

УДК 635.21:581.143:631.526.32:58.085

О.Л. КЛЯЧЕНКО, кандидат біологічних наук, доцент

Національний університет біоресурсів і природокористування
України

В.А. КОЛТУНОВ, доктор сільськогосподарських наук, професор

Київський національний торговельно-економічний університет

В.В. БОРОДАЙ, кандидат біологічних наук, доцент

Національний університет біоресурсів і природокористування
України

Л.М. КОЖЕМЯКІНА, аспірант

Н.І. ВОЙЦЕШИНА, кандидат сільськогосподарських наук

Інститут картоплярства НААН

ОСОБЛИВОСТІ РОСТУ І РОЗВИТКУ РІЗНИХ СОРТІВ КАРТОПЛІ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO* ЗАЛЕЖНО ВІД СКЛАДУ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА

*Досліджено вплив різних регуляторів росту на ріст та розвиток в культурі *in vitro* сортів картоплі Подольнка, Серпанок, Повінь, Фантазія, Оберіг, Зелений гай, Калинівська, Билина, Червона рута і Поліське джерело. Установлено, що при культивуванні апікальних меристем картоплі на поживних середовищах різного складу найбільш інтенсивний їхній ріст спостерігався на модифікованому середовищі Мореля з кінетином – 0,5 мг/л, ІОК – 1,0, аденіном – 0,25 мг/л. Середньоранній сорт Зелений гай характеризувався найвищим коефіцієнтом розмноження — 144 та інтенсивним калусоутворенням. При застосуванні живильного середовища Мурасіге-Скуга з додаванням нафтилоцтової кислоти*

© О.Л. Кляченко, В.А. Колтунов, В.В. Бородай,
Л.М. Кожемякіна, Н.І. Войцешина, 2012

Картоплярство. 2012. Вип. 41

(НОК), індолілоцтової кислоти (ІОК) в концентрації 0,1 мг/л та мезоінозиту 100 мг/л близько 80–90% рослин картоплі формували мікробульби.

Ключові слова: картопля, культура *in vitro*, поживні середовища, пагоноутворення в умовах *in vitro*, коренеутворення в умовах *in vitro*, морфогенетичний потенціал

Актуальність досліджень. Хвороби картоплі вірусної, грибної та бактеріальної етіології призводять до великих втрат врожаю (25–85%), прискорюють виродження сортів [1]. Тому створення поліпшених і принципово нових генотипів сільськогосподарських рослин, у тому числі й картоплі, яким властиві одиночна, групова або комплексна стійкість до біотичних і абіотичних стресових чинників середовища, є актуальним напрямом у сучасній селекції [2–4]. Поставлені завдання успішно вирішує раціональне поєднання методів класичної селекції з біотехнологічними методами. На сучасному етапі клітинна селекція *in vitro*, не зважаючи на певні проблеми, широко використовується в селекційній роботі. В основному селекцію *in vitro* використовують для отримання сортів і гібридів картоплі, стійких проти найбільш шкідливих збудників фітофторозу (збудник – *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary), кільцевої гнилі (збудник – *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicum* (Cms), син.: *Corynebacterium sepedonicum*), чорної ніжки (збудники – бактерії роду *Erwinia*, син.: *Pectobacterium*) [1, 5–7]. З використанням методів клітинної інженерії в Україні було створено сорт картоплі Ольвія [2], в Японії – сорт White Baron [7], у Росії розроблено метод селекції на стійкість проти патогенного гриба *Rhizoctonia solani* та отримано форми картоплі, стійкі проти ризоктоніозу [8]. Проте методологічні підходи з отримання асептичних культур, приготування поживних середовищ певного складу, дотримання фотоперіодичних і газових режимів культивування, послідовності прийомів культивування в клітинній селекції для різних сортів картоплі розроблено недостатньо. У зв'язку з цим спосіб відбору генотипів і експлантатів, ефективних до утворення морфогенетичних структур в культурі *in vitro*, є актуальним.

Мета досліджень. Провести дослідження особливостей морфогенезу апексів залежно від складу поживного середовища, а також особливостей культивування різних генотипів картоплі в культурі *in vitro* для подальшої роботи в напрямку клітинної селекції на стійкість проти грибних і бактеріальних хвороб.

