

УДК 578.42; 631.531; 578.083.2

Мильви АГУР, Вийве РОЗЕНБЕРГ

МЕТОД ВЫРАЩИВАНИЯ СЕЯНЦЕВ КАРТОФЕЛЯ НА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ

В исследованиях интенсивности и характера трансмиссии вирусов в генеративное потомство важнейшей проблемой является выращивание максимального количества сеянцев из взятых для анализа семян. При изучении передачи через семена 22 видов сорных и декоративных растений X-, N-вирусов картофеля, аспермии томата и огуречной мозаики, а также влияния их инфекции на кондиционные свойства семян было выяснено, что семена зараженных вирусом растений менее жизнеспособны, чем семена здоровых растений того же вида, и рост опытных сеянцев в большинстве случаев ниже контрольных (Агур, Виллемсон, 1980; Виллемсон, Агур, 1985). Это указывает на то, что семена зараженных растений в большей или меньшей степени недоразвиты. Из этого можно предполагать, что именно зараженные вирусом семена дают нежизнеспособные проростки, которые не выходят на поверхность земли (Агур, 1981). Получение максимального числа сеянцев особенно важно в исследованиях систем вирус—растение, при которых прослеживается низкий уровень передачи вируса или этот процесс протекает не классически, как это отмечено у картофеля (Нурмисте, 1974; Нурмисте и др., 1983), а также у вида *Nicotiana tabacum* L. (Агур и др., 1985).

Накопленный в Институте экспериментальной биологии АН ЭССР опыт многолетнего выращивания сеянцев картофеля в горшках с торфяно-перегнойной смесью из предварительно проросших на фильтровальной бумаге семян показал, что число погибших или неполноценных сеянцев относительно высокое — 20—50%. Это отражается и на результатах исследований. Чтобы найти выход из создавшегося положения, были проведены опыты по проращиванию семян и выращиванию из них растений—микресеянцев на разных питательных средах, используемых при оздоровлении картофеля методом верхушечной меристемы (Розенберг, 1984).

Культура изолированных зародышей и незрелых семян на искусственной среде с успехом применялась в селекции в целях преодоления перекрестной несовместимости при отдаленной гибридизации (Здруйковская-Рихтер, 1985). Данные об использовании этого метода в вирусологических исследованиях отсутствуют.

Материал и методика

Активность прорастания семян картофеля сортов 'Олев', 'Сулев', 'Йыгева коллане', 'Стиня' и 'Белая ночь' определяли, проращивая их в чашках Петри (по 100 семян в двух повторностях) на влажной фильтровальной бумаге в условиях комнатной температуры. Для обеспечения стабильной влажности чашки Петри помещали в полиэтиленовые

мешки. Число проросших и непроросших семян подсчитывали на 7-й и 14-й день после посева и определяли процент проросших семян. Сеянцы в фазе двух листьев высаживали в горшки с торфяно-перегнойной смесью.

Для сравнения эффективности используемых для выращивания сеянцев субстратов сеянцы сорта 'Стиня' в стадии двух листьев пикировали в заполненные песком, торфом или торфяно-перегнойной смесью, покрытой слоем (около 3 см) песка или торфа, ящики (по 50 растений в каждом).

Опыты посева семян 'Стиня' в пробирки на разные питательные среды проводили в лаборатории оздоровления и биотехнологии сельскохозяйственных культур Эстонского НИИ земледелия и мелиорации. Перед посевом семена обрабатывали следующими дезинфицирующими растворами: 96% спиртом, 0,1% раствором AgNO_3 и 0,1% раствором HgCl_2 . Семена, помещенные в капроновые мешки, омывали в течение 2 с в спирте и в течение 10 мин в 0,1% растворе AgNO_3 или HgCl_2 , затем трижды в дистиллированной воде и оставляли сохнуть в чашках Петри. Промывание дистиллированной водой, сушку и посев семян в пробирки с питательными средами проводили в специальном стерилизованном боксе, построенном для вычленения меристемы и микрочеренкования пробирочных растений. До проведения работы бокс стерилизовали ультрафиолетовой лампой (типа «Магн») в течение 30 мин. Во время работы бокс профильтровывали бактерицидным фильтром, при этом давление воздуха в боксе было на 0,1 атм. выше, чем снаружи, что препятствовало проникновению микробов вовнутрь.

