
Sodininkystė ir daržininkystė Horticulture and Truck-farming Садоводство и огородничество

Rauplėms atsparių obelių sėjinukų atrankos metodų palyginimas

**Dalia Gelvonauskienė,
Vidmantas Stanys**

*Lietuvos sodininkystės ir
daržininkystės institutas,
Kauno g. 30,
LT-4335 Babtai, Kauno rajonas,
el. paštas institutas @ lsd.lt*

Lietuvos sodininkystės ir daržininkystės institute sukurtas rauplėms atsparių obelių sėjinukų atrankos metodas embrioniniame augalų raidos tarpsnyje, naudojant izoliuotas sėklaskiltes *in vitro*.

Nustatyta, kad embrioniniame raidos tarpsnyje atrinktų atsparių sėjinukų dažnumas ir jaunatviniame išlikusių atsparių sėjinukų dažnumas priklauso nuo jų genetinės prigimties. Monogeniniu atsparumu pasižyminčių veislių kombinacijose *in vitro* sistemoje atrinkta 40–75%, o poligeniniu atsparumu pasižyminčių veislių kombinacijose 4–14% atsparių sėjinukų. Poligeniniu atsparumu pasižyminčių veislių kombinacijose iš *in vitro* sąlygomis atrinktų atsparių augalų kiekio *in vivo* rasta 33–43% atsparių genotipų, tuo tarpu monogeniniu atsparumu pasižyminčių veislių kombinacijose tokių genotipų rasta 66–100%.

Monogeniniu atsparumu pasižyminčių veislių kombinacijose tarp sėjinukų atsparumo rauplėms embrioniniame raidos tarpsnyje *in vitro* ir jaunatviniame *in vivo* nustatyta stipri koreliacija ($r = 0,71-0,90$).

Metodu *in vitro* galima ne tik įvertinti obelių atsparumą rauplėms, bet ir atrinkti atsparius sėjinukus sėklų gavimo metais. Sumažinamos laiko ir darbo sąnaudos.

Raktažodžiai: obelis, rauplės, atranka, *in vitro*, *in vivo*

ĮVADAS

Vienas svarbiausių obelių selekcijos uždavinių – sukurti rauplėms (*Venturia inaequalis* (Cke) Wint.) atsparias veisles. Obelių atsparumas rauplėms sąlygoja vaismedžių produktyvumą, vaisių kokybę ir galimybę naudoti veisles ekologinėje sodininkystėje. Augalų selekcijos intensyvumas priklauso nuo selektinės medžiagos vertinimo kriterijų pasirinkimo ir genotipų su norimais požymiais atrankos tikslumo ankstyvuose augalų raidos tarpsniuose.

Pastaruoju metu rauplėms atsparūs obelių sėjinukai atrenkami ankstyvame jaunatviniame raidos tarpsnyje. Atranka atliekama dirbtiniame infekciniame pa-

togeno fone šiltnamyje ir medelyne, taip pat natūraliame infekciniame fone – selekciniam sode [9, 10, 11, 17]. Minėti metodai nėra pakankamai tikslūs. Sėjinukų atranką vykdant šiltnamyje dirbtiniame infekciniame fone, būtina kontroliuojama temperatūra ir drėgmė. Sėklos turi sinchroniškai sudygti ir daigai vienodai augti, kad to paties išsivystymo patektų į infekcinį patogeno foną. Augalams užkrėsti reikalingas didelis patogeno užkrato kiekis, užimamas didelis šiltnamio plotas. Dėl nepakankamo atrankos tikslumo atrinktų formų atsparumas rauplėms toliau tiriamas medelyne. Natūraliame infekciniame patogeno fone apie obelių veislių ir sėjinukų atsparumą rauplėms galima tiksliai spręsti tik esant palankioms

aplinkos sąlygoms ligai plisti [16]. Tyrimų laikas užsitęsia, nes rauplių epifitotija kartojasi kas keleri metai. Atrankos metodai embrioniniame augalo raidos tarpsnyje pagreitintų selekcinės medžiagos diferenciaciją ir atranką, sumažintų lauko tyrimų apimtį. *In vitro* metodai leidžia testuoti embrioninių audinių eksplantus. Obelių atsparumą *in vitro* bandyta nustatyti naudojant ląstelių kultūrą [4], kalių [1, 13], izoliuotus ūglius [7], izoliuotus lapus ir ūglius [6], augalus, išaugintus audinių kultūrose [5], izoliuotas sėklaskiltes [2, 3, 14]. Atlikti tyrimai parodė, kad *in vitro* sąlygomis galima rauplėmis užkrėsti obelis.

