растений. Клеточную селекцию на каллусных (КК) и сусpenзионных культурах (СК) картофеля осуществляли поэтапно с использованием двух изолятов грибов №0166 и №0167 рода *Fusarium solani* в качестве селективного фактора.

Клеточная селекция на каллусных культурах. На первом этапе для получения резистентных каллусов использовали селективные среды с постепенно повышающейся концентрацией селективного фактора по схеме: МС → КК + 5%КФ, МС → КК + 10%КФ, МС → КК + 20%КФ, МС → КК + 30%КФ, МС → КК + 40%КФ, МС → КК + 50%КФ. Каллусы выращивали в течение 1 - 3 месяцев, для полной элиминации чувствительных клеток каллуса, так как доступ селективного фактора внутрь каллусных инокулумов затруднен. Оценку устойчивости картофеля исследуемых сортов к КФ изолятов гриба *Fusarium solani* проводили по проценту выживаемости каллусных клеток. Экспериментальные данные по влиянию культурального фильтрата изолятов гриба *Fusarium solani* № 0166 и № 0167 на рост каллусной культуры картофеля сортов «Аксор» представлены в таблице 1 и 2.

Таблица 1 – Влияние КФ изолята гриба *Fusarium solani* № 0166 на рост каллусных клеток картофеля сорта «Аксор»

Вариант	7 день		14 день		21 день		28 день	
	масса каллуса, мг/мл	рост каллуса, %						
Контроль	0,374	100	0,374	100	0,404	108	0,452	120
10%КФ	0,388	100	0,368	98	0,365	94	0,369	95
20%КФ	0,338	100	0,368	98	0,365	94	0,369	95
30%КФ	0,339	100	0,263	78	0,284	84	0,271	80
40%КФ	0,311	100	0,133	43	0,167	54	0,096	31
50%КФ	0,330	100	0,122	37	0,095	29	0,042	13

Таблица 2 – Влияние КФ изолята гриба № 0167 на рост каллусных клеток картофеля сорта «Аксор»

Вариант	7 день		14 день		21 день		28 день	
	масса каллуса, мг/мл	рост каллуса, %	масса каллуса, мг/мл	рост каллуса, %	масса каллуса, мг/мл	рост каллуса, мг/мл	масса каллуса, мг/мл	рост каллуса, мг/мл
Контроль	0,372	100	0,374	100	0,400	107	0,409	110
10%КФ	0,380	100	0,361	95	0,357	94	0,364	96
20%КФ	0,298	100	0,289	97	0,253	85	0,232	78
30%КФ	0,313	100	0,212	68	0,159	51	0,122	39
40%КФ	0,297	100	0,098	33	0,086	29	0,083	28
50%КФ	0,359	100	0,104	29	0,078	22	0,032	9

Как видно из данных, представленных в таблице 1 и 2, для каллусных культур сорта «Аксор» использование КФ изолятов № 0166 и № 0167 в низких концентрациях (10% и 20%), практически не снижало рост каллусов до конца эксперимента, что может свидетельствовать о том, что данные концентрации КФ не являются токсичными для каллусных культур исследуемого сорта. Повышение % концентрации КФ обоих изолятов до 30% и более процентов, приводило к снижению роста каллусных клеток. Значительное угнетение роста каллусной культуры картофеля сорта

«Аксор» отмечено при культивировании на средах, содержащих от 40% и выше, изолята № 0166. Визуальное торможение роста каллусов на средах, содержащих КФ № 0167, выявлено при 30% КФ и выше.

Таким образом, можно заключить, что КФ изолята гриба № 0167 проявляет более токсичное действие на клетки каллусных культур сорта «Аксор», чем КФ изолята гриба № 0166. На основе полученных данных, дальнейшую работу по селекции наиболее устойчивых каллусных культур сорта «Аксор» к фузариозу проводили на средах с оптимальными концентрациями КФ изолята гриба № 0166 - 40%, КФ изолята гриба № 0167 – 30%. Полученные после культивирования каллусы высаживали на среду для инициации регенерации.

Отбор устойчивых к двум изолятам гриба *Fusarium solani* каллусов сорта «Невский», проводили также на основе данных, полученных при культивировании на средах с разным содержанием культурального фильтрата изолятов гриба *Fusarium solani*. № 0166 и № 0167, и представленных в таблице 3 и 4.