Обработанные дезинфицирующими растворами семена высевали в пробирки по одному на питательную среду (3 мл), простерилизованную в автоклаве (при 0,8 атм. в течение 30 мин).

Использовали четыре варианта питательной среды с 20 общими компонентами (мг/л): NH_4NO_3 — 1800; KNO_3 — 2000; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 440; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 370; KH_2PO_4 — 170; Fe-хелат — 6 мл; H_2BO_3 — 6,2; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 22,3; $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 8,5; KJ — 0,83; Na_2MoO_4 — 0,25; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,025; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,025; NiCl_2 — 0,03; тиамин — 1,0; пиридоксин — 0,5; никотиновая кислота — 0,5; аскорбиновая кислота — 1,0; гиббереллиновая кислота — 0,1; агар-агар (Институт химии АН ЭССР) — 2500.

Дополнительные компоненты (мг/л):

питательная среда № 1: гидролизат казеина — 200, аденин — 1,0, кинетин — 1,0, сахароза — 30 000;

питательная среда № 2: AlCl_3 — 0,03, феруловая кислота — 2,0, сахароза — 10 000;

питательная среда № 3: гидролизат казеина — 200, аденин — 1,0, кинетин — 0,5, сахароза — 30 000;

питательная среда № 4: гидролизат казеина — 200, аденин — 1,0, бензиламинопуридин (БАП) — 0,5, сахароза — 30 000.

Эти питательные среды разработаны в Эстонском НИИЗиМ В. Розенберг (авторское свидетельство № 1025373), при этом среды №№ 1, 3 и 4 предназначены для регенерации растений из меристемы и № 2 для микрочеренкового размножения пробирочных растений многих культурных видов.

Пробирки с семенами помещали в специальную камеру с суточным режимом: на свету 16 ч ~ 1500 лк при температуре 20—25 °С, в темноте (8 ч) при 21—23 °, влажность воздуха 85—95%. После прорастания семян пробирки переставляли в камеру с суточным режимом: освещение 16 ч ~ 2500 лк при температуре 23—27 °, в период темноты (8 ч) — 18—22 °, влажность воздуха 65—80%.

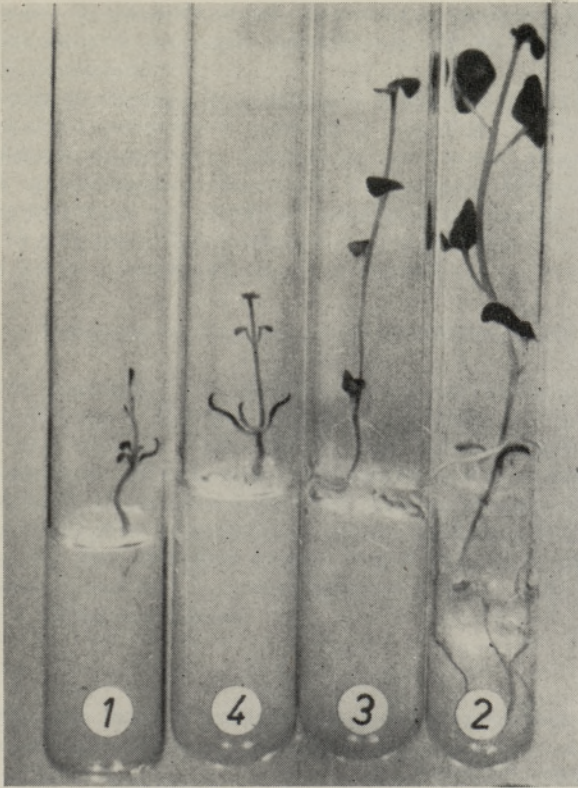


Рис. 1. Одномесячные сеянцы картофеля 'Стина' в пробирках на четырех питательных средах.