Taikant atrankos metodus *in vitro* labai svarbu pasirinkti tokius vertinimo kriterijus ir sąlygas, kad atrankos rezultatai *in vitro* atitiktų rezultatus *in vivo*.

Tikslas – palyginti selekcinės medžiagos diferenciacijos ir atrankos metodą embrioniniame augalo raidos tarpsnyje, naudojant izoliuotas sėklaskiltes *in vitro* su tradiciniais atrankos metodais – dirbtiniame infekciname patogeno fone šiltnamyje ir natūraliame infekciname patogeno fone lauke.

TYRIMŲ SĄLYGOS IR METODAI

Tyrimai vykdyti Lietuvos sodininkystės ir dažininkystės institute. Bandymuose naudotos skirtingai genetiškai determinuoto atsparumo obelių veislės: *Noris*, *Ranger* (rauplėmis jautrios), *Paprastasis antaninis*, *Katja* (atsparumas nulemtas poligenais), *Liberty* (*Vf* genas), *Priam* (*Vf* genas), *SR0523* (*Vm* genas) (imunios). Sėklos gautos atlikus kryptingus kryžminimus. Tirta 9 kryžminimo kombinacijos. Kiekvienoje kombinacijoje įvertinta 22–91 sėjinukas. Obelių sėjinukų atsparumo rauplėmis vertinimai *in vitro*, šiltnamyje ir selekciname augyne atlikti 1992–2001 m.

Obelių sėjinukų atsparumas rauplėmis lygintas embrioniniame raidos tarpsnyje *in vitro* izoliuotų sėklaskilčių kultūroje ir jaunatviniame raidos tarpsnyje medelyne.

Izoliuotos sėklaskiltės 4 paras kultivuotos ant *Nitsch & Nitsch* [12] mitybinės terpės. Po to perkeltos į 0,006% benzimidazolo vandeninio tirpalo aplinką, užkrėstos rauplėgrybiu [2]. Obelių izoliuotos gemalinės ašys augintos *Nitsch & Nitsch* terpėje su 0,02 mg/l IAR ir 3 mg/l BAP. Regenerantai iš mėgintuvėlių pasodinti į kasetes su žemių ir durpių mišiniu (1:1), o pavasarį pasodinti į medelėną. Izoliuotos sėklaskiltės ir sėjinukai (2–3 bei 20–30 lapelių tarpsnyje) užkrėsti rauplių užkratu, surinktu pomologiniame ir selekciname soduose.

Izoliuotų sėklaskilčių pažeidimas rauplėmis vertintas pagal autorių pasiūlytą skalę; 0 – sėklaskiltės nepažeistos, 4 – grybienos micelis purus, išplitęs sėklaskiltės paviršiumi, intensyviai sporuliuoja [2]. Obelių

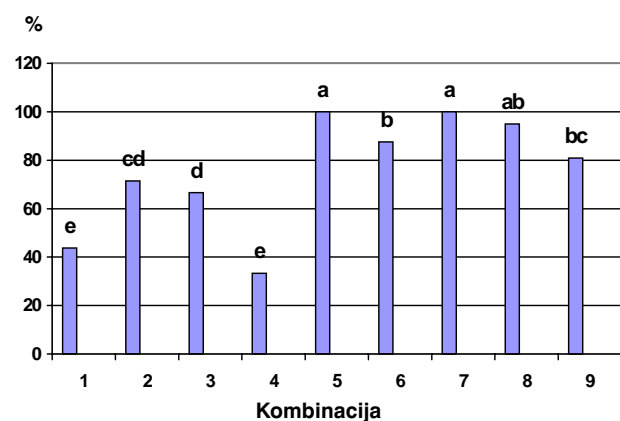
lų sėjinukų pažeidimas rauplėmis vertintas pagal Ždanovo ir Sedovo metodiką [17].

