

УДК 602.4:635.21:631.52

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛУБНЕОБРАЗОВАНИЯ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ ЦЕННОГО ГЕНОФОНДА *SOLANUM TUBEROSUM* L. УКРАИНСКОЙ СЕЛЕКЦИИ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*****Оксана Леонидовна Кляченко, Вера Витальевна Бородай**

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины  
03041, Україна, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15  
veraboro@gmail.com

Подобраны оптимальные условия клубнеобразования для различных генотипов картофеля украинской селекции. Инициация клубнеобразования происходила быстрее при выдерживании растений в условиях 8-часового фотопериода и регулируемой температуре +19-20°C первые 8-10 суток с последующим культивированием в условиях рассеянного света (3-4 клк). Изучены особенности клубнеобразования различных по срокам созревания генотипов, получены микроклубни размером 3-11 мм и массой 114-287 мг. Оптимизированы режимы среднесрочного хранения микроклубней.

**Ключевые слова:** *Solanum tuberosum* L.; клубнеобразование *in vitro*; микроклубни; генотип

**Введение**

Микроклубни картофеля (*Solanum tuberosum* L.), получаемые в культуре *in vitro*, широко применяются для массового ускоренного размножения оздоровленного пробирочного материала в системе элитного семеноводства, хранения и размножения оздоровленного материала, создания новых ценных форм методом культуры тканей, размножения уникальных регенерантов, полученных при отдалённой соматической гибридизации, в опытах по трансформации, клеточной селекции [1,3,6,8,10]. Также, микроклубни используют для безопасного переноса при интродукции, транспортировке и обмене генофондом между селекционными учреждениями, рассылки в процессе карантинных мер испытания и досмотра.

Хранение генофонда вегетативно размножаемых культур, к которым относится и картофель, в виде семян невозможно, поскольку половое размножение нарушает генетическую составляющую сортов, представленных высоко гетерозиготными генотипами. К современным технологиям сохранения генофонда в контролируемых условиях среды относятся: введение в культуру *in vitro* различных генотипов, оздоровление растений от болезней, микроразмножение, мониторинг фитосанитарного статуса растений, генотипирование, среднесрочное *in vitro* хранение, криоконсервация и долгосрочное криохранилище [2].

Помимо полевых коллекций для надёжного сохранения генофонда картофеля необходимо создавать дублетные *in vitro*, одним из основных подходов которых является сохранение коллекции в виде медленно растущих растительных культур пробирочных растений [4,7,11,13]. При хранении *in vitro* коллекций в оптимальных условиях роста (+20-23°C) возникает необходимость частого переноса микрорастений на свежую питательную среду, что повышает стоимость хранения образцов и увеличивает риск инфицирования коллекций, особенно при использовании растений, не прошедших тестирования на патогены. Для увеличения интервала между пассажами используют различные методы и приемы, основанные на замедлении роста пробирочных растений. Получение и хранение при пониженных температурах запасающих органов растений, в том числе и микроклубней — один из методов

замедления роста культур. Особенности сформировавшихся микроклубней в заключительной фазе их роста во многом определяются генотипом и, следовательно, требуют дифференцированных условий инициации и формирования клубней *in vitro*.

Цель работы – изучение особенностей клубнеобразования различных генотипов украинской селекции, оптимизация режимов их среднесрочного хранения.

### Объекты и методы исследования

Исследования проводили в лаборатории биотехнологии растений Национального университета биоресурсов и природопользования Украины в течение 2010-2013 гг. В качестве объекта исследования были использованы клубни картофеля: ранних сортов – Серпанок и Повинь, среднеранних – Обериг и Зелёный Гай, среднеспелых – Калиновская и Былина, среднепоздних – Червона Рута и Джерело Полесья.

Для получения маточных растений использовали промежуточные междуузлия пророщенных клубней длиной 1-2 см с одной парой листьев, содержащие пазушную меристематическую ткань. Полученные асептические побеги отделяли от первичного эксплантата и самостоятельно культивировали на модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга (МС) [1,5, 9, 12].

Особенности образования микроклубней изучали на питательных средах с различными концентрациями сахарозы (4-9 %), фитогормонов (ИУК – 0,1-0,4 мг/л, кинетин (0,5-1,5 мг/л), мезоинозита (110-120 мг/л). Влияние продолжительности светового дня и температуры исследовали при длительности фотопериода (14-16, 8-10 часов), освещённости (отсутствие освещения, 3-4 клк, 6-8 клк), температурных режимах среднесрочного хранения микроклубней (+2-4, 6-8, 8-10°C).

