

УДК 635.21; 57.085.23

## СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ *IN VITRO* СОРТОВ И ГИБРИДОВ КАРТОФЕЛЯ КАК ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

С.В. Кушнарченко, Н.В. Ромаданова, М.М. Аралбаева, Г.Н. Матакова,  
М.О. Бекебаева, Д.И. Бабисекова

РГП «Институт биологии и биотехнологии растений», г. Алматы  
e-mail: svetlana\_bio@mail.ru

Оптимизированы режимы стерилизации растительного материала и состав питательных сред для введения в культуру *in vitro* и микроклонального размножения картофеля. Наибольший процент выживших в культуре *in vitro* апексов получен при их обработке в течение 10 мин одним из следующих дезинфицирующих растворов: 0,1% раствором сулемы (60,3%), хлорсодержащим реагентом «Доместос», разбавленным в соотношении 1:4 (50,4%), и раствором «Белизна» (1:1) (55,0%). Для введения в культуру *in vitro* апексов побегов картофеля оптимальна агаризованная безгормональная среда Мурасиге-Скуга (МС), для микроклонального размножения – жидкая среда МС без добавления фитогормонов, с 2 мг/л пантотенеата кальция. Создана коллекция асептических растений, состоящая из 20 отечественных и 4 зарубежных сортов и 6 гибридов картофеля, которая будет использована для криоконсервации образцов гермоплазмы в жидком азоте при -196°C.

**Ключевые слова:** картофель, коллекция *in vitro*, микроклональное размножение, криоконсервация гермоплазмы.

### Введение

В настоящее время генофонд картофеля в Республике Казахстан насчитывает 1450 образцов мировой коллекции из 32 стран мира и включает образцы диких и культурных видов картофеля, межвидовых гибридов, а также отечественных и зарубежных сортов. Основным держателем республиканского генофонда является Казахский научно-исследовательский институт картофелеводства и овощеводства Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан (КазНИИКО) [1]. Прироста коллекционных образцов удалось достигнуть в основном за последние 5-7 лет, преимущественно за счет поступления из зарубежных генбанков по линии международного обмена. К сожалению, многие стародавние сорта были безвозвратно утрачены по различным причинам, в основном из-за нехватки финансовых средств на ежегодный пересев большого количества образцов и их охрану в полевых условиях. Следует учесть, что поддержание живых коллекций, которые обычно размещают в поле, не только трудоемкий процесс, но и не очень надежный, так как не исключает потери образцов вследствие неблагоприятных условий среды, болезней, вредителей, нарушения агротехники и других факторов. Такие потери не только обедняют коллекцию исходного материала, но и сводят на нет многолетний труд селекционеров, вложенный в каждый входящий в нее сорт или перспективный гибрид.

В большинстве развитых странах мира криоконсервация широко используется для сохранения генетических ресурсов растений [2]. Особенно это касается культур, размножаемых исключительно вегетативным путем, для которых невозможно сохранить генетическую идентичность материала при размножении семенами. Во многих мировых генбанках значительный объем депонируемых генетических ресурсов составляют образцы гермоплазмы картофеля. Так, в генбанке Международного центра картофеля (International Potato Center), расположенного в Перу, содержится крупнейшая в мире коллекция картофеля, представляющая 80% мировых сортов и диких видов картофеля. Этот ценный материал поддерживается несколькими способами, в том числе и в криобанке, где апексы побегов депонируют в условиях глубокого замораживания при -196°C в растворах криопротекторов на неограниченно долгий срок [3]. Среди стран Евросоюза наиболее представительная коллекция образцов гермоплазмы картофеля находится в Германии в Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. Более 1000 образцов картофеля хранятся в условиях глубокого замораживания при -196°C [4-6]. В странах СНГ разработка методов криоконсервации растений, в том числе картофеля, активно проводится в России и Украине [7, 8]. В Казахстане исследования в области криоконсервации гермоплазмы растений впервые были начаты в 2002 году в Институте биологии и биотехнологии растений [9, 10].

Криоконсервация меристематических тканей в жидком азоте при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$  позволит не только надежно сохранить на длительное время генофонд картофеля, но, что не менее важно, получить при последующей регенерации освобожденные от фитопатогенов растения. Как было показано в публикациях последних лет, криотерапия является новым методом оздоровления растительного материала от вирусных, микоплазменных и бактериальных инфекций [11].

Разработка биотехнологии криоконсервации и создание криобанка гермоплазмы картофеля в Казахстане будут способствовать надежному сохранению сортового и видового разнообразия, повышению на этой основе эффективности селекционных работ, получению освобожденного от фитопатогенов суперэлитного посадочного материала, развитию семеноводства на безвирусной основе и международного обмена генетическими ресурсами.

Цель настоящей работы состояла в оптимизации режимов стерилизации растительного материала и состава питательных сред для введения в культуру *in vitro* образцов картофеля и создание коллекции асептических растений отечественных и зарубежных сортов и гибридов картофеля как исходного материала для криоконсервации.