Atrankos rezultatams *in vitro* (embrioniniame augalo raidos tarpsnyje) palyginti su atrankos rezultatais *in vivo* (jaunatviniame augalo raidos tarpsnyje) apskaičiuotas koreliacijos koeficientas. Duomenys apdoroti dispersinės analizės metodais [15].

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Kombinacijose, kai vienas arba abu tėvai turėjo monogeninį atsparumą, *in vitro* sistemoje buvo atrinkta 40–75% rauplėmis atsparių sėjinukų. Poligeniniu atsparumu pasižyminčių veislių kombinacijose buvo atrinkta 4–14% atsparių sėjinukų.

Palyginus obelių sėjinukų atsparumą rauplėmis embrioniniame ir jaunatviniame raidos tarpsniuose, nustatyta, kad embrioniniame raidos tarpsnyje atrinktų ir jaunatviniame tarpsnyje išlikusių atsparių sėjinukų dažnumas priklausė nuo jų genetinės prigimties (1 pav.). Poligeniniu atsparumu pasižyminčių veislių kombinacijose nuo 33% iki 43% embrioniniame tarpsnyje atrinktų sėjinukų buvo atsparūs ir jaunatviniame raidos tarpsnyje. Kombinacijoje *Noris* × *Ranger* koreliacija tarp obelių atsparumo rauplėmis *in vitro* ir *in vivo* buvo silpna ($r = 0,50$), o kombinacijoje *Paprastasis antaninis* × *Katja* jos nebuvo ($r = 0,25$). Šiuo atveju atsparumo įvertinimo metodas *in vitro* neparodo augalo atsparumo *in vivo*. Poligeniniu atsparumu pasižyminčių veislių kombinacijose sėjinukų atsparumas ontogenezės eigoje kinta dėl poligenų veikimo. Monogeniniu atsparumu pasižymin-



1 pav. Rauplėmis atsparių sėjinukų dažnumas medelyne, palyginti su *in vitro* atrinktais atspariais augalais.

1 – *Noris* × *Ranger*, 2 – *Noris* × *Liberty*, 3 – *Noris* × *SR0523*, 4 – *Paprastasis antaninis* × *Katja*, 5 – *Paprastasis antaninis* × *SR0523*, 6 – *Priam* × *Noris*, 7 – *Priam* × *Paprastasis antaninis*, 8 – *Priam* × *Liberty*, 9 – *Priam* × *SR0523*.

Duomenys, pažymėti skirtingomis raidėmis, patikimai ($P < 0,01$) skiriasi

čių veislių kombinacijose *in vivo* rasta nuo 66% (*Noris* × *SR0523*) iki 100% (*Paprastasis antaninis* × *SR0523*, *Priam* × *Paprastasis antaninis*) *in vitro* atrinktų atsparių genotipų. Augalų atsparumas rauplėms embrioniniame raidos tarpsnyje *in vitro* glaudžiai siejosi su jų atsparumu jaunatviniame raidos tarpsnyje *in vivo*. Tai rodo gauti dideli koreliacijos koeficientai ($r = 0,71$ – $0,90$). Išimtis – kombinacijos *Noris* × *Liberty* ir *Priam* × *Noris*, kuriose koreliacija tarp atrinktų atsparių sėjinukų *in vitro* ir *in vivo* gauta silpna ($r = 0,32$ ir $r = 0,60$). Gauti duomenys rodo, kad monogeniniu atsparumu pasižyminčių veislių kombinacijose rauplėms atsparių sėjinukų atrankos metodas embrioniniam augalų raidos tarpsnyje *in vitro* reprezentuoja jų atsparumą *in vivo*. Tai, kad ontogenezės eigoje išliko daug atsparių rauplėms sėjinukų (66–100%), leidžia teigti, jog atrankos metodas *in vitro* efektyvus monogeniniu atsparumu pasižyminčių veislių kombinacijose.

Parentant rauplėms atsparių obelų sėjinukų atrankos metodą, svarbūs tyrėjų kvalifikacijos, laiko ir darbo sąnaudų momentai. Atrenkant atsparius sėjinukus embrioniniame augalų raidos tarpsnyje reikalinga laboratorija ir personalo kvalifikacija dirbti aseptinėmis sąlygomis.

