

ЗАВИСИМОСТЬ РЕГЕНЕРАЦИИ КАЛЛУСОВ КАРТОФЕЛЯ ОТ УСЛОВИЙ ИНДУКЦИИ

Юлле КОЛЛИСТ, Эльве ТИКК

Eesti Teaduste Akadeemia Eksperimentaalbioloogia Instituut (Институт экспериментальной биологии Академии наук Эстонии). Instituudi tee 11, EE-3051 Harku, Harjumaa, Eesti (Эстония)

Представила Ю. Вийл

Поступила в редакцию 21/V 1993; после переработки 22/VI 1993; принята к печати 25/VI 1993

Аннотация. Изучали способность каллусной ткани 21 сорта картофеля образовать побеги на среде Мурасиге и Скуга с различными концентрациями ростовых веществ и сахаров. Выявили зависимость регенерационной способности каллусов от сорта картофеля и состава питательной среды.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum* L., каллусная культура, морфогенез, регенерация.

Одним из направлений использования метода культуры тканей и клеток растений является создание исходного материала для селекции сельскохозяйственных растений. Этим методом получены у нескольких видов растений резистентные линии с повышенной устойчивостью к разным фитопатогенным факторам (Schütze и др., 1988; Wenzel, Foroughi-Wehr, 1990). Важную роль при этом играет соматоклональная изменчивость, которая возникает при культивировании соматических клеток и тканей *in vitro* (Larkin, Scowcroft, 1981; Киселев, Анненков, 1989). При использовании соматоклональных линий растений с целью повышения устойчивости исходных форм картофеля к вирусным инфекциям важно разработать условия для стабильного получения из каллусных культур растений-регенерантов. Многие авторы указывают на зависимость регенерационных процессов от генотипа, типа эксплантов и гормонального состава питательной среды (Foulger, Jones, 1986; Shepard, 1982; Аветисов, Мелик-Саркисов, 1985; Хромова и др., 1983; Mei-Lie и др., 1987). Это указывает на то, что для каждого сорта необходимо подбирать свои оптимальные условия морфогенеза.

Целью настоящей работы является изучение регенерационных способностей у 21 сорта картофеля на разных питательных средах и выявление сортов с высокой регенерационной активностью для дальнейших исследований, в частности по вирусостойчивости.

МЕТОДИКА

В качестве исходного материала использовали меристемные растения 21 сорта (Агра, Адретта, Андо, Астрид, Вигри, Глуге, Диамант, Йыгева коллане, Каспар, Лазунок, Мавка, Матс, Нора, Олев, Орме, Превалент, Премьер, Сулев, Франци, Фрила, Эба), полученные из НИ центра биотехнологии ЭВИКА.

Каллусные ткани стеблевого и листового происхождения получали на агаризованной среде Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962) с добавлением 10 мг/л 2,4-дихлорофеноксиуксусной кислоты (2,4-Д). Для индукции морфогенеза каллусные ткани переносили на среду Мурасиге и Скуга, дополненную различными регуляторами роста в различных концентрациях и с разным содержанием сахаров.

В табл. 1 приведены составы 21 питательной среды, использованной нами на первом этапе работы с целью выявления лучших вариантов для регенерации каллусов у опытных сортов. Эксперименты проводили в 1—2-кратной повторности. У 12 сортов (Агра, Адретта, Андо, Вигри, Каспар, Мавка, Матс, Олев, Превалент, Премьер, Сулев, Эба) сравнивали каллусы стеблевого и листового происхождения.

На втором этапе работы для выяснения более регенерационноспособных сортов картофеля использовали среду Мурасиге и Скуга в вариантах 13 и 14. Опыты проводили в восьми повторностях со всеми вышеназванными сортами. Каллусы выращивали при температуре 27°C при 16-часовом фотопериоде.

Таблица 1

Содержание модифицированных питательных средств для индукции морфогенеза каллусов картофеля

Номер среды	Ростовые вещества, мг/л					Сахара, г/л		
	Ауксины			Цитокинины		Сахароза	Маннит	Глюкоза
	ИУК	НУК	2,4-Д	БАП	Кин			
1	—	—	—	—	—	30	—	—
2	—	1	—	—	3	30	—	—
3	1	—	—	1	—	30	—	—
4	0,5	—	—	1	—	30	—	—
5	1	—	—	—	3	30	—	—
6	—	—	1	—	—	30	—	—
7	—	—	—	—	1	30	—	—
8	—	—	—	—	5	30	—	—
9	—	—	—	0,5	—	30	—	—
10	—	—	—	1	—	30	—	—
11	0,1	—	—	6	—	30	—	—
12	0,1	—	—	6	—	20	—	10
13	0,1	—	—	6	—	20	20	—
14	0,1	—	—	6	—	60	—	—
15	—	—	—	6	—	20	—	10
16	—	—	—	6	—	20	20	—
17	—	—	—	6	—	60	—	—
18	—	—	—	8	—	30	—	—
19	—	—	—	8	—	20	—	10
20	—	—	—	8	—	20	20	—
21	—	—	—	8	—	60	—	—

Примечание. ИУК — индолилуксусная кислота, НУК — 1-нафтилуксусная кислота, 2,4-Д — 2,4-дихлорофеноксиуксусная кислота, БАП — 6-бензиламинопурин, Кин — кинетин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе индукции органогенеза каллусные культуры картофеля претерпевали следующие изменения: продолжали интенсивно расти без признаков органогенеза, некротизировались и погибали, переходили к ризогенезу, образовали регенеранты.

