

БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 581.143.6: 635.21

БОРОДАЙ В.В., кандидат біол. наук, доцент,
КЛЯЧЕНКО О.Л., кандидат біол. наук, доцент

Національний університет біоресурсів і природокористування України
e-mail: veraboro@gmail.com

ОСОБЛИВОСТІ ІНДУКОВАНОГО МОРФОГЕНЕЗУ ТА РЕГЕНЕРАЦІЇ ГЕНОТИПІВ *SOLANUM TUBEROSUM* L. УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

Досліджено особливості морфогенетичних реакцій *Solanum tuberosum* L. у культурі *in vitro* для низки сучасних сортів картоплі вітчизняної селекції, ефективність яких залежить від сезонності відбору, типу експлантату, складу живильного середовища та генотипу. Оптимізовано склад живильних середовищ та умов одержання калюсних культур, рослин-регенерантів, мікробульб та індукції процесів органогенезу в культурі *in vitro*. Вивчення й оптимізація умов індукції морфогенезу з культивованих клітин є важливою складовою частиною роботи з вивчення в культурі *in vitro* нових цінних форм *S. tuberosum* L.

Ключові слова: морфогенез, калюсні тканини, мікробульби, регенерація, *Solanum tuberosum* L.

Вступ. Картопля (*Solanum tuberosum* L.) є однією з найважливіших сільськогосподарських культур, яка має значне світове значення. Генетичний потенціал продуктивності картоплі далеко не вичерпаний, його підвищення може бути досягнуте завдяки вивченню морфологічних і фізіологічних ознак, що зумовлюють підвищення врожайності [2]. Серед інших культурних рослин, картопля виділяється наявністю найбагатших генетичних ресурсів і легкістю передачі успадкованих ознак сорту. Майже всі споріднені дикі види *Solanaceae* можна схрещувати з *S. tuberosum* L. Проте поширення хвороб, обумовлене особливостями культури та зміною біологічних властивостей фітопатогенів, перешкоджає отриманню високих і стабільних врожаїв якісних бульб. Рациональне поєднання класичної селекції з біотехнологічними методами сприяє прискоренню і поліпшенню селекційного процесу шляхом розширення генетичного спектру отриманого вихідного матеріалу, оцінки та відбору корисних комбінацій, що призведе до отримання нових сортів з високими біологічними та господарсько-цінними показниками.

Вплив різних факторів на морфогенез *in vitro* у багатьох сортів картоплі вивчено цілим рядом авторів [1, 2, 4-8, 10]. Наукові роботи здебільшого присвячені вирішенню і вивченню окремих методичних питань. Однак, практично для кожного сорту необхідно підбирати індивідуальні умови для морфогенезу *in vitro*. Тому вивчення і оптимізація умов індукції морфогенезу картоплі з культивованих клітин є актуальною і важливою складовою частиною роботи з вивчення в культурі *in vitro* нових цінних форм рослин цієї культури.

Метою роботи було дослідження морфогенетичних процесів при культивуванні *in vitro* генотипів *Solanum tuberosum* L. вітчизняної селекції.

Матеріали і методика досліджень. Дослідження проводили в лабораторії біотехнології рослин Національного університету біоресурсів і природокористування України впродовж 2009-2012 рр. Як об'єкти використовували культури листкових і стеблових експлантатів, мікробульби та бульби картоплі: ранніх сортів Серпанок і Повінь, середньоранніх сортів – Оберіг і Зелений Гай, середньостиглих сортів Калинівська і Билина, середньопізніх – Червона Рута і Поліське Джерело. Для отримання маточних рослин використовували проміжні мікроживці пагонів пророщених бульб довжиною 1-2 см з однією парою листків, які містять пазушні меристематичні тканини. Для оптимізації умов одержання асептичних культур *Solanum tuberosum* досліджені традиційні стерилізуючі

речовини в різних концентраціях і тривалості експозиції. Отримані асептичні пагони відокремлювали від первинного експлантату і самостійно культивували на живильному середовищі Мурасіге-Скуга, доповненому кінетином у концентрації 0,5 мг/л [9].