Tradiciniu metodu auginant obelų sėjinukus, į medelyną pasodinama 52% augalų, skaičiuojant nuo pasėtų sėklų kiekio, kurie vėliau vertinami atsparumo rauplėms požyriui. Kita hibridinių genotipų dalis atsparumo rauplėms požyriui lieka neįvertinta, nes sėklos nesudygsta arba sudygę augalai anksti žūsta. Taikant atsparumo rauplėms vertinimo metodą *in vitro* įvertinta 92–100% hibridinių sėjinukų nuo turėtų sėklų kiekio. *In vitro* metodas leidžia tiksliau spręsti apie kombinacijų bendrą atsparumą rauplėms, tėvinių formų vertę pagal palikuonis, prognozuoti hibridinės šeimos dydį, siekiant sujungti kitus obelų vertingus požymius su atsparumu rauplėms.

Priklausomai nuo kryžminimo kombinacijos embrioniniame augalų vystymosi tarpsnyje įvertinama ir į medelyną pasodinama 4–75% jau atrinktų, rauplėms atsparių sėjinukų nuo bendro sėklų skaičiaus. Šitaip sutaupomas šiltnamio ir lauko plotas bei darbo sąnaudos, skirtos sėjinukams auginti.

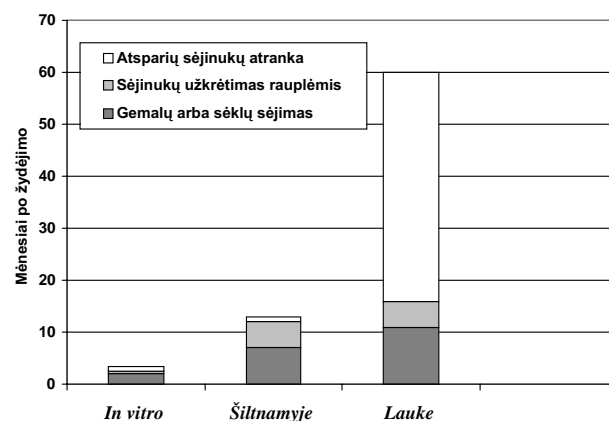
In vitro sistemoje tūkstančiui sėjinukų užkrėsti rauplėmis reikia 30–40 ml inokuliumo. Ždanovo ir Sedovo duomenimis, šiltnamio sąlygomis tam tikslui sunaudojama 200–400 ml inokuliumo [16]. Mažame inokuliumo kiekyje galima imituoti rauplėgrybio kamienų sudėtį, artimą šio patogeno populiacijai, sudaromos vienodos galimybės ir sąlygos atskiriems kamienams užkrėsti obelis embrioniniame raidos tarpsnyje. Šitaip tiksliai įvertinamas sėjinukų atsparumas rauplėms.

Vertinant obelų sėjinukų atsparumą rauplėms šiltnamyje ir lauke, neišvengiamas krašto efektas. Dėl jo augalai patenka į skirtingas apšvietimo, temperatūros bei drėgmės sąlygas. Dėl to augalų raida skiriasi. Rauplių pasireiškimas ant obelų lapų priklauso ne tik nuo augalo, bet ir nuo lapo ontogenetinio amžiaus [8]. *In vitro* sistemoje sudaromos optimalios sąlygos patogeniui ir kuo vienodesnės tiriamiems eksplantams. Naudojant izoliuotas sėklaskiltes, vertinami vienodo amžiaus eksplantai.

In vitro sąlygomis obelų gemalai autonomiškai praėjus 50–60 dienų po žydėjimo. Šiltnamio ir lauko sąlygomis dygsta subrendusios sėklos po ramybės laikotarpio. Taikant mūsų parengtą rauplėms atsparių sėjinukų atrankos metodą *in vitro*, atsparūs genotipai indentifikuojami praėjus 3,5 mėnesio po obelų kryžminimo, t. y. sėklų gavimo metais. Atliekant atranką šiltnamyje ir lauke, tam sugaištama atitinkamai 12 ir 60 mėnesių (2 pav.).