Таблица 3 – Влияние КФ изолята гриба *Fusarium solani* № 0166 на рост каллусных клеток картофеля сорта «Невский»

Вариант	7 день		14 день		21 день		28 день	
	масса каллуса, мг/мл	рост каллуса, %						
Контроль	0,439	100	0,482	110	0,504	115	0,482	110
10%КФ	0,405	100	0,384	95	0,380	94	0,384	95
20%КФ	0,398	100	0,386	97	0,338	85	0,318	80
30%КФ	0,323	100	0,219	68	0,164	51	0,145	45
40%КФ	0,357	100	0,117	33	0,103	29	0,089	25
50%КФ	0,390	100	0,113	29	0,046	12	0,019	5

Таблица 4 – Влияние КФ изолята гриба *Fusarium solani* № 0167 на рост каллусных клеток картофеля сорта «Невский»

Вариант	7 день		14 день		21 день		28 день	
	масса каллуса, мг/мл	рост каллуса, %						
Контроль	0,377	100	0,414	110	0,414	110%	0,414	110
10%КФ	0,365	100	0,350	96	0,346	95	0,350	96
20%КФ	0,318	100	0,308	97	0,302	95	0,273	86
30%КФ	0,299	100	0,191	64	0,146	49	0,116	39
40%КФ	0,312	100	0,090	29	0,056	18	0,078	5
50%КФ	0,285	100	0,054	19	0,014	5	–	–

В ходе проведения эксперимента установлено, что при использовании низких концентраций (10 и 20%) КФ изолятов гриба №0166 и №0167 у каллусных культур сорта «Невский», так же как и у каллусных культур сорта «Аксор», негативного токсического эффекта КФ не выявлено. Значительное снижение прироста каллусной массы сорта «Невский» отмечалось при культивировании на среде с 30% содержанием КФ как изолята гриба № 0166, так и КФ как изолята гриба № 0167. При культивировании КК на средах, содержащих КФ каждого из изолятов от 40 % и выше, отмечено критическое снижение роста каллусов вплоть до отмирания клеток. Таким образом, клеточную селекцию каллусных клеток сорта «Невский» проводили при 30% содержании КФ изолята грибов № 0166 и № 0167. Полученные после культивирования каллусы высаживали на среду для инициации регенерации.

Клеточная селекция на суспензионных культурах. Для выделения устойчивых клеток картофеля к КФ изолятов патогена №0166 и №0167 СК выдерживали в жидкой среде МС в течение 48 часов в присутствии селективного агента по следующей схеме: МС → СК + 10%КФ,

МС → СК + 20%КФ, МС → СК + 30%КФ, МС → СК + 40%КФ, МС → СК + 50%КФ, МС → СК + 60%КФ, для получения резистентных клеток. Затем клетки ресуспендировали в аминокислотной среде АА, высевали на агаризованную неселективную среду МС, культивировали в течение 4-5-ти суток и отбирали растущие колонии клеток.

Оценку устойчивости СК картофеля исследуемых сортов к двум изолятам гриба *Fusarium solani* проводили по проценту выживаемости суспензионных клеток. В соответствии с экспериментальными данными, представленными в таблице 5 и 6, прирост СК картофеля сорта «Аксор» был значительно ниже на среде с содержанием 40% КФ обоих изолятов гриба *Fusarium solani* по сравнению с контролем.

Таблица 5 – Влияние КФ изолята гриба № 0166 на рост суспензионных клеток картофеля сорта «Аксор»

Вариант	14 день		28 день		42 день		56 день	
	масса каллуса, мг/мл	рост каллуса, %						
Контроль	0,444	100	0,528	118	0,471	106	0,255	57
10%КФ	0,269	100	0,197	73	0,380	141	0,216	80
20%КФ	0,397	100	0,120	30	0,482	121	0,235	59
30%КФ	0,289	100	0,131	45	0,312	107	0,169	58
40%КФ	0,253	100	0,175	62	0,200	79	0,065	25
50%КФ	0,211	100	0,062	29	0,079	37	0,026	12
60%КФ	0,305	100	0,051	16	0,025	8	0,025	8