Определение особенностей клубнеобразования у растений указанных сортов проводили на модифицированной среде Д.П.Остапенко [6]. Сформировавшиеся микроклубни сохраняли в холодильной камере на протяжении 4-6 месяцев при различных регулируемых температурах.

В таблицах представлены средние арифметические значения из полученных величин и их стандартные отклонения (SD). Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием прикладного программного обеспечения Statistika 5.1 и Microsoft Office XP® для Microsoft Windows®.

### Результаты и обсуждение

Клубнеобразование у растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) является высоко скоординированным процессом, при котором происходят морфологические, физиологические и биохимические изменения растения на разных этапах онтогенеза. Стадиями клубнеобразования являются индукция и инициация столонов, рост столонов и его ветвление, прекращение роста столонов, индукция и инициация клубней, рост и созревание клубней [3, 13]. Одними из основных условий этих процессов являются углеводный и гормональный факторы, которые оказывают воздействие на фотопериодические реакции, комплекс биохимических процессов. Клубнеобразованию предшествует повышение фотосинтетической активности, накопление фонда ассимилятов в стеблях и интенсивный транспорт углеводов в направлении клубней [1, 3, 9].

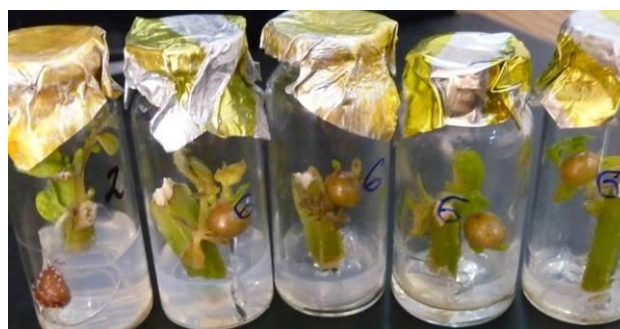
В наших исследованиях индукция столонообразования происходила на 5-6 сутки после появления боковых побегов при культивировании стеблевых эксплантатов в условиях рассеянного света 0,5-1 клк на среде МС, дополненной кинетином в концентрации 0,5 мг/л и 2-4% сахарозой. Действие цитокининов проявлялось в интенсивном образовании боковых побегов и развитии столонов. В дальнейшем на

протяжении 3-5 недель после утолщения субапикальной зоны столонов наблюдалось формирование микроклубней. Впоследствии интенсивность клубнеобразования снижалась, что связано с окончанием периода их формирования и дальнейшим увеличением их размеров. Микроклубни, как правило, формировались на столонах, а также развивались из пазушных почек на стеблях (рис.1).



**Рис. 1 Особенности формирования микроклубней *Solanum tuberosum* в культуре *in vitro***

В некоторых случаях при снятии апикального доминирования наблюдалось торможение осевого роста, замедление роста побегов и формирование микроклубней в пазухах листьев стеблевых эксплантатов на безгормональной среде МС с 2% концентрацией сахарозы при 16 часовом фотопериоде (рис.2).



**Рис. 2 Образование микроклубней при снятии апикального доминирования на безгормональной среде МС**

Различия в индукции клубнеобразования имели сортовую зависимость (рис.3). Количество растений, образовавших микроклубни, колебалось в пределах 68,7-98,2%. Сорта Обериг, Зеленый Гай, Червона Рута и Калиновская характеризовались наиболее высокой способностью к образованию микроклубней и формировали в среднем 1,7-2,1 шт. микроклубней в расчёте на 1 растение, сорта Былина и Джерело Полесья — соответственно 1,2 и 1,4, сорта Серпанок и Повинь — 1,1 и 1,0. При этом микроклубни имели овальную или удлинённую форму, различные окраску (от темно – зелёной до тёмно – фиолетовой в зависимости от генотипа) и размеры (3-1 мм). При последующем клональном микроразмножении у соматклонов с незначительными морфологическими отличиями продуктивность формирования клубней практически не отличалась от родительских форм. У низкорослых, кустистых форм с мелкими листьями и ослабленным апикальным доминированием микроклубнеобразование выражалось крайне слабо (незначительное утолщение столонов).



**Рис. 3** Микроклубни *Solanum tuberosum* сортов украинской селекции: ранних сортов – Серпанок (1) и Повинь (2), среднеранних – Обериг (3), среднеспелых – Калиновская (5) и Былина (6), среднепоздних – Червона Рута (7)

Группа спелости сортов картофеля не оказывала существенного влияния на формирование *in vitro* микроклубней. В каждой группе имелись сорта, как с высокой, так и со средней и низкой способностью формировать микроклубни. У всех изучаемых сортов индукция микроклубнеобразования происходила в первый месяц. Статистически достоверных закономерностей между растениями разных групп созревания не наблюдалось (табл.).

