

webbiana для забезпечення стабільного росту рослин-регенерантів у культурі *in vitro*.

Дослідження проводили в лабораторії біотехнології ІБКіЦБ. Як експланти використовували насіння та апікальні меристеми *Beta webbiana*. Випробувано різні схеми стерилізації із застосуванням розчинів сулеми (0,1%), гіпохлориту натрію (2–5%) та етилового спирту. Культивування здійснювали на модифікованих поживних середовищах за прописом Мурасіге та Скуга (MS) з додаванням різних концентрацій регуляторів росту: 6-бензиламінопурину (БАП) та нафтилоцтової кислоти (НОК).

Встановлено, що ключовим лімітуючим фактором при введенні *Beta webbiana* в асептичну культуру є високий рівень ендогенної інфекції та специфічна будова насінневої оболонки. Оптимальним режимом дезінфекції визначено двоетапну обробку: промивання 70% етанолом (1 хв) з подальшою експозицією у 0,1% розчині сулеми протягом 7–8 хвилин, що забезпечило вихід до 72% стерильних проростків.

Насіння даного виду характеризується дрібними розмірами (діаметром 1,5–2,5 мм) та наявністю надзвичайно щільного, дерев'янистого перикарпію темно-коричневого забарвлення. Така анатомічна будова створює подвійний

Процес первинного морфогенезу дикого виду *in vitro* відзначався уповільненою динамікою порівняно з культурними формами цукрового буряка. Найвищий коефіцієнт мультиплікації (1:4,5) було зафіксовано на базовому поживному середовищі Мурасіге та Скуга (MS), доповненому 6-бензиламінопурином у концентрації 0,5–1,0 мг/л. Важливою особливістю мікроклонального розмноження *Beta webbiana* виявилася потреба у коригуванні мінерального складу середовища, зокрема підвищенні вмісту солей магнію та заліза, що відповідає едафічним адаптаціям виду до природних арен поширення.

Додавання нафтилоцтової кислоти у мікродозах (0,05 мг/л) на етапі мультиплікації сприяло формуванню розвиненої листової розетки з характерним для виду антоціановим забарвленням черешків та запобігало передчасній вітрифікації пагонів.

Етап ризогенезу вимагав зниження концентрації макросолей у поживному середовищі вдвічі (1/2 MS), що стимулювало перехід рослин до коренеутворення. Найкращі результати (85% укоріненних регенерантів) отримано при застосуванні 1,0 мг/л індолілмасляної кислоти, що забезпечило формування міцної кореневої системи, придатної для подальшої адаптації до умов *ex vitro*.

Розроблена біотехнологічна система дозволяє стабільно підтримувати безвірусний генетичний банк *Beta webbiana*, що є стратегічно важливим для селекції цукрових буряків на тривалу резистентність до бурякової нематоди.

Процес морфогенезу дикого виду суттєво відрізнявся від культурного буряка уповільненими темпами росту на початкових етапах. Найвищий коефіцієнт розмноження (1:4,5) зафіксовано на середовищі MS, доповненому БАП у концентрації 0,5–1,0 мг/л. Збільшення концентрації цитокінінів понад 1,5 мг/л призводило до небажаної вітрифікації тканин та пригнічення розвитку кореневої системи.

Статистичний аналіз підтвердив, що успішність регенерації *Beta webbiana* на 64% залежить від гормонального балансу середовища та на 22% від типу вихідного експланта. Отримані рослини-регенеранти характеризувалися типовими для виду морфологічними ознаками: дрібним, іноді каланізованим листям та інтенсивним антоціановим забарвленням черешків. Сформована система розмноження дозволяє підтримувати безвірусний матеріал донора стійкості до нематоди в активному стані протягом тривалого часу.

Таким чином, розроблено протокол введення в культуру *in vitro* дикого виду *Beta webbiana*, що включає двоетапну стерилізацію та використання поживних середовищ MS з помірним вмістом БАП.

Встановлені особливості мікроклонування дозволяють ефективно розмножувати цей цінний генетичний ресурс для подальшого використання в селекційних програмах на стійкість до бурякової нематоди. Наступним етапом досліджень буде адаптація отриманих клонів до умов *ex vitro* та проведення біотехнологічних схрещувань з культурними формами.

УДК 633.63:632.651:57.085.2

Калатур К. А., кандидат с.-г. наук, с.н.с., завідувачка лабораторії фітопатології та ентомології Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України
e-mail: kkalatur@meta.ua

МЕТОД ОЦІНКИ СТІЙКОСТІ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ ПРОТИ БУРЯКОВОЇ НЕМАТОДИ В УМОВАХ *IN VITRO*

Бурякова цистоутворювальна нематода (*Heterodera schachtii* Schmidt) належить до найбільш небезпечних фітопаразитів цукрових буряків в Україні. Втрати врожаю від цього паразита можуть сягати 70–80%, а за критичного рівня інвазії ґрунту призводити до повної загибелі посівів. Наразі найбільш екологічно безпечним та економічно обґрунтованим методом контролю

чисельності бурякової нематоди є впровадження у виробництво стійких і толерантних гібридів. Застосування культури *in vitro* є ефективним інструментом для експрес-оцінки селекційного матеріалу цукрових буряків на стійкість проти *H. schachtii*, оскільки такий підхід дає змогу проводити дослідження в контрольованих умовах упродовж усього року.