Таблица 6 – Влияние КФ изолята гриба № 0167 на рост суспензионных клеток картофеля сорта «Аксор»

Вариант	14 день		28 день		42 день		56 день	
	масса каллуса, мг/мл	рост каллуса, %						
Контроль	0,325	100	0,330	101	0,315	96	0,315	96
10%КФ	0,235	100	0,163	69	0,345	146	0,181	77
20%КФ	0,269	100	0,111	41	0,291	108	0,227	84
30%КФ	0,305	100	0,401	131	0,378	123	0,239	78
40%КФ	0,335	100	0,431	128	0,311	92	0,167	50
50%КФ	0,255	100	0,351	137	0,094	36	0,076	30
60%КФ	0,255	100	0,351	137	0,094	36	0,026	10

По данным, полученным в ходе проведения эксперимента, невысокое процентное содержание КФ обоих изолятов (10% - 20%) оказывало стимулирующее действие на рост СК картофеля сорта «Аксор», тогда как повышение содержания КФ до 50% в случае с изолятом гриба № 0166 и до 60% для изолята гриба № 0167, приводило к максимально резкому снижению прироста СК. Исходя из анализа экспериментальных данных, для получения растений-регенерантов селективных на устойчивость к фузариозу из СК картофеля сорта «Аксор» отбирали СК, культивируемые на средах с 30% содержанием КФ изолята гриба №0166 и 40% содержанием КФ изолята гриба №0167.

Для селекции устойчивых СК картофеля сорта «Невский» на средах, содержащих КФ исследуемых изолятов гриба, по полученным экспериментальным данным (таблица 7, 8), были выбраны иные концентрации КФ, чем для СК сорта «Аксор». Было установлено несколько стимулирующее действие на рост СК картофеля сорта «Невский» малых доз КФ 10 - 20% изолята гриба № 0166 и 10 - 30% КФ изолята гриба № 0167. При этом, отмечено, что культивирование СК на средах, содержащих 30 - 50% КФ изолята гриба № 0166 оказывало подавляющее влияние на рост

культуры СК, но не приводило к летальному исходу, как в случае с 60% содержанием КФ обоих изолятов. Таким образом, селекцию СК картофеля сорта «Невский» проводили на средах с содержанием 40% КФ для каждого изолята.

Таблица 7 – Влияние КФ изолята гриба № 0166 на рост супензионных клеток картофеля сорта «Невский»

Вариант	14 день		28 день		42 день		56 день	
	масса каллуса, мг/мл	рост каллуса, %						
Контроль	0,196	100	0,945	482	0,154	78	0,119	60
10%КФ	0,131	100	0,937	715	0,040	30	0,120	92
20%КФ	0,162	100	0,945	583	0,077	47	0,129	79
30%КФ	0,199	100	0,900	452	0,060	30	0,095	48
40%КФ	0,209	100	0,880	421	0,030	14	0,092	44
50%КФ	0,120	100	0,740	616	0,017	14	0,030	25
60%КФ	0,129	100	0,611	473	0,031	14	–	–

Таблица 8 – Влияние КФ изолята гриба № 0167 на рост супензионных клеток картофеля сорта «Невский»

Вариант	14 день		28 день		42 день		56 день	
	масса каллуса, мг/мл	рост каллуса, %						
Контроль	0,142	100	0,940	661	0,166	116	0,155	109
10%КФ	0,137	100	0,925	675	0,109	79	0,137	100
20%КФ	0,113	100	0,751	664	0,093	82	0,109	96
30%КФ	0,109	100	0,523	479	0,065	59	0,100	91
40%КФ	0,117	100	0,509	435	0,031	28	0,039	33
50%КФ	0,110	100%	0,449	408%	0,016	14%	0,009	8%
60%КФ	0,119	100%	0,440	369%	0,012	10%	–	–

Для получения растений-регенерантов из селектированных СК картофеля сортов «Аксор» и «Невский», выжившие и сохранившие способность к морфогенезу супензионные клетки, переносили на неселективную агаризованную питательную среду МС для индукции морфогенеза и регенерации.