Для дослідження особливостей калюсогенезу як експлантати використовували стерильні листкові пластинки площею 0,5-0,8 см², частини стебел з пазушними бруньками і диски мікробульб площею 0,7-1,0 см². На експлантатах штучно робили насічки скальпелем для збільшення поверхні проліферації. Калюсну тканину отримували, культивуючи первинні експлантати на модифікованому середовищі Мурасіге-Скуга, доповненому мезоінозитом в концентрації 180-200 мг/л, фолієвою кислотою – 0,4-0,5 мл/л, кінетином – 0,2-0,3 мг/л, 2,4 -Д – 3-4 мг/л, гідролізатом казеїну – 1г/л, аденіном – 1 мг/л і гліцином – 1 мг/л. Калюсні тканини культивували в умовах абсолютної темряви при регульованій температурі +25°C, відносній вологості 70-80% протягом 3-4 тижнів. Приріст сирої біомаси (%) калюсних тканин визначали за Л.А. Кучеренко [3]. Визначення особливостей бульбоутворення у рослин зазначених сортів проводили за модифікованою методикою Д.П. Остапенко [5].

Рослини-регенеранти, які мали добре сформовані пагони та кореневу систему висаджували в попередньо прожарений у сушильній шафі субстрат: чорнозем : торф : пісок (2:1:1) і накривали їх скляними ковпаками для підвищення вологості та кращої приживлюваності.

У таблицях представлені середні арифметичні значення з отриманих величин та їх стандартні відхилення (SD). Статистичну обробку одержаних результатів проводили на персональному комп'ютері з використанням прикладного програмного забезпечення Statistika 5.1 і Microsoft Office XP® для Microsoft Windows®.

Результати досліджень. Управління селекційним процесом картоплі за допомогою методів культури тканин передбачає вивчення особливостей клонального мікророзмноження, умов індукції та забезпечення процесів дедиференціювання та диференціювання тканин рослини.

Основною умовою успішного культивування ізольованих тканин картоплі є стерильність експлантатів. Були використані різні концентрації та тривалість експозиції традиційних стерилізуючих речовин – 70% С₂Н₅ОН, 17% Н₂О₂ та Са(СlО)₂. За розробленою нами схемою найкращим варіантом виявилось витримування первинних експлантатів протягом 1 хв. у 70% С₂Н₅ОН, 8 хв. – у 17% Н₂О₂ та наступне 3-кратне промивання у стерильній Н₂О протягом 10 хвилин. У результаті оптимізації процесу стерилізації було отримано до 92,4% життєздатних культур. Експлантати мали мінімальний рівень контамінації мікроорганізмами (5,6%), зберігали зелений колір і прискорену здатність до морфогенезу (1а, 1б). При більш тривалій експозиції у розчині Н₂О₂ спостерігали шкодочинну дію на тканини рослин (рис. 1в). Живцювання рослин в культурі *in vitro* є одним з кращих методів для швидкого розмноження картоплі.

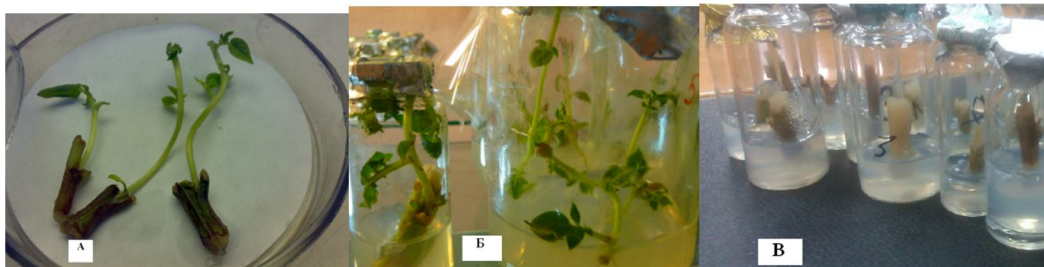


Рис. 1. Особливості введення *Solanum tuberosum* L. в культуру *in vitro*

Вивчення морфогенетичного потенціалу різних генотипів картоплі показало, що середньоранній сорт Зелений Гай характеризувався високим коефіцієнтом розмноження – 144, інтенсивним ростом пагонів (до 15 см у висоту) з рівномірно розміщеними листками, великою кількістю міжвузлів (6-11) до 1,5 см завдовжки і добре розвиненою кореневою системою. За цими характеристиками до нього наближалися середньостиглий сорт Калинівська і середньопізні сорти Червона Рута і Поліське Джерело (рис. 2б). Рослини

середньораннього сорту Оберіг та середньостиглого Билина інтенсивно формували бокові пагони, рослини ставали букетоподібними, мали короткі міжвузля, вкорочений нерозвинутий корінь (рис. 2а). У ранніх сортів Серпанок та Повінь спостерігалось слабе пагоноутворення, невелика довжина рослин і повільний ріст коренів.