Методика та умови проведення досліджень. Дослідження проводили в лабораторії біотехнології Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Використовували бульби сортів картоплі, надані Інститутом картоплярства НААН: ранніх – Подолянка, Серпанок і Повінь; середньоранніх – Фантазія, Оберіг і Зелений гай; середньостиглих – Калинівська і Билина; середньопізніх – Червона рута і Поліське джерело.

Роботу виконували у двох напрямках: 1) вивчали вплив модифікованого поживного середовища Мореля на утворення пагонів картоплі; 2) спостерігали за особливостями морфогенезу, а саме інтенсивністю пагоно-, корене- та калюсоутворення різних сортів картоплі в умовах *in vitro* відповідно до загальноприйнятих методик [9–11].

Апікальні меристеми виділяли з етіологованих паростків картоплі, довжина яких становила 2,5–3,2 см. Паростки витримували в 0,1%-му розчині діюди упродовж 5 хв. Потім їх відмивали в стерильній воді три рази по 10 хв. Стерильні паростки переносили в стерильну чашку Петрі з фільтрувальним папером і додавали декілька крапель стерильної води для запобігання їхньому підсиханню.

У ламінарному боксі з верхівки паростків видаляли покривні листочки, послідовно звільняючи бокові й верхівкові меристеми з примордіальними листками. Потім вирізували меристематичний купол з двома примордіальними листками (0,1–0,2 мм), а також виділяли меристеми пазушних бруньок (0,1–0,3 мм). Меристеми висаджували на стерильне поживне середовище Мореля з різними концентраціями регуляторів росту. Для контролю використовували поживне середовище Мореля, що мало склад вихідних компонентів (середовище № 1) на 1 л: макро-MS (Murasige-Скуга) – 100 мл, мікро-MS – 1 мл, вітаміни Уайта – 1 мл, Fe – хелат – 5 мл, аскорбінова кислота – 3 мг, сахароза – 20 г, агар-агар – 7 г, рН – 5,7–5,8. За вмістом регуляторів росту поживні середовища поділялись на наступні варіанти (табл. 1).

Приготовлені середовища розливали в пробірки довжиною 10–15 см і діаметром до 3 см, автоклаували при тиску 0,7–0,8 атм. (115°C) 15 хв. Верхівкові меристеми упродовж двох тижнів вирощували в термостаті при температурі 24–26°C без освітлення для проходження ризогенезу [7].

Надалі меристеми картоплі культивували в кліматичній кімнаті при температурі 24–26°C з інтенсивністю освітлення 2–5 клк, вологістю 70% і 16-годинним фотоперіодом. Спостереження за ростом апікальних меристем картоплі проводили кожні 10 діб упродовж 30 діб.

Таблиця 1. Склад поживних середовищ залежно від вмісту регуляторів росту

Регулятори, мг	Середовище				
	№ 1 (контроль)	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
Кінетин	0,25	0,25	0,5	0,002	0,5
ІОК	1,0	–	1,0	–	1,0
НОК	–	0,25	–	0,5	–
Аденін	0,25	0,5	0,25	1,0	0,25
Гіберелін	–	–	0,05	–	–

Для отримання маточних рослин використовували проміжні живці пагонів пророщених бульб довжиною 1–2 см з однією парою листків. Живцювання рослин у культурі *in vitro* є найкращим методом для швидкого розмноження картоплі. Даний метод дає змогу повністю ліквідувати повторне ураження рослин при їхньому розмноженні, а також отримати за 2–3 міс. 3–5 тис. рослин [3, 9]. Усі операції з живцювання проводили в ламінар-боксі. Стеблові експлантати стерилізували в розчині перекису водню в концентрації 17,5% упродовж 8–10 хв, після чого промивали тричі в стерильній воді, підсушували в чашках Петрі на фільтрувальному папері й культивували на безгормональному середовищі МС. Отримані пагони відокремлювали від первинного експлантату і знову самостійно культивували на живильному середовищі МС з кінетином. У результаті оптимізації процесу стерилізації та підбору концентрації перекису водню і часу стерилізації було отримано до 70% життєздатних культур.