Выводы. В процессе исследования проведен подбор условий для клеточной селекции картофеля сортов «Аксор» и «Невский». Получены супензионные и каллусные культуры картофеля обоих сортов, селективные по устойчивости к культуральному фильтрату гриба *Fusarium solani*. Установлено, что для каллусных культур картофеля сорта «Аксор» оптимальное содержание селективного агента КФ изолята № 0166 гриба составляет 40 и 30% КФ изолята гриба № 0167, для сорта «Невский» - 30% КФ изолята гриба № 0166 и № 0167. Для супензионной культуры картофеля сорта «Аксор» отбор устойчивых клеток наиболее успешно проводится при 30% содержании КФ изолята гриба № 0166 и 40% КФ изолята гриба № 0167 в среде, для сорта «Невский» - 30% КФ изолята гриба 0166 и 40%КФ изолята гриба 0167. В результате клеточной селекции с КФ изолятами гриба № 0166 и № 0167 получены культуры клеток с повышенной устойчивостью к КФ гриба *Fusarium solani* которые будут использованы для получения растений новых линий сортов картофеля «Аксор» и «Невский».

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Анисимов Б.В. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. М.: Картофелевод.- 2009.- 272 с.
[2] Fiers M., Edel-Hermann V., Chatot C., Hingrat Y.L., Alabouvette C., Steinberg C. Potato soil-borne diseases // J. Agron. Sustain. Dev. - Vol. 32.- 2012.- P. 93–132.

- [3] Кильчевский А., Хотылева Л. Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия. Беларуская наука, Минск, 2012, С. 239-245
- [4] Naef-Roth S. Production and bioassay of phytotoxins // Academic Press. - New York. - 1972. - P. 49–69.
- [5] Каримова В.К., Нечай Н.Л., Есимсейтова А.К., Нурмаганбетова А.Н., Измаганбетова А.Ж., Какимжанова А.А. Использование изолятов гриба *Phytophthora infestans* в клеточной селекции картофеля. Biotechnology. Theory and practice. 2013, №4. С. 4-12.
- [6] Ходжайрова Л. Т. Клеточная селекция растений картофеля (*Solmum tuberosum* L.) на неспецифическую устойчивость к возбудителю фитофтороза (*Phytophthora infestans*) с использованием веществ, нарушающих метаболизм стеринов. Автореф. дисс. канд.биол.наук, Санкт-Петербург, 1998.
- [7] Gunter Wersuhn, Ursula Dathe. Genome selection within cell cultures of potato and tobacco // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. - 1998.- Vol.54. – P.15–20.
- [8] Wilson C.R., Tegg R.S., Wilson A.J., Luckman G.A., Eyles A., Yuan Z.Q., Hingston L.H., Conner A.J. Stable and extreme resistance to common scab of potato obtained through somatic cell selection // Phytopathology. -2010. - Vol.100(5).- P. 460-467.
- [9] Wilson C. R., Luckman G. A, Tegg R. S., Yuan Z. Q., Wilson A. J., Eyles A., Conner A. J. Enhanced resistance to common scab of potato through somatic cell selection in cv. Iwa with the phytotoxin thaxtomin A// Plant Pathology.- 2009.- Vol. 58.- P.137–144.
- [10] Huang Y.H., Hartman G.L. Reaction of selected soybean genotypes to isolates of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* and their culture filtrates // Plant Disease. -1998. - Vol. 82.- P. 999–1002.
- [11] Bacon C.W., Porter J.K., Norred W.P., Leslie F.J. Production of fusaric acid by *Fusarium species* // Appl. environ. Microbiol. -1996. -Vol. 62. - P. 4039-4043.
- [12] Švábová L., Lebeda, A. In vitro selection for improved resistance to toxin-producing pathogens. // J. Phytopathology – 2005. - Vol. 153. – P. 52-64.
- [13] Kuzniak E. Effect of fusaric acid on reactive oxygen species and antioxidants in tomato cell cultures // J. Phytopathology – 2001. – Vol. 149. – P. 575-582.
- [14] Smýkal P., Valledor L., Rodríguez R., Griga M. Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.) // Plant Cell. - 2007. - Rep. 26. – P. 1985-1998.
- [15] Лутова Л.А. Биотехнология высших растений // Учебник. – СПб.- Изд-во С.-Петербург. ун-та.- 2003. – 228 с.
- [16] Jiang S., Ma Z., Ramachandran S. Evolutionary History and Stress Regulation of the Lectin Superfamily in Higher Plants // BMC. Evol. Biol. - 2010. - Vol. 10. - P. 79-103.
- [17] Kosturkova G., Angelov G., Rodeva R., Tchorbadjieva M., Mehandjiev A. In vitro Modelling of Biotic Stress - Higher Resistance of Pea Cultures to Phomamedicaginis var. pinodella // Culture Filtrates, Proceedings V-th Inter. Symp. “Bioprocess Systems. BioPS’03”. – Sofia.- 2003. – P. 186-189.
- [18] Kharabian A., Darabi A. Characterization of some chromosomal aberrations in regenerated rice plants (*Oryza sativa*) // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2005. – Vol. 83. – P. 161-168.
- [19] Jain S.M. Major mutation-assisted plant breeding programs supported by FAO/IAEA // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2005. - Vol. 82. – P. 113-123.
- [20] Красавин В.Ф. Результативность селекционной работы по картофелю в Казахстане // сборник мат. IV науч.-пр. конф. «Генетические и агротехнологические ресурсы повышения качества продовольственного и технического картофеля». – Москва.-2014.- № 1. – С.13 -14.
- [21] Wani S. H. Inducing fungus-resistance into plants through biotechnology // Not Sci Biol. - 2010. - V.2. - P.14-21.