## Материалы и методы

### *Растительный материал*

Материалом для исследования служили 20 сортов и 8 гибридов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) казахстанской селекции: сорта Аксор, Арал, Астана, Аул, Жанайсан, Жолбарыс, Жуалы, Максим, Нартау, Никитка, Нэрли, София, Союз, Тамыр, Танда, Текес, Тениз, Удовицкий, Улан, Шагалалы; гибриды: 2-97-7, 3-98-10, 4-04-22, 9-6, 9-99-12, 12-04-01, 18-04-01, 21-09-02; а также 4 сорта зарубежной селекции: России (Удача, Хозяюшка), Украины (Украинский), Германии (Антинема). Материал для исследования любезно предоставлен академиком АСХН РК, проф. Красавиным В.Ф. из коллекции КазНИИКО.

Из 20 казахстанских сортов, используемых в экспериментах, 9 сортов: Аксор, Астана, Аул, Нэрли, Орбита, Тамыр, Тениз, Улан, Шагалалы районированы в 7 областях Казахстана (Акмолинская, Актюбинская, Алматинская, Жамбыльская, Западно-Казахстанская, Кызылординская и Павлодарская области). В 2012 году в список допущенных к использованию по регионам Республики включены дополнительно 3 сорта картофеля (Жуалы, Текес, Максим). Шесть сортов находятся на Государственном сортоиспытании: Жолбарыс, Нартау, Никитка, София, Союз, Удовицкий [12].

### *Проращивание клубней картофеля*

Проращивание клубней и введение апексов картофеля в культуру *in vitro* осуществляли по методике, описанной в руководстве «Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology» [13], с небольшими модификациями. Клубни картофеля промывали в мыльном растворе, затем проточной водопроводной водой. Стерилизовали клубни в течение 10 мин в растворе «Белизны», разбавленном дистиллированной водой в соотношении 1:1 или 1:2. Сегменты клубней выдерживали в растворе гибберелловой кислоты (ГК) в концентрации 100 мг/л в течение 1 часа для ускорения прорастания, затем помещали в заранее простерилизованный влажный перлит и проращивали в светокультуральной комнате при температуре  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , освещенности 25  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 16-часовом фотопериоде.

### *Введение проростков клубней в культуру in vitro*

Для введения в культуру *in vitro* использовали проростки клубней длиной 1,5-2,0 см. Проводили сравнение эффективности следующих дезинфицирующих реагентов для поверхностной стерилизации проростков: сулема в концентрации 0,1% и растворы коммерческих хлорсодержащих реагентов: «Доместос» (5% гипохлорит натрия, неионогенные ПАВ) и «Белизна» (активный хлор 2,8%, гидроксид натрия 2,0%), разбавленных дистиллированной водой в соотношении 1:1; 1:2; 1:4 и 1:8. Для введения проростков в культуру *in vitro* в качестве основной применяли питательную среду Мурасиге-Скуга (МС) [14] с 30 г/л сахарозы, 4 г/л лагара, 1,75 г/л джелрайта, pH 5,7, и добавлением различных концентраций ГК: 0,25; 0,5; 1,0 мг/л, а также среду МС без регуляторов роста.

### *Проверка растений in vitro на наличие эндофитной микрофлоры*

Для проверки на эндофитную микрофлору растений, введенных в культуру *in vitro*, использовали специализированную питательную среду Viss [15]. При первом пассировании микропобегов на свежую среду, срезали базальные части побегов, помещали в чашки Петри на среду Viss и культивировали при температуре  $25^{\circ}\text{C}$  в течение 1-2 недель. В случае отсутствия эндофитной микрофлоры в эксплантах среда остается прозрачной, тогда как помутнение среды и рост колоний указывают на инфицированность микропобегов, которые следует сразу же отбраковывать. Дальнейшее микроклональное размножение проводили с проверенными асептическими растениями.

### *Микроклональное размножение картофеля in vitro*

Асептические растения клонировали на среде МС того же состава, что и для введения в культуру *in vitro*, с добавлением различных концентраций ГК (0; 0,25; 0,5; 1,0 мг/л). Растения культивировали в светокультуральной комнате при температуре  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , освещенности  $25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 16-часовом фотопериоде. Проводили сравнение эффективности микроклонального размножения побегов картофеля в зависимости от способа посадки микрочеренков на питательную среду (вертикальный, горизонтальный), а также от состава питательной среды.

Учитывали состояние и число образовавшихся побегов. Коэффициент размножения средний за 1 пассаж для каждого генотипа высчитывали по формуле:

$$K_p = a/b \cdot c, \quad (1)$$

- a – количество вновь образовавшихся побегов;
- b – количество побегов высаженных для размножения;
- c – количество пассажей.

Все эксперименты по микроклональному размножению в культуре *in vitro* проводили в 3-х повторностях. Статистический анализ проводили по общепринятым методикам [16].