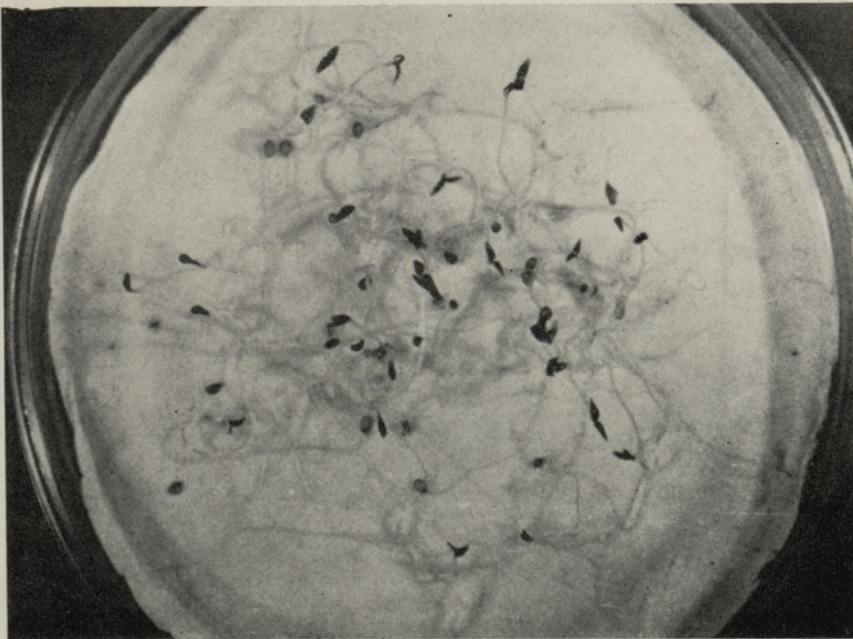


Рис. 2. Одномесячные сеянцы картофеля 'Стина' в чашках Петри.

Через месяц у микросеянцев измеряли высоту и подсчитывали число образовавшихся листьев; определяли те же показатели в среднем на одном растении.

Микросеянцы по одному высаживали в горшки с торфяным субстратом или торфяно-перегнойной смесью в теплице. Растения, выращенные на торфяном субстрате, удобряли по схеме, разработанной для выращивания меристемных растений картофеля (Розенберг, 1984), а растения, выращенные на торфяно-перегнойной смеси, дополнительно не удобряли. Удобрения были внесены (с расчетом 3 кг полного удобрения «Б» на 0,9 м³ субстрата) перед посадкой.

Результаты исследования и обсуждение

Данные опытов показали, что активность прорастания семян картофеля сортов 'Олев', 'Сулев', 'Йыгева коллане', 'Стина' и 'Белая ночь' была относительно высокой — 74,6—100%. При выращивании из них сеянцев на торфяно-перегнойной смеси выяснилось, что количество сеянцев, достигших фазы бутонизации/цветения или развившихся до полноценного растения, осталось значительно ниже, особенно у сортов 'Сулев' и 'Стина' (табл. 1). Это говорит о том, что в горшках на торфяно-перегнойной смеси в условиях теплицы сеянцы в фазе двух листьев укоренились слабо и часто погибали.

Таблица 1

Активность прорастания семян и выживаемость сеянцев на торфяно-перегнойной смеси

Сорт картофеля	Активность прорастания, %		Выросшие сеянцы, %			
			от общего числа семян		от проросших семян	
	1982 г.	1983 г.	1982 г.	1983 г.	1982 г.	1983 г.
'Олев'	100,0	86,6	81,6	80,0	75,3	82,6
'Сулев'	84,0	86,0	60,0	51,0	61,1	53,7
'Йыгева коллане'	90,0	99,2	90,0	86,0	98,3	89,1
'Стина' 1*	95,0	88,0	69,0	60,0	71,3	63,4
'Стина' 2	88,0	86,0	63,0	74,0	71,6	76,0
'Стина' 3	86,0	84,0	42,0	47,0	53,1	48,5
'Белая ночь' 1*	92,0	88,0	80,0	80,0	86,9	82,3
'Белая ночь' 2	93,3	74,6	78,3	71,0	81,9	74,1
'Белая ночь' 3	97,1	92,6	77,1	84,3	79,1	87,4

* у сортов 'Стина' и 'Белая ночь' семена были собраны с нескольких растений, номера которых отмечены в таблице.