REFERENCES

- [1] Anisimov B.V. Protecting potatoes from diseases, pests and weeds. M.: Kartofelevod, 2009, 272 p. (in Russ.).
- [2] Fiers M., Edel-Hermann V., Chatot C., Hingrat Y.L., Alabouvette C., Steinberg C. Potato soil-borne diseases J. Agron. Sustain. Dev., Vol. 32, 2012. P. 93-132.
- [3] Kil'chevskij A., Hotyleva L. Biotechnology in plant breeding. Cell Engineering. Belaruskaja nauka, Minsk, 2012, P. 239-245 (in Russ.).
- [4] Naef-Roth S. Production and bioassay of phytotoxins. Academic Press. New York. 1972, P. 49–69.
- [5] Karimova V.K., Nechaj N.L., Esimseitova A.K., Nurmaganbetova A.N., Izmagambetova A.Zh., Kakimzhanova A.A. Using the isolates of the fungus *Rnitoftnora infestans* in potato breeding cell. Biotechnology. Theory and practice. 2013, №4. P. 4-12. (in Russ.).
- [6] Hodzhajova L. T. Cellular selection of potato plants (*Solmum tuberosum* L.) in the non-specific resistance to late blight pathogen (*Phytophthora infestans*) using the materials that violate the metabolism of sterols. Avtoref. diss., Sankt-Peterburg, 1998. (in Russ.).
- [7] Gunter Wersuhn, Ursula Dathe. Genome selection within cell cultures of potato and tobacco. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1998. Vol.54., P.15–20.
- [8] Wilson C.R., Tegg R.S., Wilson A.J., Luckman G.A., Eyles A., Yuan Z.Q., Hingston L.H., Conner A.J. Stable and extreme resistance to common scab of potato obtained through somatic cell selection. Phytopathology. 2010. Vol.100(5), P. 460-467.
- [9] Wilson C. R., Luckman G. A, Tegg R. S., Yuan Z. Q., Wilson A. J., Eyles A., Conner A. J. Enhanced resistance to common scab of potato through somatic cell selection in cv. Iwa with the phytotoxin thaxtomin A. Plant Pathology. 2009. Vol. 58., P.137–144.
- [10] Huang Y.H., Hartman G.L. Reaction of selected soybean genotypes to isolates of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* and their culture filtrates. Plant Disease. 1998. Vol. 82.P. 999–1002.