## Результаты и обсуждение

### *Проращивание клубней картофеля и введение проростков в культуру in vitro*

Проведена оптимизация режимов стерилизации растительного материала для введения в культуру *in vitro* образцов картофеля. На первом этапе дезинфекции клубни промывали в мыльном растворе и проточной воде и стерилизовали в хлорсодержащем растворе «Белизна», разбавленном дистиллированной водой в соотношении 1:1 или 1:2. Было выявлено, что для дальнейшего проращивания сегментов клубней в стерильном перлите разбавление 1:1 оказалось более эффективным (80,0% образования клубневых ростков) по сравнению с концентрацией 1:2 (46,7% образования клубневых ростков). На 10-14 сутки проросшие клубневые ростки, достигшие длины 3-5 см, использовали для введения в культуру *in vitro*, для чего выделяли апексы клубневых ростков длиной 1,5-2 см и проводили второй этап дезинфекции уже в асептических условиях ламинар-бокса.

Было проведено сравнение эффективности поверхностной стерилизации клубневых ростков различными дезинфицирующими растворами: сулемой, «Доместос» и «Белизна» (таблица 1). Выявлена значительная зависимость процента выживания и регенерации апексов в культуре *in vitro* от образца (сорта, гибрида) и типа дезинфицирующего раствора. Так, апексы сорта Союз вводились в культуру *in vitro* с высокой эффективностью при обработке хлорсодержащими растворами «Доместос» и «Белизна». Процент введения апексов сорта Союз в этих вариантах обработки варьировал от 93,5 до 100%. Тогда как при стерилизации раствором сулемы процент введенных апексов был гораздо ниже – 47,5%.

У сорта Танда, наоборот, наилучшие результаты введения в культуру *in vitro* были получены при поверхностной стерилизации раствором сулемы и составили 100%. При дезинфекции растворами «Доместос» и «Белизна» процент введения апексов был ниже – от 30,0 до 88,9% (таблица 1).

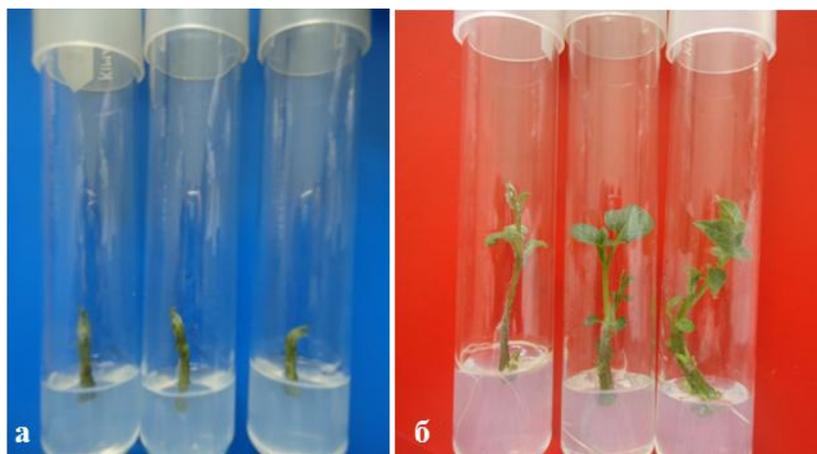
Результаты сравнения эффективности дезинфицирующих растворов показали, что несмотря на различия между сортами, коммерческие хлорсодержащие реагенты типа «Доместос» и «Белизна» могут быть использованы для поверхностной стерилизации апексов клубневых ростков картофеля при введении их в культуру *in vitro* и с успехом могут заменить более токсичные дезинфицирующие растворы, такие как сулема. Наибольший процент выживших апексов получен при их обработке 0,1% раствором сулемы в течение 10 мин, хлорсодержащим реагентом «Доместос», разбавленным в соотношении 1:4 в экспозиции 10 мин, а также раствором «Белизна» (1:1), в течение 10 мин (таблица 1).

Было проведено изучение влияния состава питательной среды на процент введения апексов клубневых ростков. В литературе для введения картофеля в культуру *in vitro* используют среду МС с добавлением 0,25 мг/л ГК [3] или среду без регуляторов роста [13, 17]. Нами были использованы 4 варианта питательной среды МС с добавлением различных концентраций ГК: 0,25; 0,5 и 1,0 мг/л, а также среда без гормонов. Эксперименты проводили на 6 сортах (Аксор, Текес, Тениз, София, Союз, Удовицкий) и 6 гибридах картофеля. В результате сравнительного анализа не было выявлено влияния концентрации ГК на процент регенерации апексов. Таким образом, для инициации культуры *in vitro* можно использовать среду без добавления фитогормонов. Введенные апексы быстро начинали развиваться на безгормональной среде МС (рисунок 1).

**Таблица 1 – Регенерация проростков клубней на среде МС без регуляторов роста после поверхностной обработки эксплантов различными дезинфицирующими растворами**