Таблица

**Особенности образования микроклубней в зависимости от гентотипа**

Сорта	Инициация процессов клубнеобразования, день	Образование микроклубней, %	Средняя масса микроклубней, (мг)	Продуктивность клубнеобразования, шт	Распределение микроклубней по фракциям, %		
					крупная, 8-10 мм	средняя, 5-7 мм	мелкая, до 5 мм
<i>Ранние</i>							
Серпанок	18,3	75,3	148±12	1,1±0,02	15,2	50,5	34,3
Повинь	25,6	68,7	114±15	1,0±0,01	13,3	34,6	52,1
<i>Среднеранние</i>							
Обериг	17,5	85,1	236±21	1,9±0,03	45,1	35,2	19,7
Зелёный Гай	19,9	92,8	363±20	1,7±0,01	25,4	43,7	30,9
<i>Среднеспелые</i>							
Калиновская	21,3	81,6	270±12	2,1±0,02	38,7	39,2	22,1
Былина	19,1	81,4	178±17	1,2±0,04	30,2	41,5	28,3
<i>Среднепоздние</i>							
Червона Рута	14,0	87,3	287±18	1,8±0,02	29,4	36,8	33,8
Джерело Полесья	16,7	77,4	218±14	1,4±0,03	20,0	36,1	43,9

Стимулирующее влияние на процессы клубнеобразования имела среда МС, дополненная кинетином - 0,5-0,8 мг/л, ИУК - 0,1-0,2 мг/л, мезоинозитом - 100-110 мг/л, сахарозой - 4-9 %. Для сортов, склонных к клубнеобразованию *in vitro*, концентрация сахарозы составляла 4-6%, а для сортов, у которых эти процессы затруднены – 6-8% [2,4]. Максимальное число растений с клубнями наблюдали при содержании в среде кинетина 0,5-0,8 мг/л, при снижении или увеличении концентрации этих гормонов число микроклубней уменьшалось.

Наименьшее количество микроклубней сформировалось при 16 часовом фотопериоде, а дальнейшее культивирование в течение 1,5-2,0 месяцев в регулируемых условиях (14-16 часовом фотопериоде, освещённости 6000-8000 лк, температуре +20-

22°C) индуцировало прорастание формирующихся клубней. Уменьшение интенсивности освещённости привело к заметному увеличению образцов с микроклубнями. В условиях 8-часового фотопериода и регулируемой температуре +19-20°C первые 8-10 суток с последующим культивированием в условиях темноты, формировались мелкие микроклубни в небольшом количестве (рис.4). В условиях непрерывного темнового периода образование микроклубней практически не происходило.

Высокая интенсивность процессов микроклубнеобразования происходила первые 10-12 дней при 8-ми часовом фотопериоде, а в дальнейшем – при освещённости 3-4 клк (в условиях рассеянного света) и регулируемой температуре +19–21°C.



**Рис. 4 Особенности клубнеобразования *Solanum tuberosum* при различных режимах освещённости**

Для хранения собранных микроклубней в холодильной камере на протяжении 4-6 месяцев наиболее оптимальной была регулируемая температура +2-4°C. При этом к концу хранения образовывались небольшие ростки, которые не снижали высокой жизнеспособности клубней, которые затем высаживали в стерильный грунт (рис.4). Растения из микроклубней образовывали 1-2 стебля с 5-10 междоузлиями. Приживаемость растений колебалась в пределах 80-89 %.



**Рис. 4 Проращивание микроклубней картофеля после длительного хранения в условиях *ex vitro***

Учитывая естественный физиологический период покоя микроклубней, который искусственно продлевается за счет постоянного хранения образцов при низких положительных температурах (+2-4°C), а затем замедленное прорастание микроклубней в этих условиях, беспересадочный цикл хранения образцов можно продлить на длительный период.

### **Выводы**

В результате исследований было установлено влияние сортовых особенностей картофеля на процессы микроклубнеобразования. При этом сорта Обериг, Зеленый Гай, Червона Рута и Калиновская характеризовались наиболее высокой способностью к образованию микроклубней.

Подобраны оптимальные условия клубнеобразования для генотипов украинской селекции при выращивании на среде МС, дополненной кинетином в концентрации 0,5-0,8 мг/л, ИУК - 0,1-0,2 мг/л, мезоинозитом - 100-110 мг/л, сахарозой - 4-9 %. Инициация клубнеобразования у сортов Обериг, Зеленый Гай, Червона Рута и Калиновская происходила быстрее при выдерживании растений в условиях 8-часового фотопериода и регулируемой температуре +19-20°C первые 8-10 суток с последующим культивированием в условиях рассеянного света (3-4 клк).