- [11] Bacon C.W., Porter J.K., Norred W.P., Leslie F.J. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Appl. environ. Microbiol.* **1996**. Vol. 62., P. 4039-4043.
- [12] Švábová L., Lebeda, A. In vitro selection for improved resistance to toxin-producing pathogens. *J. Phytopathology*, **2005**. Vol. 153., P. 52-64.
- [13] Kuzniak E. Effect of fusaric acid on reactive oxygen species and antioxidants in tomato cell cultures. *J. Phytopathology*, **2001**. Vol. 149., P. 575-582.
- [14] Smýkal P., Valledor L., Rodríguez R., Griga M. Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term in vitro shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell*. **2007**. Rep. 26. P. 1985-1998.
- [15] Lutova L.A. Biotechnology of Higher Plants. *Uchebnik. SPb.Univ.* **2003**. 228 P. (in Russ.).
- [16] Jiang S., Ma Z., Ramachandran S. Evolutionary History and Stress Regulation of the Lectin Superfamily in Higher Plants. *BMC. Evol. Biol.* **2010**, Vol. 10., P. 79-103.
- [17] Kosturkova G., Angelov G., Rodeva R., Tchorbadjieva M., Mehandjiev A. In vitro Modelling of Biotic Stress - Higher Resistance of Pea Cultures to *Phomamedicaginis* var. *pinodella*. *Culture Filtrates, Proceedings V-th Inter. Symp. Bioprocess Systems. BioPS'03. Sofia.* **2003**. P. 186-189.
- [18] Kharabian A., Darabi A. Characterization of some chromosomal aberrations in regenerated rice plants (*Oryza sativa*). *Plant Cell Tiss Organ Cult.* **2005**. Vol. 83., P. 161-168.
- [19] Jain S.M. Major mutation-assisted plant breeding programs supported by FAO IAEA. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* **2005**. Vol. 82., P. 113-123.
- [20] Krasavin V.F. The effectiveness of potato breeding in Kazakhstan. *Collection mat. IV nauch.-pr. Conf. Genetic and agro-technical resources to improve the quality of food and industrial potatoes*. Moscow, 2014, № 1, P.13 -14. (in Russ.).
- [21] Wani S. H. Inducing fungus-resistance into plants through biotechnology. *Not Sci Biol.* **2010**. V.2., P.14-21.

КАРТОПТЫҢ КЛЕТКАЛЫҚ КУЛЬТУРАСЫНА *Fusarium solani* САНЫРАУҚҰЛАҒЫНЫң КУЛЬТУРАЛДЫ СҮЗІНДІСІМЕН *in vitro* ЖАҒДАЙЫНДА СЕЛЕКЦИЯ

Н. П. Малахова, Л. Д. Галиева, А. Хасейн, А. А. Калиева, Б. К. Тезекбаева, Э. Р. Мальцева

ҚР БФМ FK «М. Ә. Айтхожин атындағы Молекулалық биология және биохимия институты»,
Алматы, Қазақстан

Тірек сөздер: картоп, *in vitro* өсken клеткалар, клеткалық селекция, *Fusarium solani* культурады фильтрат.

Аннотация. Картоптың отандық сорттарының ақ зең ауруларына төзімділігі жоғары жаңа линияларын алу үшін картоптың «Ақсор» және «Невский» сорттарының каллустық және суспензиялық культурапарына клеткалық селекция жүргізді. *Fusarium solani* санырауқұлағының екі изолятының №1066 және №1067 культурады сүзіндісі алынды. Картоптың клеткалық культурапарына *Fusarium solani* санырауқұлағының культурады сүзіндісімен селекция жүргізу жолдары карастырылды. Картоптың «Ақсор» және «Невский» отандық сорттарының клеткалық культурапары (каллустық және суспензиялық) алынды. Әрбір культурады сүзіндінің селективті белсенділігіне клеткалық культураның өсуіне сәйкес бағалау жүргізілді. Зерттеліп отырған санырауқұлақтың әрбір изолятының культурады сүзіндісінің селективті ортадағы тиімді проценттік мөлшері белгілі болды. Санырауқұлақтың изолятының түріне сәйкес картоптың әрбір сорттының клеткалық культурасына культурады сүзіндінің шекті мөлшері аныкталды. Клеткалық селекция әдісімен *Fusarium solani* санырауқұлағының №1066 және №1067 изоляттарының культурады сүзінділерімен өсіру барысында картоптың екі сорттың *Fusarium solani* культурады сүзінділеріне төзімділігі жоғары каллустық және суспензиялық культурапары алынды.

Поступила 02.02.2016 г.