Дезинфицирующий раствор	Сорт картофеля	Число апексов, введенных в культуру <i>in vitro</i> , шт.	Процент регенерации, %	Средний процент, %*
Сулема, 0,1%, 10 мин	Арал	16	18,8	60,3±14,5 <sup>a</sup>
	Жолбарыс	52	82,7	
	Максим	58	46,6	
	Союз	61	47,5	
	Тамыр	21	57,1	
	Танда	14	100	
Белизна, 1:1, 5 мин	Арал	19	10,5	40,4±6,9 <sup>ab</sup>
	Максим	18	16,7	
	Союз	10	100	
	Тамыр	19	84,2	
	Танда	8	37,5	
Белизна, 1:1, 10 мин	Арал	11	9,1	55,0±8,5 <sup>a</sup>
	Союз	8	93,5	
	Тамыр	9	66,7	
	Танда	9	88,9	
Доместос, 1:2, 5 мин	Максим	29	6,9	34,5±9,2 <sup>b</sup>
	Никитка	8	50,0	
	Союз	10	100	
	Танда	8	50,0	
Доместос, 1:2, 10 мин	Арал	10	10,0	25,3±8,8 <sup>b</sup>
	Максим	19	10,5	
	Никитка	9	44,4	
	Танда	30	30,0	
Доместос, 1:4, 5 мин	Арал	12	33,3	34,0±6,9 <sup>b</sup>
	Максим	26	48,2	
	Никитка	9	22,2	
Доместос, 1:4, 10 мин	Арал	19	46,6	50,4±8,8 <sup>a</sup>
	Жолбарыс	43	53,5	
	Максим	35	31,0	
	Никитка	26	28,2	
	Тамыр	21	52,4	
	Танда	54	48,1	
Доместос, 1:8, 5 мин	Арал	18	55,6	45,6±15,3 <sup>ab</sup>
	Максим	19	21,1	
	Никитка	11	54,5	
	Союз	12	100	
Доместос, 1:8, 10 мин	Арал	17	52,9	42,3±11,4 <sup>ab</sup>
	Максим	14	28,6	
	Союз	14	100	

\* Различия между данными, обозначенными разными буквами, достоверны при  $p \leq 0,05$



а – апексы клубневых ростков картофеля сорта Союз на среде МС без гормонов;  
 б – побеги картофеля сорта Союз через 2 недели культивирования

Рис. 1. Введение в культуру *in vitro* апексов картофеля

### Тестирование растений *in vitro* на наличие эндофитной микрофлоры

Следующим необходимым этапом получения асептического материала в культуре *in vitro* является выявление эндофитной (скрытой) микрофлоры. Защита тканей растений *in vitro* от микробной контаминации, а также предотвращение инфицирования, является залогом успешного проведения микрোকлонального размножения [18]. Бактериальную инфекцию часто трудно выявить визуально из-за ее локализации внутри растительных тканей. При этом контаминированные растения не проявляют видимых симптомов заражения, лишь замедляется скорость их размножения, однако в дальнейшем такой инфицированный растительный материал будет непригоден для криоконсервации и создания криобанка гермоплазмы.

Выявляют эндофитную бактериальную инфекцию, помещая кусочки растительной ткани на специализированные питательные среды в чашки Петри. В наших экспериментах для этих целей была использована среда Viss [15]. Проверка чистоты введенного в культуру *in vitro* растительного материала картофеля показала, что в среднем во всех вариантах стерилизации 55,0% полученных побегов являются асептическими и будут использоваться для дальнейшего микрোকлонального размножения и криоконсервации.

В результате анализа проведенных экспериментов было установлено, что процент свободных от эндофитной микрофлоры растений зависит от конкретного образца (сорта, гибрида). Так, было выявлено, что у некоторых сортов (Астана, Аул, Жолбарыс, Тамыр) низкий процент контаминации тканей эндофитной микрофлорой и, соответственно, высокий выход асептических растений – 80,0-100% (таблица 2).

Тогда как в тканях других образцов картофеля (сорта Аксор, Арал, Максим) процент свободных от эндофитных бактерий растений не превышал 55% (таблица 2). Так, из-за высокой эндофитной контаминации два гибрида (4-04-22 и 2-97-7) были потеряны, и в результате не было получено асептических растений этих образцов в культуре *in vitro*.

Протестированные на скрытую бактериальную инфекцию и отобранные асептические растения картофеля были использованы в дальнейшем для микрোকлонального размножения.

Таблица 2 – Результаты тестирования растений картофеля *in vitro* на эндофитную микрофлору на среде Viss

Дезинфицирующий раствор	Сорт картофеля	Число проверенных растений <i>in vitro</i> , шт.	Процент асептических растений, %	Средний процент, %*
Сулема, 0,1%, 10 мин	Аксор	12	25,0	56,5±12,8 <sup>a</sup>
	Арал	16	0	
	Жолбарыс	43	100	
	Максим	55	52,7	
	Союз	29	82,8	
	Тениз	24	54,2	

