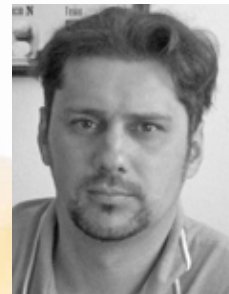


# Депонирование национальной коллекции картофеля

**Аннотация.** В статье описаны классические методы работы по депонированию национальной базовой коллекции сортов картофеля в культуре *in vitro*. Указаны преимущества новой схемы отбора, а также описан процесс подготовительных работ, предшествующих переводу в культуру ткани и способы депонирования базисной коллекции.

**Ключевые слова:** семенной картофель, меристема, экспланты, растения *in vitro*, клон.



**Владимир Анципович,**  
заведующий лабораторией  
микрклонального  
размножения картофеля  
НПЦ НАН Беларуси  
по картофелеводству  
и плодоовощеводству

Картофель – одна из важнейших сельскохозяйственных и продовольственных культур. Его потребляют более 3 млрд человек и выращивают в 150 странах. В относительно короткие сроки с единицы площади он дает больше продуктов питания, чем любая другая сельскохозяйственная культура, и способен решать проблемы не только мирового производства продуктов питания, но и биоэнергетики [1].

Из-за своих биологических особенностей картофель в наибольшей степени подвержен вирусным и виroidным заболеваниям. Мировые потери от них составляют 90 млн т, урожайность снижается на 40–50%, а утрата клубней при хранении может достигать 15–20%. Определяется это видом возбудителя, его штаммом,

степенью устойчивости сорта, условиями выращивания и погодой. Легкие формы вирусных заболеваний снижают урожай в среднем на 10–20%, тяжелые – на 70–85%, а в некоторых случаях – до 100%. Содержание крахмала в пораженных клубнях по сравнению со здоровыми обычно снижается на 0,8–4,6%. В них уменьшается количество сырого протеина и витаминов С, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>.

Одной из основ для создания корнеплодов, обладающих комплексной устойчивостью к максимально возможному числу вирусов, является мировая коллекция диких и культурных видов, сортов, селекционных клонов и гибридов картофеля Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова. Однако и сама коллекция в значительной степени подвержена вирусному вырождению. Задача сохранения и изучения генофонда для обеспечения селекционеров разнообразным исходным материалом становится трудно выполнимой из-за различных морфо-физиологических отклонений, затрудняющих таксономическую идентификацию растений. В дальнейшем происходит явное вырождение и возникает угроза полной утраты образцов [2].

Поскольку эффективных мер борьбы с вирусами пока не найдено, основным направлением получения высококачественного семенного материала является его оздоровление в процессе микроклонального размножения с помощью современных биотехнологических методов.

Метод культуры изолированных тканей подразумевает выращивание изолированных клеток на искусственных питательных средах (*in vitro*) в стерильных

условиях. В основе лежит уникальное свойство растительных клеток – тотипотентность – их способность при определенных условиях вторично дифференцироваться и под влиянием внешних условий выбирать тот или иной путь морфогенеза, в ходе которого заново возникают ткани и органы. Полученное в результате растение *in vitro* носит название растения-регенеранта [3].

### Получение исходного материала для выращивания безвирусного семенного картофеля

Схема оздоровления сортов картофеля для перевода в культуру *in vitro* и создания из них базисных коллекций с последующим микроклональным размножением – это составная часть системы первичного семеноводства картофеля, включающая следующие этапы:

- *полевой отбор высокопродуктивных клонов картофеля, полностью соответствующих морфологическим показателям сорта, а также визуально здоровых от вирусных, бактериальных болезней и вирусов веретеновидности клубней картофеля;*
- *хранение клонов с последующей закладкой клубней на проращивание;*
- *выделение индексов с посадкой их в кассеты на перлит для получения растений;*
- *иммунно-ферментный анализ (ИФА) на листовых пробах, взятых у растений-индексов, с последующей браковкой больного материала [4, 5];*
- *проведение завершающего цикла диагностики – тестирование методом высокомолекулярной полимеразной цепной*