Як базове робоче середовище використовували живильне середовище Мурасіге-Скуга, а залежно від цілей досліджень – різні його модифікації: МС -К для утворення калюсу – МС + 200 мг/л мезоінозиту, 0,5 мл/л фолієвої кислоти, 0,2 мг/л кінетину, 1 г/л гідролізату казеїну, 1 мг/л аденіну, 1 – гліцину, 3 мг/л 2,4-Д; МС -П для пагоноутворення – МС + 0,5 мг/л кінетину. Живильне середовище для утворення пагонів містило речовини групи цитокінінів кінетин (1:2) у концентрації 0,5 мг/л, який індукує розвиток пазушних бруньок і стимулює ріст органів, що перебувають у стані спокою. Приготовлені середовища розливали в пробірки, автоклаували при тиску 0,7–0,8 атм. (115°C) 15 хв.

Надалі рослини картоплі культивували в кліматичній кімнаті при температурі 24–26°C з інтенсивністю освітлення 2–5 клк, вологістю 70% і 16-годинним фотоперіодом. Спостереження за рослинами проводили кожні сім діб. Через 1,5–2 тижні рослини живцювали і висаджували в пробірку на живильне середовище так, щоб частина стебла нижче листка була розміщена в агарі, а пазушна брунька перебувала на його поверхні. З однієї рослини отримували 5–8 живців. Культивування живців проводили при температурі +20 –23°C, відносній вологості 70–80%, освітленні 3–4 тис. лк упродовж 16 год. Спостереження за інтенсивністю росту пагонів проводили через 14 днів. Утворення мікробульб спостерігали, культивуючи стеблові експлантати на модифікованому середовищі МС з додаванням різних концентрацій регуляторів росту.

Результати досліджень. Вивчення впливу модифікованого середовища Мореля показало, що у рослин, які росли на середовищі № 1 (контроль), відмирили верхівки і починали рости пазушні бруньки верхніх листків.

На середовищі № 2 пагони росли повільно, мали світло-зелене забарвлення, коренева система розвивалась повільно. Рослини, що були висаджені на поживне середовище № 4, гірше формували кореневу систему порівняно з контролем, пазушні бруньки затримувалися в рості. На поживних середовищах № 3 і № 5 розвивались високостеблові рослини з рівномірно розміщеними листками, темно-зеленого забарвлення та добре розвинутою кореневою системою.

Для культивування апікальних меристем картоплі сортів Фантазія і Подольнка кращими були середовище № 5, що містило в своєму складі кінетин – 0,5 мг/л, ІОК – 1,0, аденін – 0,25 мг/л та середовище № 3, що містило кінетин – 0,5 мг/л, ІОК – 1,0, аденін – 0,25 та гіберелін – 0,05 мг/л.

Дослідження морфогенетичного потенціалу сортів картоплі показало, що після чотирьох тижнів культивування найкращий розвиток рослин спостерігався у середньораннього сорту Зелений гай, рослини якого утворювали пагони до 12 см з рівномірно розміщеними листям, великою кількістю міжвузлів (6–11) довжиною до 1,5 см і добре розвинутою кореневою системою (табл. 2).

Рослини сортів Оберіг і Билина інтенсивно формували бічні пагони, мали короткі міжвузля, гірше формували кореневу систему, мали укорочений нерозвинений корінь (рис. 1).

Таблиця 2. Середні дані висоти пагонів картоплі

Сорт	Висота пагонів у день висаджування, мм	Середня висота пагонів, мм, при експозиції, дні		
		на 14-й	на 21-й	на 28-й
Серпанок	15	31	48	62
Повінь	15	27	39	59
Оберіг	15	42	61	77
Зелений гай	15	59	92	122
Калинівська	15	48	75	93
Билина	15	32	51	69
Червона рута	15	42	68	91
Поліське джерело	15	39	59	87

У ранніх сортів Серпанок і Повінь спостерігалось слабе пагоноутворення, невелика довжина рослин, відсутність коренів (табл. 3).