Коллекция *in vitro* сохранялась в генобанке в условиях регулируемой температуры +2-4°C в виде микроклубней при отсутствии освещения на протяжении 4-6 месяцев.

Хранение в коллекции *in vitro* высокопродуктивных, адаптированных к местным климатическим и почвенным условиям сортов картофеля, различающихся по продолжительности вегетационного периода (по скороспелости) и назначению использования является важным этапом элитного семеноводства. Оптимизация условий индукции клубнеобразования картофеля имеет практическую направленность и является необходимой составной частью работы по изучению новых ценных форм растений этой культуры в культуре *in vitro*.

#### Список литературы

1. Аветисов В.А., Мелик-Саркисов О.С., Соболюкова Г.И. Индукция микроклубнеобразования на регенерантах из каллусов картофеля // Сельскохозяйственная биология. – 1989. – № 5. – С. 26-28.
2. Гавриленко Т.А., Дунаева С.Е. и др. Стратегия сохранения генофонда вегетативно размножаемых сельскохозяйственных растений в контролируемых условиях среды в ВИРе // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира: материалы VI Международной научно-практической конференции (Ялта, 12-17 октября 2014 г.). – Симферополь, 2014. – С.122.
3. Дерябин А.Н., Юрьева Н.О. Экзогенная регуляция клубнеобразования у *Solanum tuberosum* L. в культуре *in vitro* // Сельскохозяйственная биология. – 2010. – № 3. – С. 17-25.
4. Коновалова Г.И. Использование биотехнологических методов и приемов в современном семеноводстве картофеля // Актуальные проблемы науки и техники. Вопросы картофелеводства. Науч. тр. М. – 2006. – С. 332-336.
5. Мирзохонова Г.О., Назарова Н.Н., Давлятназарова З.Б., Каримов Б.К., Алиев К.А. Гормональная регуляция инициации и роста клубней регенерантов картофеля *in vitro* // Известия АН РТ. – 2005. – № 3-4 (153). – С.45-51.
6. Остапенко Д.П., Мороз И.Х., Кононученко В.В., Резник В.С. Получение микроклубней картофеля *in vitro* и формирование элиты на их основе: метод. рекомендации. – Киев: Изд-во УНИИКХ, 1990. – 27 с.
7. Трускинов Э.В. Создание коллекции картофеля *in vitro*: итоги, проблемы, перспективы // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2007. – Т. 163. – С. 82-90.
8. Хромова Л.М. Каллусо- и морфогенез в культуре тканей картофеля // Исследования по клеточной селекции картофеля. – М., 1984. – С. 81 – 88.
9. Яковлева Г.А., Коновалова Г.И., Подобед Н.И. О размножении картофеля микро- и миниклубнями // Известия Академии аграрных наук Республики Беларусь. – 1999. – № 3. – С. 48-51.
10. Dobránszki J., K.Tábori, Hudák I., Benkeblia N., Tennant P. In Vitro Tuberization in Hormone-Free Systems on Solidified Medium and Dormancy of Potato Microtubers

Magyarné //Potato I. Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology. – 2008. – Is. 1. – P.82 – 94.

11. Ewing E.E., Struik P.C. Tuber formation in potato: induction, initiation, and growth //Struik Horticultural Reviews. – 1992. – № 14. – P. 89 – 198.

12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol.15. – P. 473 – 497.

13. Sarkar D. The signal transduction pathways controlling in planta tuberization in potato: an emerging synthesis // Plant Cell Reports . – 2008. – Vol. 27. – P. 1 – 8.

*Статья поступила в редакцию 09.09.2015 г.*

**Klyachenko O.L., Boroday V.V. Tuberization as a method to preserve a valuable gene pool of *Solanum Tuberosum* l. from Ukrainian selection being cultivated *in vitro* // Bull. of the State Nikit. Botan. Gard. – 2015. – № 116. – P. 67 – 73.**

The most favorable conditions of tuberization for different *Solanum tuberosum* gene pools from Ukrainian selection were determined in terms of the research. Initiation of tuberization was more intensive if plants were kept under conditions of 8-hours photoperiod and regulated temperature +19-20°C for the first 8-10 days with further cultivation under conditions of diffused light (3-4klux). Within research it became possible to investigate tuberization peculiarities of gene pools with different ripening terms, get microtubers of 3-11mm and 114-287mg and optimize regimes of microtubers medium-term storage.

**Key words:** *Solanum tuberosum* L; tuberization *in vitro*; microtubers; gene pool