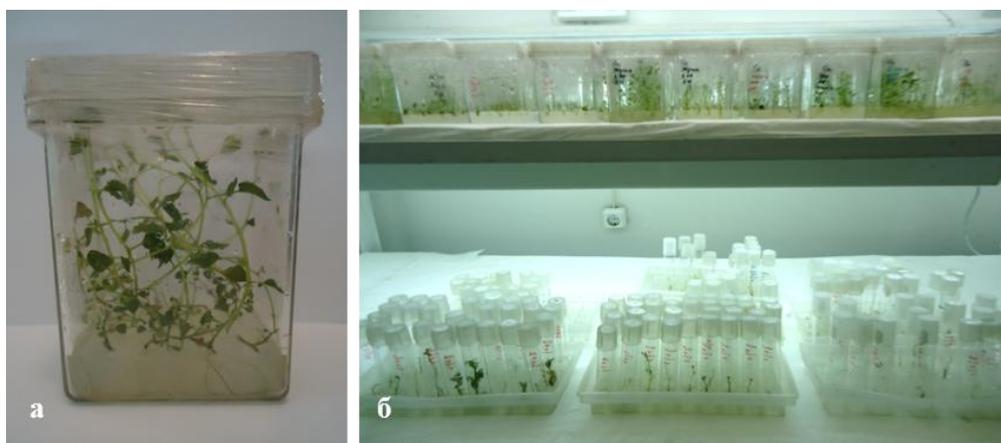
Доместос, 1:4, 10 мин	Арал	11	18,2	77,5±15,6 <sup>a</sup>
	Астана	10	100	
	Аул	19	100	
	Максим	10	30,0	
	Тамыр	10	80,0	
Белизна, 1:1, 10 мин	Арал	11	0	61,7±14,2 <sup>a</sup>
	Жолбарыс	13	100	
	Союз	29	44,8	
	Удача	20	75,0	
*Различия между данными, обозначенными одинаковыми буквами, недостоверны при $p \leq 0,05$				

### **Микрклональное размножение картофеля *in vitro***

В литературе для микрклонального размножения картофеля используется как питательная среда МС без гормонов [13], так и с добавлением различных регуляторов роста: 0,25 мг/л ГК [3]; 1 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК), 0,04 мг/л кинетина и 0,2 мг/л ГК [19]; 10 мг/л ГК, 1,0 мг/л бензиламинопурина (БАП), 1,0 мг/л ИУК [20].

Нами проведен подбор состава питательных сред для микрклонального размножения асептических растений картофеля. Введенные в культуру *in vitro* и проверенные на наличие эндофитной микрофлоры асептические растения размножали на 4 вариантах питательной среды МС с добавлением различных концентраций ГК: 0; 0,25; 0,5 и 1,0 мг/л. Лучшие результаты были получены на двух средах – с добавлением 0,25 мг/л ГК и на безгормональной среде МС. Поскольку на среде с ГК наблюдали истончение побегов *in vitro*, для дальнейшего микрклонального размножения картофеля была использована безгормональная среда МС (рисунок 2).

Кроме того, для повышения эффективности микрклонального размножения картофеля в литературе сообщалось об использовании горизонтальной посадки микрочеренков на питательную среду, что приводило к повышению коэффициента размножения [13]. Нами было проведено сравнение двух способов посадки побегов на питательную среду. Асептические побеги картофеля делили на два типа сегментов (микрочеренков): одноузловые и двуузловые; и помещали на питательную среду одним из способов: вертикально или горизонтально.



а – растения картофеля (сорт Арал) в мадженте на безгормональной среде МС;  
б – асептические растения в светокультуральной комнате (24±1°C, освещенность 25  $\mu\text{мол}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ , фотопериод 16/8 час)

**Рис. 2. Микрклональное размножение образцов картофеля *in vitro***

Выявлено, что вертикальный способ посадки для одноузловых сегментов не подходит из-за их небольшого размера, соответственно одноузловые сегменты располагали на питательной среде только горизонтально. У исследованных одноузловых сегментов картофеля, посаженных горизонтально, коэффициент размножения за 1 пассаж варьировал от 2,27 до 3,37, в зависимости от генотипа, (таблица 3), и в среднем по образцам составил 3,01 (рисунок 3).

У двуузловых сегментов при горизонтальном способе посадки коэффициент размножения варьировал от 2,77 до 4,53, и в среднем составлял 3,69. При вертикальном способе посадки – от 4,57 до 5,0, в среднем – 4,78.

Таким образом, в результате анализа проведенных экспериментов установлено, что для дальнейшего микроклонального размножения эффективно использовать вертикальную посадку двуузловых сегментов картофеля на питательную среду.

Таблица 3 – Коэффициент размножения различных образцов картофеля *in vitro* в зависимости от способа посадки микрочеренков на питательную среду

Способ посадки микрочеренков	Наименование сорта/гибрида				
	Союз	Удовицкий	12-04-1	3-98-10	18-04-01
Вертикальный (двуузловые микрочеренки)	4,57±0,58 <sup>ab</sup>	5,0±0,11 <sup>ab</sup>	4,73±0,16 <sup>ab</sup>	4,90±0,07 <sup>a</sup>	4,73±0,16 <sup>ab</sup>
Горизонтальный (одноузловые микрочеренки)	3,00±0,40 <sup>b</sup>	3,20±0,20 <sup>b</sup>	3,23±0,22 <sup>b</sup>	3,37±0,11 <sup>b</sup>	2,27±0,64 <sup>b</sup>
Горизонтальный (двуузловые микрочеренки)	2,98±0,48 <sup>b</sup>	4,27±0,38 <sup>ab</sup>	4,13±0,29 <sup>ab</sup>	4,53±0,11 <sup>b</sup>	2,77±0,22 <sup>b</sup>

Примечание – Различия между данными, обозначенными разными буквами, достоверны при  $p \leq 0,05$