Atrenkant atsparius rauplėms sėjinukus šiltnamyje, medelyne ir sode fungicidai nenaudojami. Tuo tarpu šiltnamyje ir medelyne rauplių patogeniui sukurtose sąlygose labai išplinta miltligė. Dėl jos vieni sėjinukai žūsta, kitų atsilieka raida. Rauplėms atsparius sėjinukus atrinkus embrioniniame obelų raidos tarpsnyje *in vitro*, vėliau juos auginant šiltnamyje ir medelyne tikslinga naudoti apsaugos priemones nuo grybinių ligų. Tai užtikrintų aukštą sėjinukų kokybę, ankstesnę jų derėjimo pradžią.

In vitro sąlygomis tūkstančio augalų atsparumą rauplėms įvertinti tereikia 0,4 m² kultivavimo kambario, t. y. 10 kartų mažiau negu atranką atliekant šiltnamyje (4,5 m²) ir 350 kartų mažiau negu medelyne (140 m²). Taikant *in vitro* metodą, išbrokavus rauplėms jautrius genotipus, likusiems atspariems augalams pasodinti bei juos prižiūrėti reikėtų ženkliai mažiau šiltnamio ir lauko ploto bei darbo sąnaudų.



2 pav. Obelų sėjinukų atsparumo rauplėms įvertinimo skirtingais metodais trukmė

Monogeniniu atsparumu pasižyminčių veislių kombinacijose reikiamos darbo sąnaudos sumažėtų 25–60%, o poligeniniu atsparumu pasižyminčių veislių kombinacijose – 86–96%.

IŠVADOS

Biotechnologijos principais pagrįstas rauplėms atsparių obelių sėjinukų atrankos metodas embrioniniame jų raidos tarpsnyje yra tikslus, tačiau reikalaujantis aukštesnės darbuotojų kvalifikacijos ir specialios techninės įrangos. Metodas taikytinas sėjinukų, pasižyminčių monogeniniu atsparumu, atrankai.

Atrankos metodu *in vitro* obelių selekcinio fondo atsparumas rauplėms įvertinamas sėklų gavimo metais. Kombinacijose, kuriose vienas arba abu tėvai turi monogeninį atsparumą, atrenkama 40–75% atsparių sėjinukų embrioniniame jų raidos tarpsnyje. Sutaupoma 25–60% šiltnamio ir lauko ploto. Sumažėja darbo sąnaudos, skirtos sėjinukams auginti.

Gauta
2002 04 30

Literatūra

1. Beech I., and Gessler C. Interaction between *Venturia inaequalis* and apple callus tissue cultures: an electron microscopic study // Journal Phytopathology. 1986. N 116. P. 315–322.
2. Gelvonauskienė D., Stanys V. Obelių atsparumo rauplėms *Venturia inaequalis* (Cke) Wint. tyrimas *in vitro* // Sodininkystė ir daržininkystė. 1999. T. 18(4). P. 13–23.
3. Gelvonauskienė D., Stanys V. Expression of apple scab resistance *in vitro* and *in vivo* // Sodininkystė ir daržininkystė. 2001. T. 20(3)–1. P. 102–109.
4. Grazdina G., Borejsza-Wisocki W., Lester C. Phytoalexin Production in an Apple Cultivar Resistant to *Venturia inaequalis*. The American Phytopathological Society. 1997. Vol. 87. No. 3. P. 868–876.
5. Guillaumes J., Chevalier M., Parisi L. Études des relations *Venturia inaequalis* – *Malus × domestica* sur vitroplants // Canadian Journal Plant Pathology. 1995. Vol. 17. No. 4. P. 305–311.
6. Ivanička I., Kellerhals M. and Theiler R. Evaluation of Scab (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wint.) on Shoots and Detached leaves from *in vitro* and Greenhouse Grown Plants of the Apple (*Malus domestica* Mill.) Cultivars *Golden Delicious* and *Florina* // Gartenbauwissenschaft. 1996. Vol. 5. P. 242–248.
7. Yepes L. M., and Aldwinckle H. S. Pathogenesis of *Venturia inaequalis* on Shoot-Tip Cultures, and on Greenhouse – Grown Apple Cultivars. The American Phytopathological Society. 1993. Vol. 83. No. 11. P. 1155–1162.
8. Keit G. W., Jones I. K. Studies of the epidemiology and control of apple scab // Agricultural Experimental Station Research Bulletin. 1926. No. 73. P. 104.
9. Kellerhals M., Meyer M. Combining stable disease resistance with high fruit quality and good yielding capacity in apple // Norwegian Journal of Agricultural Sciences. 1994. No. 17. P. 39–4812.
10. MacHardy W. E. Apple Scab // Biology, Epidemiology, and Management. St. Paul, Minnesota, 1996. 501 p.
11. Moore M. H. Glashouse experiments on apple scab. I. Foliage infection in relation to wet and dry periods // Annals of Applied Biology. 1964. No. 53. P. 423–435.
12. Nitsch J. P., Nitsch C. Haploid plants from pollen grains // Science. 1969. Vol. 163. P. 85–87.
13. Saad A. T. The culture of apple callus tissue and its use in studies on pathogenicity of *Venturia inaequalis* Ph. D. thesis. University of Wisconsin, Madison, 1965. 110 p.
14. Stanys V., Gelvonauskienė D. Screening of embryonic apple seedlings for scab resistance in cotyledon culture // Žemės ūkio mokslai. 1995. Nr. 1. P. 57–61.
15. Tarakanovas P. Selekcinių-genetinių tyrimų rezultatų apdorojimo ir įvertinimo sistema „Selekcija“. Dotnuva-Akademija, 1996. 76 p.
16. Бондарь Л. В., Коваленко Г. К., Кононыхина В. А. Оценка гибридного фонда яблони на устойчивость к парше // Плодоводство. Минск, 1983. С. 59–64.
17. Жданов В. В., Седов Е. Н. Селекция яблони на устойчивость к парше. Тула, 1991. 207 с.