*реакции на листовых пробах, здоровых после первого этапа проверки растений-индексов с последующей браковкой [5];*

- *перевод здорового материала в культуру *in vitro*, получение исходных материнских растений (линий);*
- *создание коллекций из здоровых линий сортов и поддержание их в культуре ткани [6, 7];*
- *плановая диагностика коллекций новых и популярных сортов методом ИФА до этапа ускоренного микроклонального размножения;*
- *ускоренное размножение новых и популярных сортов в объемах, предусмотренных схемой семеноводства;*
- *производство рассады из растений *in vitro* на субстрате «Биона» с целью адаптации к условиям *in vivo*;*
- *посадка в теплицы рассады для производства первого клубневого поколения и плановая диагностика материала в фазу бутонизации – цветения.*

Применение данной схемы позволяет получать безвирусный семенной материал картофеля (первое клубневое поколение) через 2 года от момента отбора клонов.

Выделяют принципиально различные типы клонального микроклонального размножения – активацию уже существующих в растении меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки стебля) и индукцию возникновения почек или эмбрионов *de novo* [8].

Успешное применение культуры верхушечной меристемы с целью элиминации вируса на декоративных растениях позволило распространить данный метод на сельскохозяйственные культуры (впервые применил французский ученый Морель

на картофеле в 1955 г.) [9]. В научном мире меристема считается наиболее надежным способом освобождения сильно зараженных сортов картофеля от вирусов.

Меристема – конус активно делящихся клеток, расположенных на кончике побегов или корней. Для оздоровления используют их шириной 0,1 мм и длиной 0,25–0,3 мм. Метод основан на неравномерном распределении вируса в растении, из-за чего наименьшая концентрация наблюдается в зоне апикальной меристемы. Объясняют это несколькими теориями:

- *медленное распределение вирусов в активно делящихся клетках;*
- *подавление размножения вирусов высокой концентрацией ауксинов;*
- *влияние компонентов питательной среды.*

Успех оздоровления от вирусов зависит от размера меристемы, возбудителя, физических и химических факторов, сорта.

С другой стороны, на процент приживаемости меристем влияют длина и положение меристемы, питательная среда, сорт, препаративная техника, время года.

### **Питательные среды для выращивания растений из меристем и черенков**

В качестве основных ингредиентов питательных сред используют макро- и микросоли, витамины, органические вещества, регуляторы роста. Их минеральный состав должен обеспечить сбалансированное и достаточное питание меристем и растений *in vitro*. Среда должна быть достаточно буферной, иначе при культивировании она будет подкисляться [10].

Из макросолей в качестве источников азота добавляют соли: нитрат аммония  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , кальция –  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , калия –  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , магния –  $\text{MgSO}_4$ , железа –  $\text{FeSO}_4$ . Из микроэлементов, необходимых для регенерации меристем в растения, используют В, Mn, Zn, I, Mo, Cu, Co.

Среди компонентов питательной среды обязательными являются регуляторы роста (ауксины, гиббереллины и цитокинины) как природного, так и синтетического характера.

В 1956 г. американские ученые Скуг и Миллер предложили гипотезу гормональной регуляции в культуре клеток и тканей, которая сейчас известна как правило Скуга – Миллера: если концентрация ауксинов и цитокининов в питательной среде относительно равны или количество первых незначительно больше вторых, то образуется каллус; если ауксины значительно превалируют, то формируются корни; если их значительно меньше, чем цитокининов, то образуются почки, побеги.

Наиболее приемлемой для культивирования меристем картофеля является среда с минеральной основой Мурасиге – Скуга (М–С).

В НППЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству в культуре *in vitro* для начального роста меристем применяют питательную среду М–С, разработанную в Институте картофелеводства НААН Украины, для пересадки и укоренения проростков из меристем – модификацию среды Мурасиге – Скуга Всероссийского научно-исследовательского института картофельного хозяйства им. А. Г. Лорха, а для микрочеренкования – собственную

модификацию этой же среды. Каждая из них подобрана применительно к определенному этапу морфогенеза.

В отечественном НППЦ питательные среды готовят только на основе агара. Сотрудниками проводились исследования по его замене на дешевые аналоги природного происхождения – перлит и агроперлит [11], но широкого практического применения они так и не получили. Твердые питательные среды агар-агар, бактоагар, агар Дифко, агар микробиологический, агар пищевой (ГОСТ 16280–2002) обладают бесспорным преимуществом, так как их приготовление происходит значительно быстрее, а в застывшем виде они надежно фиксируют расположение черенка.

При приготовлении среды для лучшего растворения навеску агара предварительно замачивают в небольшом количестве дистиллированной воды. Обычно используют 6–7 г агара на 1 л раствора, так как дальнейшее увеличение концентрации уплотняет среду и затрудняет поступление питательных веществ в ткани. Еговливают, помешивая, в колбу или в кастрюлю с дистиллированной водой, подогретой до 50–70 °С, а затем нагревают для получения однородного коллоидного раствора. Помимо огнеупорных колб для приготовления питательной среды можно использовать эмалированные кастрюли. Сняв с огня, в емкость с агаром добавляют предварительно приготовленный раствор, содержащий минеральные соли, витамины, сахарозу, регуляторы роста и другие составляющие. Затем среду доводят до нужного объема, доливая воду.

На рост меристем и дальнейшее микрклональное размножение растений-регенерантов влияет кислотность среды, определяющая степень доступности для растений питательных веществ. Кислые или щелочные среды препятствуют поступлению некоторых элементов, например фосфора и железа, делая их относительно нерастворимыми, ограничивая тем самым рост растений. В то же время при высокой кислотности другие элементы переходят в растворенное состояние и становятся токсичными для эксплантов. Обязательным этапом перед разливом свежеприготовленной питательной среды по пробиркам является измерение pH. Оптимальна для культуры картофеля питательная среда с кислотностью pH 5,7–5,8. При отклонениях pH необходимо довести его до оптимума путем добавления 0,1 Н КОН или 0,1 Н HCl. Таким образом, кислотность питательной среды совпадает с кислотностью почвы, на которой произрастает картофель в естественных условиях.

Горячую среду разливают по стерильным пробиркам, закрывают ватно-марлевыми пробками и ставят в металлические штативы. В таком виде ее помещают в автоклав для стерилизации при температуре 120 °С и давлении 1 атм в течение 20–25 мин.

### Вычленение и культивирование меристем и эксплантов

Все работы проводятся в стерильных условиях микробиологического бокса или в ламинарных, которые находятся в специальном помещении с бактерицидными лампами. Меристему вычленяют из зеленых или этиолированных ростков клубней.

Сделать это из зеленых ростков технически проще, в них она хорошо различима и более устойчива к повреждению. Однако установлено, что эффективность оздоровления выше при использовании хрупких этиолированных ростков, так как концентрация вирусов в них ниже, а здоровая зона, свободная от вирусов, больше, чем в зеленых.

В НППЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству, согласно принятой схеме отбора только здоровых клонов, для перевода в культуру *in vitro* используют апикальный участок ростка, так называемый эксплант, состоящий из паренхимы, проводящей ткани и камбия, размеры которого колеблются от 1,5 до 3,0 мм. Такая работа значительно облегчает процесс вычленения и повышает приживаемость. Вычленение и культивирование эксплантов проводят так же, как и меристем.