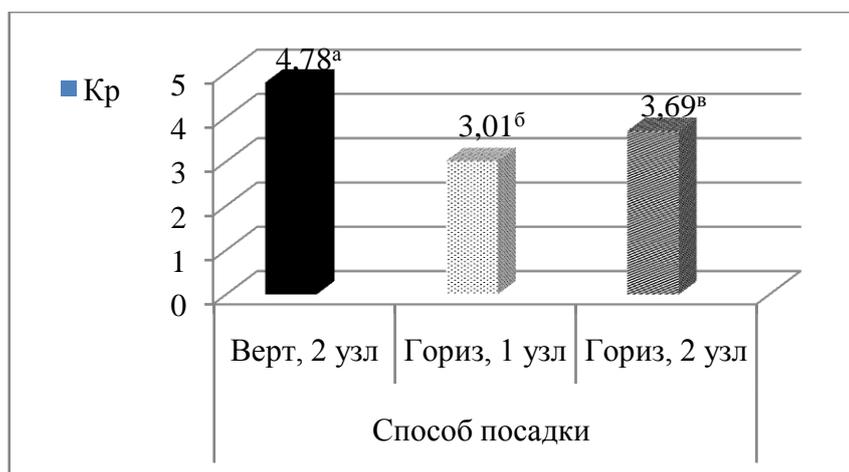


Рис. 3. Среднее значение Кр (по 5 образцам картофеля) в зависимости от способа посадки микрочеренков на питательную среду

Согласно литературным данным, повышения коэффициента размножения картофеля можно достичь, используя для клонирования жидкую питательную среду с добавлением пантотената кальция (витамин В<sub>5</sub>) в концентрации 2 мг/л [3]. В связи с этим проведены эксперименты для сравнения эффективности микроклонального размножения на жидкой и агаризованной средах, а также для определения влияния пантотената кальция на коэффициент размножения картофеля *in vitro*. Эксперименты были проведены на шести сортах и трех гибридах картофеля, в таблице 4 приведены данные по четырем образцам.

В результате был выявлен положительный эффект пантотената кальция, а также клонирования растений на жидкой питательной среде. Было установлено, что коэффициент размножения увеличивался в среднем с 4,86 до 7,31 при культивировании асептических побегов картофеля на жидкой среде МС с добавлением 2 мг/л пантотената кальция (витамина В<sub>5</sub>) (таблица 4).

Таблица 4 – Коэффициент размножения сортов картофеля в культуре *in vitro* в зависимости от состава питательной среды

Вариант среды	Арал	Удовицкий	Танда	12-04-01
Среда МС агаризованная, без гормонов	4,77±0,11 <sup>a</sup>	4,86±0,29 <sup>a</sup>	4,60±0,27 <sup>a</sup>	5,20±0,20 <sup>a</sup>

Среда МС жидкая, без гормонов	6,77±0,58 <sup>б</sup>	5,4±0,3 <sup>аб</sup>	6,20±1,00 <sup>аб</sup>	6,50±0,60 <sup>аб</sup>
Среда МС агаризованная, без гормонов, с 2 мг/л пантотената кальция	5,57±1,49 <sup>аб</sup>	6,8±0,27 <sup>б</sup>	5,60±0,13 <sup>б</sup>	5,75±0,15 <sup>аб</sup>
Среда МС жидкая, без гормонов, с 2 мг/л пантотената кальция	7,65±0,45 <sup>об</sup>	6,35±0,45 <sup>б</sup>	6,43±0,69 <sup>б</sup>	8,80±0,70 <sup>б</sup>
Примечание – различия между данными, обозначенными разными буквами, достоверны при $p \leq 0,05$				

Положительное действие пантотената кальция на эффективность микроклонального размножения можно объяснить его важной ролью в клеточном метаболизме. Как известно, пантотеновая кислота по химической природе является дипептидом и состоит из остатков аминокислоты β-аланина и пантоевой кислоты. Пантотеновая кислота входит в состав кофермента А, принимающего участие в важнейших реакциях обмена веществ в клетках растений. Кроме того, при клонировании растений в жидкой среде улучшается доступность питательных веществ, что благотворно действует на рост и развитие растений. Было отмечено, что побеги сортов картофеля на жидкой среде с добавлением пантотената кальция характеризуются более мощными стеблями и крупными листьями.

Таким образом, в результате оптимизации состава питательной среды подобрана среда для эффективного микроклонального размножения образцов картофеля *in vitro*: жидкая среда МС без гормонов, с добавлением 2 мг/л пантотената кальция. Кроме этого, в среду МС в стандартных концентрациях добавляли сахарозу (30 г/л), глицин, инозит и витамины: В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub> и никотиновую кислоту. Коэффициент размножения асептических растений картофеля на этой среде варьировал от 6,35 до 8,80 и в среднем составлял 7,31.

В результате проведенной работы в Институте биологии и биотехнологии растений создана коллекция асептических растений картофеля *in vitro*, состоящая из 30 образцов, в том числе 20 казахстанских сортов, 6 гибридов и 4 зарубежных сортов.