Dalia Gelvonauskienė, Vidmantas Stanys

COMPARISON OF SCREENING METHODS FOR SCAB RESISTANT SEEDLINGS

S u m m a r y

At LIH, a screening method of apple seedlings for scab resistance at the embryonic plant development stage was created by employing isolated cotyledons *in vitro*.

The rate of selected resistant seedlings at the embryonic stage and the rate of lasting resistant seedlings at the juvenile stage were established to depend on their genetic nature. In combinations with monogenic resistance varieties in an *in vitro* system 40–75% of resistant seedlings and in combinations with polygenic resistance varieties 4–14% were selected. In combinations with polygenic resistance varieties, from the amount of selected resistant plants in an *in vitro* system 33–43% of resistant genotypes were found *in vivo*, while in combinations with varieties of monogenic resistance there were 66–100% such genotypes.

In combinations with monogenic resistance varieties, a close correlation ($r = 0.71-0.90$) was obtained between scab resistance of seedlings at the embryonic stage *in vitro* and at the juvenile stage *in vivo*.

The *in vitro* method enables to assess scab resistance of apple and to select resistant seedlings in the year of seed collection. The stretch of time and labor expenditure are reduced.

Key words: apple, scab, selection, *in vitro*, *in vivo*

Даля Гялвонаускене, Видмантас Станис

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ОТБОРА УСТОЙЧИВЫХ К ПАРШЕ СЕЯНЦЕВ ЯБЛОНИ

Резюме

В Литовском институте садоводства и овощеводства разработан метод отбора устойчивых к парше сеянцев яблони на эмбриональном этапе развития растений *in vitro*, используя изолированные семядоли.

Установлено, что частота устойчивых к парше сеянцев на этапе эмбрионального развития и частота устойчивых сеянцев на ювенильном этапе развития определяются их генетическим происхождением. В комбинациях скрещивания сортов с моногенной устойчивостью в системе *in vitro* отобрано 40–75%,

а в комбинациях скрещивания сортов с полигенной устойчивостью – 4–14% устойчивых сеянцев.

Из отобранных устойчивых к парше сеянцев *in vitro* в комбинациях скрещивания сортов с полигенной устойчивостью *in vivo* сохранили устойчивость 33–43% растений. В комбинациях скрещивания сортов с моногенной устойчивостью таких растений было 66–100%. Выявлена сильная корреляция ($r = 0,71–0,90$) между устойчивостью сеянцев *in vitro* и *in vivo*.

С помощью разработанного метода *in vitro* можно выделить устойчивые сеянцы в год получения семян. Тем самым на отбор существенно снижаются затраты времени и труда.

Ключевые слова: яблоня, парша, отбор, *in vitro*, *in vivo*