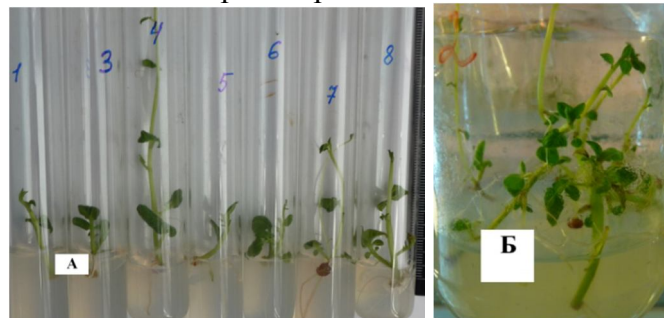


Рис. 2. Вивчення морфогенетичного потенціалу різних генотипів *Solanum tuberosum* L.

Вивчення калюсогенезу і морфогенезу виявило зв'язок культивованих тканин з біологічними особливостями вихідних сортів і з ритмами їх росту та розвитку. Сезонний характер калюсоутворення та морфогенезу рослин знаходився в тісному зв'язку з особливостями онтогенезу: відзначалась морфогенетична активність калюсної тканини на початку лютого. У результаті проведених експериментів виявлені сортові відміни в процесах калюсогенезу, на які істотно впливають походження експлантатів (максимальні ефекти отримані при використанні листкових сегментів) і склад живильного середовища. При цьому зовнішній вигляд калюсів більшою мірою залежав від їх тканинного походження. Перші ознаки калюсоутворення спостерігали на 12-19-ту добу культивування залежно від сорту. На експлантатах молодих листків утворення калюсу спостерігалось в базальній частині в місцях пошкодження тканини (рис. 3), а у культурі стеблових експлантатів – на поверхні зрізу.

При вивченні впливу типу первинних експлантатів на калюсогенез було встановлено, що найбільш інтенсивно цей процес відбувається при використанні листкових сегментів, а найменш інтенсивно – дисків мікробульб. Калюс, що утворився на сегментах листків, мав більш рихлу консистенцію, світло-коричневе забарвлення на відміну від отриманого на міжвузлях та спостерігалась несуттєва різниця в інтенсивності калюсогенезу (відповідно 32,7-76,9 % і 25,8-70,3 %).

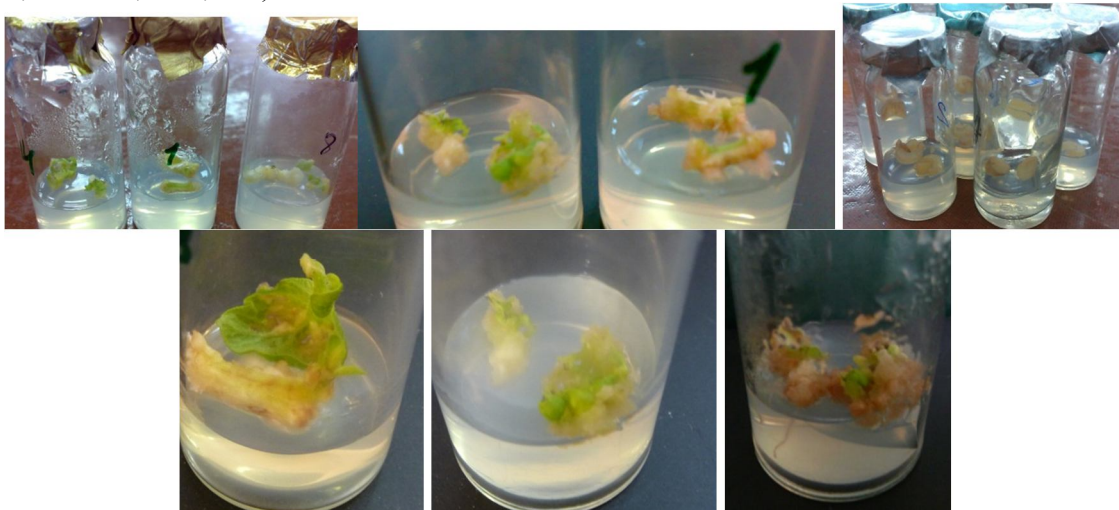


Рис. 3. Індукція калюсогенезу на різних експлантатах *Solanum tuberosum* L. та типи калюсних тканин