Метою роботи є розроблення етапів методу первинного скринінгу вихідних селекційних матеріалів цукрових буряків на стійкість проти бурякової нематоди в умовах *in vitro*.

Матеріали та методи досліджень. У роботі досліджували селекційний матеріал цукрових буряків різного еколого-географічного походження. Рослини культивували на поживному середовищі Гамборга і Евелега (B5) за температури $+24\pm 2^\circ\text{C}$, відносної вологості повітря 70%, освітленості 3–4 тис. лк та 16-годинного світлового фотоперіоду. Як інокулюм використовували цисти *H. schachtii*, виділені з ґрунтових зразків.

Результати досліджень. Розроблений метод включає чотири послідовні етапи. Перший етап передбачає виділення цист бурякової нематоди із зразків ґрунту. Для цього зразки об'ємом 200–250 см³ відбирають у польових умовах у вогнищах із високою чисельністю нематоди. У лабораторії цисти виділяють із ґрунту методом промивання через сита. Отримані цисти під біокулярною лупою за допомогою препарувальної голки переносять із фільтра у пробірки (скляні або Еппендорф), у які попередньо вкладають етикетки із зазначенням виду нематоди, місця та року відбору. Пробірки з цистами щільно закривають та зберігають в сухому місці за кімнатної температури або в холодильнику за температури $+4\text{--}11^\circ\text{C}$.

Другий етап передбачає стерилізацію цист, які використовують як інокулюм. Стерилізації підлягають лише виповнені цисти (що містять життєздатні яйця та личинки нематоди) без ознак механічних пошкоджень або ураження патогенами. Для стерилізації застосовують один із двох методів. Перший метод (комбінований): 1. Промити цисти стерильною водою. 2. Інкубувати цисти в стерильній воді впродовж 2 годин із додаванням розчину господарського мила. 3. Інкубувати цисти в 70% етанолі впродовж однієї хвилини. 4. Інкубувати цисти в 2,5% розчині гіпохлориту натрію NaClO впродовж 5 хвилин. 5. Промити цисти тричі в стерильній воді (по 5–10 хвилин). Другий метод (гіпохлоритний): 1. Промити цисти стерильною водою. 2. Інкубувати цисти в стерильній воді впродовж 2 годин із додаванням розчину господарського мила. 3. Інкубувати цисти в 5% розчині гіпохлориту кальцію Ca(ClO)₂ із додаванням 2–3 крапель Tween 20 впродовж 10 хвилин. 4. Промити цисти тричі в стерильній воді (по 5–10 хвилин).

Третій етап передбачає введення стерильних цист бурякової нематоди в культуру *in vitro*. Для

цього в стерильних умовах ламінарного боксу цисти (2–3 шт.) за допомогою стерильної голки вносять у колби з укоріненими рослинами цукрових буряків. Інокулюм розмішують безпосередньо на кореневій системі або в зоні її активного росту.

На четвертому етапі проводять облік кількості сформованих самиць бурякової нематоди. Для цього через 3–4 тижні після інокуляції рослини обережно вилучають із живильного середовища, промивають проточною водою та за допомогою стереомікроскопа визначають кількість білих самиць нематоди, що утворилися на кореневій системі. Наявність або відсутність білих самиць паразита є показником відповідно сприйнятливості або стійкості селекційного матеріалу проти ураження *H. schachtii*.

За розробленим методом проведено оцінку стійкості 11 мікропагонів-регенерантів, отриманих із калусної тканини міжвидових гібридів цукрових буряків (*Beta vulgaris* L. × *Beta maritima* L.) французького та грецького походження. Калусну тканину індукували методом культури недозрілих зародків (експлантів), отриманих у результаті схрещування *B. maritima* × *B. vulgaris* Nxxxx (№ 677).

За результатами скринінгу 9 селекційних зразків цукрових буряків (ем/5; ем/1 6.2; ем/1; ем/2 2017 6.12 22.1 1/2; ем/5 8.2; ем/12 2017 23.1; ем/9 2017 13.3; ем/1 2017 13.3; ем/3 2017 14.3) виявилися стійкими проти ураження їх буряковою нематодою. Два зразки – ем/1 2017 18.1 та ем/2 2017 14.3 – визнано сприйнятливими для розвитку і розмноження *H. Schachtii* – на їхній кореневій системі утворилося відповідно 7 і 3 самиці паразита.

Висновок. Розроблений метод первинного скринінгу селекційних матеріалів цукрових буряків *in vitro* забезпечує ефективну та відтворювану диференціацію генотипів за рівнем їхньої стійкості проти бурякової нематоди в контрольованих умовах. Запропонований підхід базується на використанні стерилізованих цист як інокулюму та дає змогу швидко й об'єктивно оцінювати реакцію рослин на ураження цим паразитом за утворенням самиць на кореневій системі. Використання цього методу дозволяє оперативно відбирати стійкі генотипи та своєчасно вибракувати сприйнятливі форми вже на ранніх етапах селекційного процесу. Це підвищує ефективність селекційної роботи, скорочує її тривалість і сприяє прискоренню створення нових нематодостійких гібридів цукрових буряків.