При сравнении разных субстратов для выращивания сеянцев (песок, торф или торфяно-перегнойная смесь, посыпанная торфом или песком) выяснилось, что пикировка сеянцев сорта 'Стина' в ящики на названные субстраты в некоторой мере благоприятствовала развитию сеянцев по сравнению с выращиванием их в горшках только на торфяно-перегнойной смеси, однако желательного эффекта все-таки не давала, так как выпадение сеянцев при выращивании их на песке достигало в среднем 10, на торфяной почве 6 и в ящиках с торфяно-перегнойной смесью, посыпанной песком или торфом — 7 и 4% соответственно. Последний вариант дал самые надежные результаты, что можно объяснить тем, что корни растений после укоренения в торфе легче переживали переход в торфяно-перегнойную смесь. Однако и такой уровень выхода сеянцев при изучении трансмиссии вирусов через семена не является удовлетворительным.

С целью преодоления трудностей, возникающих при выращивании сеянцев из семян картофеля в горшках на разных субстратах, были поставлены опыты проращивания семян картофеля и выращивания из них микросеянцев в пробирках на питательной среде в стерильных условиях. В опыты были включены четыре питательные среды, используемые как для регенерации микрорастений из апикальной меристемы (среды №№ 1, 3, 4), так и для размножения их микрокλωνированием (среда № 2) при оздоровлении картофеля и других видов культурных растений методом верхушечной меристемы (Розенберг, 1984).

Активность прорастания семян картофеля 'Стиня', в пробирках на всех испытанных питательных средах была высокая, непроросшими остались лишь единичные семена, но в развитии сеянцев (высота растений, число образовавшихся листьев) были отмечены различия (табл. 2, рис. 1). Наиболее благоприятной для развития сеянцев оказалась питательная среда № 2, используемая для микроклонального размножения пробирочных растений. На этой среде одномесячные сеянцы достигли высоты в среднем 5—6 см, у них образовалось в среднем по 6 листьев, превосходя по названным показателям сеянцы, выращенные на питательных средах № 3 и 4, а особенно № 1 (табл. 2). Питательная среда № 2 содержала меньше сахаразы и не содержала стимулирующих рост веществ (кинетин, БАП) и гидролизат казеина. Это значит, что проростки и микросеянцы не нуждаются в стимулирующих рост веществах, так как само семя является первоначальной питательной базой, достаточной для развития проростка. Наоборот, присутствие этих веществ даже тормозит этот процесс.

Таблица 2

Прорастание обработанных дезинфицирующими растворами семян и развитие сеянцев картофеля 'Стиня' в пробирках с разными питательными средами

Вариант питательной среды	Число семян в варианте опыта	Число проросших семян		Среднее число листьев на одном сеянце		Средняя высота сеянцев, см	
		0,1% AgNO ₃	0,1% HgCl ₂	0,1% AgNO ₃	0,1% HgCl ₂	0,1% AgNO ₃	0,1% HgCl ₂
№ 1	15	14	13	2,4	3,3	1,7	1,7
№ 2	46	46	46	6,4	5,6	6,3	6,0
№ 3	25	24	24	5,1	4,4	3,7	3,7
№ 4	25	24	25	5,0	4,0	2,0	1,8

Разницы в активности прорастания семян и развитии из них микросеянцев в пробирках при обработке семян разными дезинфицирующими растворами (0,1% AgNO₃, 0,1% HgCl₂) практически не было отмечено.