Дослідження ініціації калюсоутворення і морфогенезу уможливило виявлення сортів картоплі з активним калюсогенезом і високим морфогенетичним потенціалом. Найбільш інтенсивний приріст калюсної тканини спостерігався у сортів Зелений Гай (75,2%), Калинівська (70,3%) і Оберіг (65,4%), порівняно з сортами Серпанок, Повінь та Билина –

25,4-60,2 %, які можуть бути успішно використані в клітинній селекції картоплі на стійкість. Частота калусоутворення в культурі листкових експлантатів залишалась достатньо високою протягом всього року і складала 75,4-84,2 % залежно від сорту (табл. 1). Разом з тим, для всіх сортів була характерна залежність процесу калусогенезу від фізіологічного віку листків. Максимальна частота калусоутворення (92,3-100%) спостерігалась при введенні в ізолювану культуру 1-3 пари листків від верхівки пагона, що були фізіологічно молодшими, а при збільшенні віку листків частота калусоутворення знижувалася на 10-24,2%. Використання оптимізованих середовищ уможливило інтенсивний ріст калусної тканини. Листкові сегменти досліджуваних сортів є найкращими експлантатами для отримання первинного калусу. Середньоранній сорт Зелений Гай характеризувався найвищою проліферативною здатністю клітин, а найменш інтенсивною – сорт Повінь.

Вивчення особливостей культивування *in vitro* різних сортів і ліній картоплі є необхідною умовою високої частоти регенерації рослин та успішного проведення клітинної селекції.

Таблиця 1

Частота індукції калусогенезу генотипів картоплі в залежності від типу первинного експлантату

Сорт	Інтенсивність калусогенезу, %		
	Листкові сегменти	Міжвузля	Диски мікробульб
Серпанок	45,3±0,7	27,5±1,1	11,1±1,3
Повінь	40,4±1,5	24,8±1,8	10,2±0,7
Оберіг	82,1±1,3	53,4±0,9	18,4±1,1
Зелений Гай	95, 2±0,9	65,3±1,1	25,1±0,5
Калинівська	54,6±1,3	32,5±1,2	15,5±0,8
Билина	57,1±1,5	30,1±1,3	14,2±0,9
Червона Руга	83,2±1,2	51,7±0,8	19,8±0,6
Джерело Полісся	76,2±2,0	47,5±0,9	18,2±1,2

При непрямому морфогенезі *in vitro* утворювались недиференційовані калусні тканини, які при перенесенні на середовища для індукування органогенезу, давали початок рослинам-регенерантам (рис. 4). Основним процесом репродуктивного розвитку рослин картоплі є бульбоутворення. Маса сформованих бульб у заключній фазі їх росту багато в чому визначається генотипом і, отже, вимагає диференційованих умов ініціації і росту бульб *in vitro*.

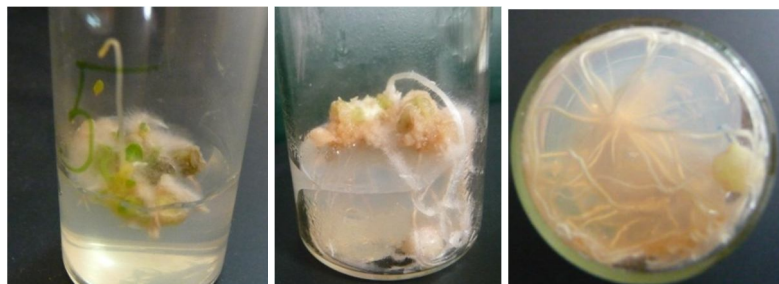


Рис. 4. Особливості непрямого морфогенезу рослин *Solanum tuberosum* у культурі *in vitro*

У процесі бульбоутворення одним з основних умов є вуглеводневий і гормональний фактори, котрі впливають на фотоперіодичні реакції бульбоутворення і ростові реакції, а також на комплекс біохімічних процесів. Ініціації бульбоутворення передують підвищення фотосинтетичної активності, накопичення фонду асимілятів в стеблах і інтенсивний транспорт вуглеводів в напрямку підземних органів. Уповільнення росту пагонів супроводжувалось активним утворенням мікробульб, які формувалися в пазухах листків стеблових експлантатів або в живильному середовищі безпосередньо на пагонах або столонах. Була встановлена залежність між інтенсивністю росту пагонів і інтенсивністю

бульбоутворення. Індукція столоноутворення відбувалась при культивуванні стеблових експлантатів за умов розсіяного світла 0,5-1 клк на середовищі МС, доповненому кінетином в концентрації 0,5 мг/л із 2% сахарози. При цьому формування етиольованих пагонів з декількома міжвузлями спостерігали на 6-8 добу. За морфологічними ознаками ці пагони відповідали визначенню столона, але мали діатропну орієнтацію росту [1, 8] (рис. 5).