У рослин середньопізнього сорту Червона рута коренеутворення відбувалося з потовщенням та інтенсивним фіолетово-коричневим забарвленням нижньої частини пагона (рис. 2).

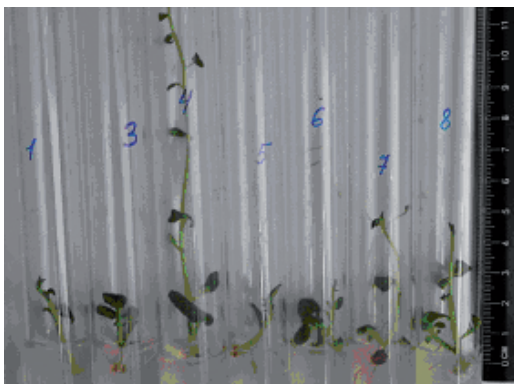
Середньоранній сорт Зелений гай і середньопізній – Поліське джерело мали найбільш інтенсивне утворення коренів.

Для подальшої роботи у напрямку клітинної селекції в умовах *in vitro* на стійкість проти грибних і бактеріальних хвороб найбільш придатний середньоранній сорт Зелений гай.

З метою визначення особливостей бульбоутворення у рослин картоплі зазначених сортів використовували маточні рослини з

Рис. 1. Пагоноутворення в умовах *in vitro* сортів картоплі, різних за строками стиглості:

1 – ранній сорт Серпанок; 3, 4 – середньоранні сорти Оберіг і Зелений гай; 5, 6 – середньостиглі сорти Калинівська і Билина; 7, 8 – середньопізні Червона рута і Поліське джерело



Таблиця 3. Характеристика росту рослин залежно від сорту картоплі

Сорт	Кількість міжвузлів, шт.	Довжина міжвузля, см	Висота рослин, мм	Довжина коренів, см	Кількість коренів, шт.	Коефіцієнт розмноження
Серпанок	4–6	1,12	59–62	0,5	1	85
Повінь	3–5	1,02	45–59	0,8	1	72
Оберіг	6–8	1,31	77–98	1,2	3	110
Зелений гай	7–12	1,52	122–148	6,2	6	145
Калинівська	8–10	1,48	92–121	3,5	5	130
Билина	5–7	1,29	69–84	2,2	3	93
Червона рута	6–9	1,41	91–119	2,2	2	122
Поліське джерело	4–7	1,26	75–84	2,4	3	102

подальшим живцюванням і висаджуванням на живильне середовище МС з різними концентраціями гормонів. При цьому рослини витримували в умовах 8-годинного фотоперіоду при температурі 14–15°C упродовж 8–10 діб, а потім поміщали в темне місце. Процес бульбоутворення повністю проходив в умовах темряви. У результаті досліджень було встановлено певну залежність між інтенсивністю росту пагонів і бульбоутворенням. Активне бульбоутворення починалося тоді, коли ріст пагонів сповільнювався або зовсім припинявся. На 36-й день після висадження живців на живильне середовище утворювалися перші мікробульби. На живильному середовищі МС з додаванням нафтилоцтової кислоти

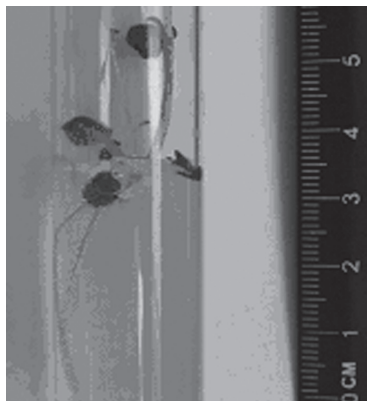


Рис. 2. Утворення коренів в умовах *in vitro* (сорт Червона рута)

(НОК), індолілоцтової кислоти (ІОК) в концентрації 0,1 мг/л та мезоінозиту 100 мг/л рослини сформували 80–90% мікробульб та 75% – на середовищі МС, до якого додавали гіберелін 0,02 мг/л і кінетин 0,25 мг/л. Значно менше (до 30%) отримано мікробульб у рослин на живильному середовищі МС з гібереліном – 0,02 мг/л, кінетином – 0,25 та НОК – 0,1 мг/л.