Активность прорастания семян картофеля 'Стиня', обработанных теми же дезинфицирующими растворами, а также их комбинациями, на фильтровальной бумаге осталась более низкой, чем в пробирках на питательных средах и не превосходила 84,6% (у контрольных, необработанных семян). Одномесячные сеянцы в чашках Петри развивались не более фазы двух первых листков (табл. 3, рис. 2).

Сеянцы картофеля сорта 'Стиня', выращенные в пробирках на питательной среде № 2 в течение одного месяца, высаживали в горшки на торфяной субстрат или торфяно-перегнойную смесь. Из всех 46 сеянцев, высаженных на торфяной субстрат, развились нормальные растения, которые через два месяца достигли фазы цветения. Из 46 сеянцев, высаженных на торфяно-перегнойную смесь, пять погибли. И так,

Активность прорастания семян картофеля 'Стинга' при обработке их некоторыми дезинфицирующими веществами и развитие сеянцев в чашках Петри

Вариант обработки семян	Проросшие семена, %		Число листьев на одном сеянце	
	10-й день	20-й день	10-й день	20-й день
96% спирт	6,0	74,0	0	2
96% спирт+0,1% HgCl ₂	1,6	79,3	0	2
96% спирт+0,1% AgNO ₃	1,8	81,7	0	2
0,1% HgCl ₂	0	78,5	0	2
0,1% AgNO ₃	0	80,4	0	2
Контроль (необработанные)	40,0	84,6	0	2

выживаемость сеянцев при посадке их в горшки в фазе 5—6 листьев была значительно выше, чем при посадке в фазе двух листьев (особенно при выращивании их на торфяном субстрате), что можно считать удовлетворительной для исследования трансмиссии вирусов через семена.

Исходя из результатов проведенных опытов можно заключить, что проращивание семян и выращивание из них микросеянцев в стерильных условиях в пробирках на определенной питательной среде по сравнению с ранее использованным методом выращивания их на разных субстратах в горшках позволяет значительно повысить выживаемость сеянцев картофеля. При использовании этого метода открываются новые возможности для изучения трансмиссии вирусов в сеянцы. Во-первых, предложенный метод дает возможность выращивать из одного семени неограниченное число сеянцев, так как полученные пробирочные микросеянцы, как и меристемные микрорастения, можно легко размножать методом микрочеренкования (Розенберг, 1984). Этим обеспечивается проведение опытов в нескольких повторностях. Кроме того, вышеописанный метод позволяет анализировать, например, при помощи иммуноферментного анализа (ELISA-тест) сеянцы, выращенные в пробирках, т. е. в полностью изолированных от внешней среды условиях, чем исключается возможность загрязнения их извне.

Вышеназванные обстоятельства дают основание предполагать, что предложенный метод создаст условия для проведения более четких исследований интенсивности и характера трансмиссии вирусов в генеративное потомство растений, а особенно исследований эндогенной вирусной инфекции у растений, проявлением которой является, например, пораженность вирусами сеянцев, происходящих от здоровых, непораженных маточных растений.

Имеющийся в лаборатории оздоровления и биотехнологии сельскохозяйственных культур Эстонского НИИЗиМ опыт выращивания на питательной среде меристемных растений разных видов (картофель, клубника, хризантема, гвоздика, орхидея и др.) позволяет предполагать, что описанный метод выращивания сеянцев не ограничивается лишь картофелем, а является пригодным и для других видов растений.

ЛИТЕРАТУРА

- Агур М., Виллемсон С. О передаче некоторых мозаичных вирусов через семена. — В кн.: Тезисы докладов семинара «Повышать эффективность и качество цветводства и овощеводства». Таллин, 1980, 42—44.
- Агур М. Трансмиссия X-вируса картофеля через семена и почву. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1981, 30, № 1, 35—43.