Ростки, снятые с поверхности клубня, частично освобождают от покровных листочков, а оставшуюся часть подвергают стерилизации. Необходимое условие для этого – обеспечение достаточной степени чистоты объекта и сохранность его жизнеспособности. В качестве стерилизующих растворов используют спирт, растворы гипохлорита кальция, гипохлорита натрия в концентрациях 1–6%, раствор диацета 0,1% или раствора сулемы 0,1%. В НППЦ применяют 30%-й раствор «Белизна». Длительность стерилизации 3–4 мин, после чего проводят постстерилизацию, то есть тщательное отмывание ростка от стерилизующего раствора. Как правило, промывают 3–4 раза в автоклавируемой дистиллированной воде комнатной

температуры. Дезинфицированные ростки помещают на поверхность чашки Петри и под микроскопом, поочередно используя отдельные инструменты для удаления лишних покровных листочков, выделяют эксплант. Инструменты стерилизуют после каждой операции, погружая в спирт, с последующим обжигом. Отделенный эксплант на кончике ланцета переносят в пробирку с питательной средой, стараясь не углублять в среду, иначе подавляется его способность к росту. Очень важно аккуратно и точно провести вычленение и быстро поместить выделенный кусочек ткани на питательную среду, обеспечивая плотное прилегание среза. Пробирку закрывают ватно-марлевой пробкой над пламенем спиртовки и подписывают (указывают название сорта и порядковый номер, аналогичный номеру клона, который использовали для вычленения экспланта).

Штативы с пробирками переносят в культуральную комнату с постоянным световым и температурным режимом на специальные стеллажи, где проходит рост и развитие экспланта в микрорастение. Оптимальная температура для регенерации составляет 23–25 °С, влажность – не менее 70%, интенсивность света – 4 тыс. люкс, при 16-часовом фотопериоде.

Как правило, в течение месяца после посадки на питательную среду наблюдают увеличение размеров и интенсивное позеленение экспланта. Затем его рост может приостановиться вследствие изменения концентрации компонентов и pH среды, а также ее подсыхания. У основания проростка может образоваться каллусная ткань, лишенная проводящей системы, которая препятствует

дальнейшему развитию. Поэтому по мере роста регенеранты необходимо периодически пересаживать на свежие питательные среды, которые содержат все необходимые компоненты для стимуляции ризогенеза и роста стебля.

Время от посадки меристем или экспланта до регенерации растения с 5–6 листочками составляет 30–45 дней, но в зависимости от сорта некоторые меристемы или экспланты могут оставаться живыми и регенерировать в растения в течение 2–8 месяцев.

Полученное растение с 5–6 листочками черенкуют и черенки высаживают в пробирки на питательную среду для микрочеренкования. Исходный образец с несколькими листочками (от 4–5 до 7–8, в зависимости от морфотипа конкретного сорта) извлекают из пробирки и разрезают на чашке Петри на черенки, включающие часть стебля с одним листочком. Нижняя часть под листочком должна быть значительно длиннее верхней для лучшей фиксации. Черенок пинцетом погружают в пробирку на глубину междоузлия. Количество среды, достаточной для регенерации черенка в растение, должно быть в пределах 20% от общего объема пробирки. Растения из черенков, как и вычлененные экспланты, выращивают в специально оборудованных для этих целей помещениях (культуральных комнатах) с постоянным световым и влаготемпературным режимами. В случае, если необходимо размножить сорт в кратчайшие сроки, в пробирке оставляют базальную часть стебля с корневой системой для повторного отращивания. Отросток делит на 2–3 черенка, причем каждый должен содержать несколько

междоузлий для лучшей адаптации и роста на питательной среде. Такую практику рекомендуется применять в экстренных случаях, так как растение, выросшее повторно на остатках среды, будет ослабленным. После помещения черенков в пробирки со свежей питательной средой необходимого объема развитие и рост выравнивается. Метод ускоренного размножения с помощью микрочеренкования полностью исключает заражение и позволяет за короткий срок получить большие объемы, так как последующие деления можно проводить через каждые 3–4 недели.