Сравнивали влияние сред разного состава, успешно использованных некоторыми авторами (Sreenivasa и др., 1988; Сидоров и др., 1985), на морфогенетические процессы у 12 опытных сортов картофеля. Выяснилось, что на средах 1—4 в течение месяца продолжался прирост каллуса в большей или меньшей мере у всех сравниваемых сортов, однако образования побегов не отмечалось. На средах 5—10 уже в течение первой недели у некоторых сортов началась некротизация и к концу третьей недели все каллусные ткани вымерли.

По данным некоторых авторов, положительное влияние на морфогенетические процессы оказывают низкие концентрации ауксинов в сочетании с высокими концентрациями цитокининов (Hendrix и др., 1987; Kowalczyk и др., 1983; Давоян, 1991), а также повышенное содержание сахаров (Маруненко и др., 1990).

Учитывая это, нами были проведены опыты с варьированием содержания индолилуксусной кислоты (ИУК), 6-бензиламинопурина (БАП) и сахаров в средах 11—21. Проведенные нами исследования показали, что на средах 11—21 к концу второго месяца культивирования во всех случаях было отмечено образование побегов, первые из которых появились уже через 4 недели. На названных средах отмечено развитие единственных побегов, причем среды 13 и 14 проявляли более высокую регенерационную способность, индуцируя лучшее образование побегов (24 и 17 регенерантов соответственно).

Из проведенных опытов можно сделать следующие выводы: среды 1—10 оказались неподходящими для каллусов опытных сортов картофеля, на средах 11, 12 и 15—18 происходит слабый морфогенез и при повторном их использовании они могут дать и гораздо лучшие результаты. Наиболее эффективными оказались среды 13 и 14 с добавлением 0,1 мг/л ИУК, 6 мг/л БАП и из сахаров 20 г/л сахарозы и 20 г/л маннита или 60 г/л сахарозы. Полученные данные показали, что исследуемые нами каллусы картофеля требуют наличия в питательной среде ауксинов в низких концентрациях в сочетании с цитокининами в высоких концентрациях и сахаров в высоких концентрациях. Содержание ауксинов в среде оказалось важным, так как на средах без них морфогенез был слабым и его не улучшило увеличение содержания цитокининов. У всех сортов через неделю культивирования на средах 11—21 в каллусах начали образовываться корни. Особо интенсивным корнеобразованием отличались сорта Фрила и Эба, в то же время прирост каллуса у них был незначительным. Образование большого количества корней в каллусе Г. П. Бутова и Т. М. Табацкая (1981) рассматривают как косвенный показатель меристематизации ткани в этот период и дальнейшую реализацию образовавшихся меристематических центров в стебель или корень связывают с условиями продолжающегося культивирования.

Обычно у большинства сортов образование побегов в каллусе началось через 6—8 недель культивирования на морфогенных средах. Иногда первые побеги появлялись уже через 4 недели, а в некоторых случаях образование побегов наблюдалось и на старых (3—4 месяца) частично почерневших каллусах. Коррелятивную связь между началом регенерации и разными генотипами или разными морфогенетическими средами выявить по имеющимся данным не возможно. При морфогенезе большая часть побегов в наших опытах имела нормальную

форму. Побеговые обыкновенно образовывались на поверхности каллуса, в редких случаях они появлялись на нижней части каллуса и проникали в питательную среду. Такие побеги иногда имели уродливую форму; но при помещении их на среду для укоренения они нормализовались. Редко образовавшиеся этиолированные побеги (иногда розетковидные) при переносе на новую среду оказывались все нежизнеспособными.

Проведенные нами исследования показывают, что изученные нами каллусы 21 сорта картофеля явно различаются по своему морфогенетическому потенциалу. В опытах по сравнению регенерационной способности названного 21 сорта мы применяли только лучшие варианты сред — 13 и 14 (табл. 2). Каллусные ткани у сортов Эба, Олев, Вигри, Адретта, Диамант и Премьер характеризовались более высоким морфогенетическим потенциалом: при культивировании на морфогенных средах каллусы образовали в восьми сериях опыта у сорта Эба 42 побега, у Олев 21, у Вигри 20, у Адретта 17, у Диамант 14 и у Премьера 12 побегов. Низкой регенерационной способностью обладали сорта Франци, Агра, Глук, Йыгева коллане и Матс, у которых к концу культивирования образовалось только 5—10 побегов. Каллусы сортов Астрид, Фрила, Андо, Каспар, Лазунок, Орме, Превалент и Сулев регенерировали лишь единственные побеги (меньше 5). Сорта Мавка и Нора не были способными регенерировать растения из каллусов на использованных нами морфогенных средах.