Полученные в результате проделанной работы и поддерживаемые в культуре *in vitro* асептические растения в дальнейшем будут использоваться для экспериментов по криоконсервации и создания криобанка в жидком азоте при температуре -196°C.

## Выводы

Проведена оптимизация режимов стерилизации растительного материала для получения асептических растений картофеля *in vitro*. Наиболее эффективна поверхностная дезинфекция клубневых ростков в течение 10 мин одним из следующих реагентов: 0,1% раствором сулемы, хлорсодержащим реагентом «Белизна», разбавленным в соотношении 1:1, а также раствором «Доместос» (1:4). При этом, соответственно, 60,3, 55,0 и 50,4% апексов жизнеспособны и начинают развитие в культуре *in vitro*.

Для введения апексов клубневых ростков картофеля в культуру *in vitro* оптимальна среда МС без добавления фитогормонов.

Необходимым этапом получения асептических растений *in vitro* является выявление эндофитной микрофлоры и отбраковка контаминированного материала. Проверка введенного в культуру *in vitro* растительного материала картофеля на специализированной среде Viss показала, что в среднем во всех вариантах стерилизации 55,0% полученных побегов являются асептическими и могут быть использованы для последующего микроклонального размножения и криоконсервации.

Оптимизированы условия микроклонального размножения растений картофеля *in vitro*. Наиболее высокий коэффициент размножения (7,31) в среднем для исследуемых сортов и гибридов картофеля был получен на жидкой безгормональной среде МС с добавлением 2 мг/л пантотената кальция при вертикальной посадке двуузловых сегментов.

Создана коллекция асептических растений картофеля *in vitro*, состоящая из 30 образцов, в том числе 20 казахстанских сортов, 6 гибридов и 4 зарубежных сорта, которая будет использована для создания криобанка в жидком азоте при температуре -196°C.

Работа выполнена в рамках проекта 0047/ГФ «Создание криогенного банка гермоплазмы картофеля для надежного сохранения и эффективного использования генетических ресурсов в семеноводстве и селекционной практике Казахстана» по бюджетной программе: 055 «Научная

и/или научно-техническая деятельность», подпрограмма 101 «Грантовое финансирование научных исследований».

### Литература

1. Красавин В.Ф., Мошняков А.Н., Шарипова Д.С., Удовичкий А.С., Федосеев В.А., Красавина В.К., Лигай Г.Л., Кулибаба В.С., Кулибаба В.А. Каталог генофонда картофеля Республики Казахстан (сорта картофеля казахстанской селекции). – Кайнар, 2011. – 54 с.
2. Plant Cryopreservation. A Practical Guide / Reed B.M. (Ed.). – Springer Science+ Business Media, LLC, 2008. – 513 p.
3. Espinoza N., Estrada R., Tovar P., Bryan J., Dodds J.H. Tissue culture micropropagation, conservation, and export of potato germplasm. Specialized Technology Document I. International Potato Center, Lima, Peru, 1986. – 20 p.
4. Mix-Wagner G., Schumacher H.M., Cross R.J. Recovery of potato apices after several years of storage in liquid nitrogen // *CryoLetters*. – 2003. – Vol. 24, №1. – P. 33-41.
5. Kryszyk A., Keller J., Grübe M., Zimnoch-Guzowska E. Cryopreservation of potato (*Solanum tuberosum* L.) shoot tips using vitrification and droplet method // *J. Food Agricult. Environm.* – 2006. – Vol. 4. – P. 196-200.
6. Keller E.R.J., Senula A., Leunufna S., Grübe M. Slow growth storage and cryopreservation – tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections // *Int. J. Refrig.* – 2006. – Vol. 29. – P. 411-417.
7. Швачко Н.А., Гавриленко Т.А. Криоконсервация образцов культурных видов картофеля из коллекции ВИР // Идеи Н.И. Вавилова в современном мире: тез. докл. III-ей Вавиловской межд. конф. – СПб, 2012. – С. 228.
8. Стрибуль Т.Ф., Шевченко Н.А., Розанов Л.Ф. Изучение влияния холодового закаливания картофеля на сохранность меристем, криоконсервированных медленным замораживанием // *Проблемы криобиологии*. – 2006. – Т. 16, №1. – С. 60-65.
9. Ромаданова Н.В., Кушнаренко С.В. Влияние холодной обработки побегов *in vitro* на криосохранение апикальных меристем яблони // *Биотехнология. Теория и практика*. – 2007. – №3. – С. 39-44.
10. Kushnarenko S., Salnikov E., Nurtazin M., Mukhitdinova Z., Rakhimbaev I., Reed B. M. Characterization and Cryopreservation of *Malus sieversii* Seeds // *The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*. – 2010. – Vol. 4 (Special Issue 1). – P. 5-9.
11. Wang Q., Valkonen J.P.T. Cryotherapy of the shoot tips: novel pathogen eradication method // *Trends in Plant Science*. – 2008. – Vol. 14, №3. – P. 119-122.
12. Айтбаев Т.Е. Достижения и перспективы селекции картофеля, овощных и бахчевых культур в Казахстане // *Состояние и перспективы развития семеноводства сельскохозяйственных культур в Казахстане: матер. междунар. совещания*. – Алматы, 2012. – С. 115-123.
13. Kane M. Micropropagation of potato by node culture and microtuber production // In: *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*. Eds. R.N. Trigiano and D.J. Gray. CRC Press. Taylor & Francis Group. – USA. – 2011. – P. 207-212.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol Plant*. – 1962. – Vol. 15. – P. 473-479.
15. Viss P.R., Brooks E.M., Driver J.A. A simplified method for the control of bacterial contamination in woody plant tissue culture // *In Vitro Cell. Dev. Biol.* – 1991. – Vol. 27. – P. 42.
16. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учебное пособие для биол. спец. вузов / 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во Высш. школа, 1990. – 352 с.
17. Zobayed S.M.A., Armstrong J., Armstrong W. Micropropagation of potato: evaluation of closed, diffusive and forced ventilation on growth and tuberization // *Annals of Botany*. – 2001. – Vol. 87. – P. 53-59.
18. Cassels A.C. Detection and elimination of microbial endophytes and prevention of contamination in plant tissue culture // In: *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*. Eds. R.N. Trigiano and D.J. Gray. CRC Press. Taylor & Francis Group. – USA. – 2011. – P. 223-238.
19. Токбергенова Ж.А. Индуцирование клубнеобразования сортов картофеля в культуре *in vitro* // *Вестник Павлодарского Государственного Университета. Серия химико-биологическая*. – 2010. – №1. – С. 101-106.
20. Roest S., Bokelmann G.S. *In vitro* adventitious bud techniques for vegetative propagation and mutation breeding of potato (*Solanum tuberosum* L.). 1. Vegetative propagation *in vitro* through adventitious shoot formation // *Potato Research*. – 1980. – Vol. 23. – P. 167-181.