Рис. 5. Особливості процесів бульбоутворення *Solanum tuberosum* у культурі *in vitro*

Найбільш оптимальним для культивування виявилось живильне середовище МС з додаванням кінетину – 0,5-0,8 мг/л, ІУК – 0,1-0,2 мг/л, мезоінозита – 100-110 мг/л, сахарози – 8-9%, що істотно стимулювало бульбоутворення. Сорти Зелений Гай, Оберіг, Червона Рута і Джерело Полісся характеризувалися високою здатністю до утворення мікробульб, які мали овальну або подовжену форму, різне забарвлення (від темно - зеленої до темно - фіолетового в залежності від генотипу) і розміри (від 4-8 мм). Статистично достовірних закономірностей між рослинами різних груп дозрівання не спостерігалося (табл. 3). Дослідження впливу тривалості фотоперіоду на процеси бульбоутворення показали, що при витримуванні рослин в умовах 8-годинного фотоперіоду при регульованій температурі +19-20°C лише перші 8-10 діб, а потім – у темновій культуральній кімнаті, ініціація бульбоутворення відбувалась швидше (рис. 6).

Таблиця 3

Особливості утворення мікробульб залежно від генотипу

Сорти	Утворення мікробульб, %	Ініціація утворення мікробульб, доба	Середня кількість мікробульб, шт.	Середня вага мікробульб (мг)	Розмір мікробульб, мм ²	Продуктивність бульбо-/пагоноутворення
<i>Ранні</i>						
Серпанок	75	35	1,5	150±21	<5	1,3
Повінь	69	42	1,3	110±14	<5	1,0
<i>Середньоранні</i>						
Оберіг	83	25	2,0	237±23	5-7	2,3
Зелений Гай	90	20	3,5	370±28	7-10	3,3
<i>Середньостиглі</i>						
Калинівська	83	28	2,9	284±19	5-7	2,8
Билина	81	29	1,8	185±22	5-7	1,7
<i>Середньопізні</i>						
Червона Рута	89	26	3,4	310±29	7-10	3,1
Джерело Полісся	79	27	2,2	221±19	5-7	2,0

Мікробульби набували світло-зеленого кольору, а пізніше ставали світло-коричневими в залежності від генотипу.



Рис. 6. Особливості процесів бульбоутворення *Solanum tuberosum* L. без освітлення

Для вивчення адаптації відбирали пагони з розвинутими листковими пластинками та черешками темно-зеленого кольору, виймали їх з пробірок, кореневу систему обережно відмивали від залишків агару дистильованою водою, ополіскували 1%-ним розчином перманганату калію, висаджували в стерильний ґрунт та накривали скляними циліндрами. При цьому приживлюваність рослин картоплі для досліджуваних генотипів складала 87-95%.



Рис. 7. Адаптація *Solanum tuberosum* L. до умов *in vivo*

Таким чином, вивчення особливостей морфогенезу та регенерації рослин *in vitro* важливе не тільки для розуміння закономірностей онтогенезу вищих рослин, але і для успішного розвитку методів клітинної інженерії рослин, спрямованих на створення нових форм рослин, що поєднують ознаки стійкості до абіотичних стресів і фітопатогенів з високою продуктивністю та якістю продукту.

Висновки.

1. Показана залежність морфогенезу і регенерації рослин в культурі *in vitro* від часу відбору матеріалу (сезонність). Краща здатність до морфогенезу і регенерації у всіх сортів спостерігалася при введенні експлантатів в культуру *in vitro* протягом лютого-березня.

2. Найбільш інтенсивно процес калусоутворення відбувався на модифікованому середовищі Мурасіге-Скуга, доповненому мезоінозитом в концентрації 180-200 мг/л, фолієвою кислотою – 0,4-0,5 мл/л, кінетином – 0,2-0,3 мг/л, 2,4-Д – 3-4 мг/л, гідролізатом казеїну – 1 г/л, аденіном – 1 мг/л і гліцином – 1 мг/л при використанні листкових сегментів, а найменш інтенсивно – дисків мікробульб.

3. Встановлено, що активне пагоноутворення і ризогенез спостерігається при культивуванні рослин на середовищах Мурасіге-Скуга, доповнених кінетином, БАП, ІОК і 2,4-Д. Індукція столоноутворення відбувалася при культивуванні стеблових експлантатів за умов розсіяного світла – 0,5-1 клк на середовищі МС, доповненому кінетином в концентрації 0,5 мг/л із 2% сахарози.