Висновки. При культивуванні апікальних меристем картоплі на поживних середовищах різного складу виявлено, що найбільш інтенсивний їхній ріст спостерігався на модифікованому середовищі Мореля з кінетином – 0,5 мг/л, ІОК – 1,0, аденіном – 0,25 мг/л. Високі результати було отримано і на середовищі, що містило кінетин – 0,5 мг/л, ІОК – 1,0, аденін – 0,25 та гіберелін – 0,05 мг/л. Найбільша кількість рослин картоплі, що сформували мікробульби (94%), була у рослин на живильному середовищі МС з додаванням нафтилоцтової кислоти (НОК), індолілоцтової кислоти (ІОК) в концентрації 0,1 мг/л та мезоінозиту 100 мг/л.

Найбільшу інтенсивність росту пагонів спостерігали у середньораннього сорту Зелений гай, менш інтенсивно росли пагони середньостиглого сорту Калинівська і середньопізніх сортів Червона рута та Поліське джерело. Найменша інтенсивність росту була у ранніх сортів Серпанок і Повінь. Середньоранній сорт Зелений гай характеризувався високим коефіцієнтом розмноження — 144, інтенсивним калусоутворенням. За цими показниками до нього наближалися середньостиглий сорт Калинівська і середньопізні сорти Червона рута та Поліське джерело. Ці сорти характеризуються високим морфогенетичним потенціалом і рекомендуються для подальшої роботи в напрямку клітинної селекції в умовах *in vitro* на стійкість проти грибних і бактеріальних хвороб.

1. *Захарчук Н.А.* Клітинний добір у селекції картоплі на стійкість проти фітофторозу / Н.А. Захарчук, Т.М. Олійник, О.М. Зайченко // Вісн. Білоцерків. ДАУ. – Біла Церква, 2001. – Вип. 15. – С. 52–60.

2. *Захарчук Н.А.* Використання культури клітин у селекції картоплі / Н.А. Захарчук, Т.М. Олійник // Картоплярство. – К.: Аграр. наука, 2001. – Вип. 31. – С. 58–61.

3. *Глеба Ю.Ю.* Теоретические и прикладные аспекты клеточной инженерии растений / Ю.Ю. Глеба, М.К. Зубко // Биотехнология. Итоги науки и техники. – М., 1988. – Т. 9. – С. 3–72.

4. *Кучко А.А.* Соматональна мінливість у картоплі / А.А. Кучко, Т.М. Олійник. – К.: Довіра, 1998. – 191 с.

5. Маруненко И.М. Клеточная селекция картофеля: создание форм, устойчивых к бактериальным гнилям / И.М. Маруненко, М.Н. Предко, А.А. Кучко // Методы отбора по комплексам признаков в селекции растений. – Ялта, 1989. – С. 65.

6. Олійник Т.М. Клітинна селекція на стійкість проти фітопатогенів / Т.М. Олійник, Н.А. Захарчук // Вісн. ДААУ. – Житомир, 2000. – Спецвип. – С. 53–54.

7. *A non-browning somaclonal variant of Danshakuimo (Irish Cobbler)* / Akihiro Arihara, Tomoyuki Kita, Satoshi Igarashi et al. // *American Journal of Potato Research*. – 1995. – Vol. 72, № 11. – P. 701–705.

8. Леонова Н.С. Селекция картофеля на устойчивость к *Rhizoctonia solani* в культуре *in vitro* / Н.С. Леонова, А.В. Железнов // Сибирский вестн. с.-х. науки. – 2009. – № 4. – С. 9–16.

9. Мелик-Саркисов О.С. Использование эффекта клубнеобразования в биотехнологии картофелеводства / О.С. Мелик-Саркисов, И.Н. Фаддеева // Вестн. с.-х. науки. – 1989. – № 9. – С. 86–91.

10. *Семеноводство картофеля, контроль качества, сертификация: методич. пособие.* – М., 2002. – 335 с.

11. *Методичні рекомендації щодо проведення досліджень з картоплею / УААН, Ін-т картоплярства.* – Немішаєве, 2002. – 182 с.