Картопты *in vitro* жағдайына енгізуге және микроклонды көбейтуге қоректік орталардың құрамы мен өсімдік материалын стерилизациялау режимдері оңтайландырылды. 10 мин аралығында төменде көрсетілген дезинфицирлеуші ерітінділермен өндегенде апекстер аса жоғары өміршендік пайызын көрсетті: 0,1% сулема ерітіндісі (60,3%), 1:4 қатынасында құрамында хлор бар сұйылтылған «Доместос» реагенті (50,4%), және (1:1) қатынасындағы «Белизна» ерітіндісі (55,0%). Өркендердің апексін *in vitro* жағдайына енгізу үшін гормонсыз агарлы Мурасиге-Скуг ортасы және картопты микроклонды көбейту үшін 2 мг/л кальций пантотенеаты қосылған сұйық гормонсыз Мурасиге-Скуг ортасы ең қолайлы болды. -196°C сұйық азотта гермоплазманың үлгілерін кроконсервациялау үшін құрамында картоптың 20 отандық, 4 шет ел сорттары мен 6 будан үлгілерінен тұратын асептикалық өсімдіктердің коллекциясы жасалынды.

**Кілтті сөздер:** картоп, *in vitro* коллекциясы, микроклонды көбейту, гермоплазманы криоконсервациялау

### Summary

At present time the potato germplasm collection in Kazakhstan consists of 1450 accessions including wild potato species, interspecific hybrids and Kazakhstan's and foreign varieties. This valuable material is being held in Kazakh Research Institute of Potato and Vegetable Cultures in field genebanks, located 950 and 2,186 meters above sea level, where potato varieties are propagated annually by tubers. In world practice cryopreservation of shoot tips is used for long-term conservation of vegetatively propagated crops including potato. Cryopreservation of meristematic cells at -196°C will allow not only to safely conserving the potato germplasm for a long period of time but it will allow obtain pathogen-free plants following LN exposure. For this purpose the initiation of *in vitro* potato shoot culture has been started.

In this article the regimes of surface disinfection of plant material and media composition for *in vitro* shoot culture initiation and micropropagation of potato were optimized. For *in vitro* shoot culture initiation potato tubers were cut into several parts 2 x 2 cm size and were soaked for 1 h in 0,01% gibberellic acid (GA<sub>3</sub>). The tuber sections were placed on moist perlite for 10-14 days, then sprouted shoots 3-5 cm long were surface disinfected by various sterilizing solutions, rinsed in sterile distilled water and transfer into MS medium with 0,25, 0,5 or 1,0 mg/l GA<sub>3</sub> or hormone-free medium. The most effective solutions for surface disinfection of sprouted shoots were 0,1% HgCl<sub>2</sub>, commercial reagents "Domestos" diluted 1:4, and "Belizna" (1:1) (all for 10 min) that resulted in 60,3%, 50,4% and 55,0% recovery, accordingly. Hormone-free MS medium was optimal for *in vitro* shoot culture initiation and liquid hormone-free MS medium with 2 mg/l calcium pantothenate – for micropropagation. The collection of aseptic plantlets consists of 20 Kazakhstan's and 4 foreign varieties and 6 hybrids of potato will be used for cryopreservation of shoot tips in liquid nitrogen at -196°C.

**Keywords:** potato, *in vitro* collection, micropropagation, germplasm cryopreservation.