Перевод в культуру ткани сортов картофеля и получение в процессе регенерации исходных материнских растений или линий – довольно трудоемкий процесс. Он сопровождается строгим контролем на наличие скрытой вирусной инфекции произведенного материала и служит

одной цели – созданию коллекций *in vitro* по каждому включенному в процесс сорту, которые необходимы для микроклонального производства.

Базисная коллекция картофеля (для семеноводства) находится в специальном помещении с постоянной температурой 18–20 °С, освещенностью 3000–4000 лк при 16-часовом световом фотопериоде. Сорта, не востребованные рынком, содержатся отдельно и используются для научных исследований.

Помимо новых линий, ежегодно появляются вновь созданные селекционерами института сорта. Они идут на дальнейшее микроклональное производство и популяризацию в республике, а также для отдела семеноводства НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству. Базисная коллекция состоит из 61 сорта и содержит 501 линию, с 2018 г. признана национальным достоянием Республики Беларусь. ■

#### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Амелиюшкина Т. А., Семешкина, П. С. Защита и карантин растений. – М., 2011. №3
2. Рогозина Е. В. Дикие клубненозные виды рода *Solanum* L. и перспективы их использования в селекции картофеля на устойчивость к патогенам: авторефер. дис. на соискание учёной степени д-ра биол. наук. – СПб., 2012.
3. Широков А. И. Основы биотехнологии растений: учеб.-метод. пособие / А. И. Широков, Л. А. Крюков. – Н. Новгород, 2012.
4. Radkovich E. V. Selection potato clones free of phytopatogens by Elisa and PCR methods for introduction to the culture in vitro // E. V. Radkovich, G. N. Guscha, I. V. Filonova, E. A. Gernak, A. I. Adamova // Bioresources and viruses. Abstracts. VII international conference. – Kyiv. 2013. P. 85.
5. Инструкция по выявлению вирусной и бактериальной инфекции в скрытой форме в картофеле методами иммуноферментного анализа, иммунофлуоресцентного анализа и полимеразной цепной реакции / Главная государственная инспекция по семеноводству, карантину и защите растений. – Минск, 2014.
6. Адамова А. И. Усовершенствование системы отбора исходного материала для сортообновления базисной коллекции сортов картофеля в условиях *in vitro* / А. И. Адамова, Е. В. Радкович, Г. Н. Гуца // Картофелеводство: сб. науч. тр. – Минск, 2011. Т. 19. С. 190–199.
7. Радкович Е. В. Применение разных схем отбора свободного от фитопатогенов родоначального материала картофеля / Е. В. Радкович, С. А. Турко, А. И. Адамова, Г. Н. Гуца // Земледелие и защита растений. 2013. №3. С. 64–67.
8. Бабинова А. В. Растение как объект биотехнологии / А. В. Бабинова, Т. Ю. Горпенченко, Ю. Н. Журавлев // Комаровские чтения. 2007. Вып. LV. С. 184–211.
9. Использование тканевых культур в теоретической и практической селекции картофеля / Б. Петт [и др.]; Академия сельскохозяйственных наук ГДР. – Берлин, 1986.
10. Безвирусное семеноводство картофеля (рекомендации) / Л. Н. Трофимец и [и др.]; сост. Л. Н. Трофимец. – М., 1990.
11. Коновалова Г. И. Оптимизация питательных сред для клонального микроразмножения картофеля в культуре *in vitro* // Актуальные проблемы защиты картофеля, плодовых и овощных культур от болезней, вредителей и сорняков: М-лы науч.-практ. конф. – Минск, 2005. С. 20–26.
12. Винклер Г. Н. Применение черенкования при выращивании безвирусных растений картофеля методом культуры меристемы / Г. Н. Винклер, Р. Г. Бутенко // Физиология растений: науч. тр. Т. 17, №4. – М., 1970. С. 851–853.