- Агур М., Виллемсон С., Тарасова К. Характеристика вирусных форм, изолированных из индикаторного вида *Nicotiana tabacum* L. 3. Трансмиссия семенами. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1985, 34, № 2, 150—159.
- Виллемсон С., Агур М. Влияние вирусной инфекции на кондиционные свойства семян. — Тез. докл. науч.-практ. конф. по защите растений. Ч. I Таллин, 1985, 10—12.
- Здрийковская-Рихтер А. И. Культура изолированных зародышей, семян и семян различных плодовых растений и аспекты ее применения в прикладных целях. — Сельскохозяйств. биол., 1985, № 3, 57—61.
- Нурмисте Б. Х. К проблеме селекции вирусоустойчивых сортов картофеля. — Изв. АН ЭССР. Биол., 1974, 23, № 4, 313—316.
- Нурмисте Б. Х., Агур М. О., Тийтс А. А. Новые представления в селекции картофеля на вирусоустойчивость. — Вестн. с.-х. н., 1983, № 11, 31—38.
- Розенберг В. Технология оздоровления и размножения семенного картофеля, разработанная в Эстонском НИИ земледелия и мелиорации. — В кн.: Защита растений. Научные труды Эстонского НИИ земледелия и мелиорации. Таллин, 1984, LIII, 70—89.
- Розенберг В. Р. Способ получения посадочного материала картофеля и среда для размножения регенерированных растений. Авт. свид. СССР № 1025373. — Бюл. изобр. № 24 (1983).

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
9/IV 1985

Эстонский научно-исследовательский
институт земледелия и мелиорации

Milvi AGUR, Viive ROSENBERG

MEETOD KARTULISEEMIKUTE KASVATAMISEKS TOITSEGUL

Artiklis on kirjeldatud meetodit kartuliseemnete idandamiseks ja neist seemiktainede kasvatamiseks katseklaasis toitesegul steriilsetes tingimustes. Võrreldi kartulisordi 'Stina' seemnete idanemisaktiivsust ja seemiktainede arenemist neljal toitesegul. Neist variandid nr. 1, 3, 4 on EMMTUI-s välja töötatud kartuli ja teiste kultuuride meristeemi kultiveerimiseks ning variant nr. 2 meristeemtaimede mikrokloonpaljundamiseks. Parimad tulemused saadi toitesegul nr. 2 (seemiktainede saavutasid ühe kuuga keskmise kõrguse 5—6 cm ja neil arenes keskeltläbi 6 lehte ühe taime kohta). Võrreldi seemiktainede edasist kasvatamist pottides erinevatel substraadidel.

Kirjeldatud uus meetod tagab taimeviiruste seemnetransmissioonilaste uurimistööde suurema täpsuse, kuna ta võimaldab üles kasvatada tunduvalt rohkem seemiktaimi kui senikasutatud seemikute muldsubstraadil kasvatamise meetod, saada ühest seemnest mikrokloonpaljundamise abil piiramatut arvu seemiktaimi ja teha virooloogilist analüüsi seemiktainedel, mis on kasvanud steriilsetes tingimustes.

Milvi AGUR, Viive ROSENBERG

METHOD FOR GROWING POTATO SEEDLINGS ON A NUTRIENT MEDIUM

A method for growing potato seedlings in sterile conditions in test-tubes on nutrient medium is described. Potato seeds of the cv. 'Stina', disinfected with 0.1% AgNO_3 or 0.1% HgCl_2 , were sown one by one into test-tubes containing 3 ml of nutrient media supplemented by agar. Four nutrient media used in meristem-tip culture for regeneration of meristem-plants (Nos 1, 3, 4) or for microcloning (N2) were tested. The germination and sprouting of the seeds were practically total. All of the sprouting seeds developed to plantlets. The nutrient medium N2 was the most appropriate one for the development of the seedlings. In a month, the plantlets grown on that nutrient medium were 5—6 cm in height and had six leaflets on the average. The one-month-old seedlings were transplanted onto peat or a mixture of peat and soil. The first-mentioned substrate proved more suitable.

The method described gives a possibility to grow more seedlings than by planting the sprouting seeds in pots. Moreover, there is a possibility to microclone the plantlets and get in that way many seedlings from one seed as well as analyse the seedlings growing in test-tubes in sterile conditions. That is of importance for studying seed-transmission in general and endogenous viral infection of plants in particular.