4. Стимулюючий вплив на процеси бульбоутворення мало середовище МС, доповнене кінетином – 0,5-0,8 мг/л, ІУК – 0,1-0,2 мг/л, мезоінозитом – 100-110 мг/л, сахарозою – 8-9 %.

Список використаних літературних джерел

1. Дерябин А.Н. Периодичность этапов клубнеобразования у картофеля *in vitro* / А.Н. Дерябин, Н.О. Юрьева // Доклады РАСХН. – 2001. – Т. 3. – С. 6-8.
2. Коновалова Г.И. Использование биотехнологических методов и приемов в современном семеноводстве картофеля / Г.И. Коновалова // Актуальные проблемы науки и техники: Вопросы картофелеводства: науч. тр. – М., 2006. – С. 332-336.

3. Кучеренко Л.А. К методике определения массы каллусных тканей в процессе культивирования / Л.А. Кучеренко, Р.П. Маддумге, Ю.Л. Гужов // Сельскохозяйственная биология. – 1991. – № 3. – С. 84-85.
4. Мацкевич В.В. Особливості регенерації рослин картоплі з живців залежно від освітлення та субстрату/ В.В. Мацкевич, С.А. Лященко // Картоплярство: міжвідом. темат. наук. зб. – К.: Аграрна наука, 2008. – Вип. 37. – С. 98-110.
5. Получение микроклубней картофеля *in vitro* и формирование элиты на их основе: метод. рекомендации / [Д.П. Остапенко, И.Х. Мороз, В.В. Кононученко, В.С. Резник]. – К., 1990. – С. 12.
6. Хромова Л.М. Каллусо- и морфогенез в культуре тканей картофеля / Л.М. Хромова // В кн.: Исследования по клеточной селекции картофеля. – М., 1984. – С. 81-88.
7. Dobránszki J. In Vitro Tuberation in Hormone - Free Systems on Solidified Medium and Dormancy of Potato Microtubers Magyarné / J. Dobránszki, K. Tábori, I. Hudák // In: Benkeblia N, Tennant P (Eds) Potato I. Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology 2 (Special Issue 1), 2008. – P. 82-94.
8. Ewing E.E. Tuber formation in potato: induction, initiation, and growth / E.E. Ewing, P.C. Struik // Horticultural Reviews, 1992. – №14. – P.89-198.
9. Murashige T.A Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant: – 1962. – № 15. – P. 473-497.
10. Sarkar D. The signal transduction pathways controlling in planta tuberization in potato: an emerging synthesis / D. Sarkar // Plant Cell Reports. – 2008. – № 27. – P. 1-8.

Аннотація

Бородай В.В., Кляченко О.Л.

Особенности индуцированного морфогенеза и регенерации генотипів *Solanum tuberosum* L. украинской селекции

Исследованы особенности морфогенетических реакций *Solanum tuberosum* L. в культуре *in vitro* для ряда современных сортов картофеля украинской селекции, эффективность которых зависит от сезонности отбора, типа эксплантата, состава питательной среды и генотипа. Оптимизирован состав питательных сред и условия получения каллусных культур, растений – регенерантов, микроклубней и индукции процессов органогенеза в культуре *in vitro*. Изучение и оптимизация условий индукции морфогенеза из культивируемых клеток является важной составной частью работы по изучению в культуре *in vitro* новых ценных форм *Solanum tuberosum* L.

Ключевые слова: морфогенез, каллусные ткани, микроклубни, регенерация, *Solanum tuberosum* L.

Annotation

Boroday V., Klyachenko O.

The features of induced morphogenesis and regeneration of genotypes *Solanum tuberosum* L. of Ukrainian selection

The features of morphogenetic reactions of *Solanum tuberosum* L. *in vitro* for a number of modern potato cultivars of Ukrainian breeding, the effectiveness of which depends on the seasonal selection, type of explant, nutrient medium composition and genotype. The composition of culture media and conditions for obtaining callus cultures, plants - regenerates, microtubers and induction processes of organogenesis *in vitro* were optimized. Study and optimization of conditions for inducing morphogenesis of cultured cells is an important part of work on the study of new forms of *Solanum tuberosum* L. *in vitro*.

Keywords: morphogenesis, callus tissue, microtubers, regeneration, *Solanum tuberosum* L.

Отримано редакцією – 23.03.2014 р.