Выявились различия в реакции сортов картофеля на состав сахаров двух морфогенных сред, выбранных после первого этапа работы. Следует отметить, что у сорта Эба регенерационные процессы проходили активнее на среде 13, содержащей 20 г/л сахарозы и 20 г/л маннита. Побегов на этой среде было почти в два раза больше, чем на среде 14 с высокой концентрацией сахарозы (60 г/л). У сорта Адретта различия в частоте регенерации побегов были незначительными, а у сортов Олев, Вигри и Премьер морфогенез наблюдался лишь на среде 14 (60 г/л сахарозы).

Таблица 2

Индукция побегообразования в каллусах картофеля разных сортов

Сорт картофеля	Общее число побегов в восьми сериях			Сорт картофеля	Общее число побегов в восьми сериях		
	Среды 13	Среды 14	Всего		Среды 13	Среды 14	Всего
Эба	27	15	42	Превалент	—	4	4
Олев	—	21	21	Астрид	3	1	4
Вигри	—	20	20	Сулев	—	3	3
Адретта	10	7	17	Фрила	1	2	3
Диамант	8	6	14	Андо	2	—	2
Премьер	—	12	12	Каспар	2	—	2
Йыгева коллане	6	4	10	Лазунок	—	1	1
Агра	2	6	8	Орме	—	1	1
Франци	5	2	7	Мавка	—	—	0
Глук	4	1	5	Нора	—	—	0
Матс	5	—	5				

В заключении следует отметить, что для получения регенерантов из каллусов разных сортов картофеля важно найти оптимальный состав среды как с ростовыми веществами, так и с сахарами. Таким образом, наиболее перспективными для регенерации изученных нами каллусных культур оказались среды с добавлением 0,1 мг/л ИУК, 6 мг/л БАП и 60 г/л сахарозы или 20 г/л сахарозы и 20 г/л маннита. Проведенные исследования показали, что из изученных сортов картофеля по регенерационной способности в культуре лучшим морфогенетическим потенциалом отличались Эба, Олев, Вигри, Адретта, Диамант и Премьер. Отобранные сорта в дальнейшем будут использоваться для выборки соматоклональных линий растений, резистентных к вирусным инфекциям.

ЛИТЕРАТУРА

- Аветисов В. А., Мелик-Саркисов О. С. 1985. Генотипические особенности морфогенеза в каллусных культурах различных сортов картофеля. — С.-х. биол., 3, 67—70.
- Бутова Г. П., Табацкая Т. М. 1981. Некоторые особенности морфогенеза в каллусной культуре тополя. — Физиол. раст., 22, 1, 215—217.
- Давоян Э. И. 1991. Оптимизация условий индукции морфогенеза в каллусной культуре риса. — С.-х. биол., 5, 67—70.
- Киселев Е. П., Анненков Б. Г. 1989. Особенности и перспективы использования методов биотехнологии в селекции картофеля на Дальнем Востоке. — С.-х. биол., 5, 11—16.
- Маруненко И. М., Кучко А. А., Бутенко Р. Г. 1990. Андрогенез и получение растений в культуре пыльников картофеля. — С.-х. биол., 1, 138—143.
- Сидоров В. А., Пивень Н. М., Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. 1985. Соматическая гибридизация пасленковых. Наукова думка, Киев.
- Хромова Л. М., Седнина Г. В., Бутенко Р. Г. 1983. Клеточная селекция картофеля. — С.-х. биол., 6, 3—12.
- Foulger, D., Jones, M. G. 1986. Improved efficiency of genotype — dependent regeneration from protoplasts of important potato cultivars. — Plant Cell Reports, 5, 72—76.
- Hendrix, R. C., Litz, R. E., Kirchoff, B. K. 1987. *In vitro* organogenesis and plant regeneration from leaves of *Solanum candidum* Lindl., *S. quitoense* Lam. (*naranjilla*) and *S. sessiliflorum* Dunal. — Plant Cell Tissue Org. Cult., 11, 67—73.
- Kowalczyk, T. P., Mackenzie, I. A., Cocking, E. C. 1983. Plant regeneration from organ explants and protoplasts of the medicinal plant *Solanum khasianum* C. B. Clarke var. *chatterjuanum sengupta* (syn. *Solanum viarum* Dunal.). — Z. Pflanzenphysiol., 111, 55—68.
- Larkin, P. J., Scowcroft, W. R. 1981. Somaclonal variation — a novel source of variability from cell culture for plant improvement. — Theoret. Appl. Genet., 60, 4, 197—214.
- Mei-Lie, M. C. Tan, Boerrigter, H. S., Kool, J. 1987. A rapid procedure for plant regeneration from protoplasts isolated from suspension cultures and leaf mesophyll cells of wild *Solanum* species and *Lycopersicon pennellii*. — Plant Sci., 49, 63—72.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. — Physiol. Plant., 15, 473—497.
- Schütze, R., Krämer, R., Giesbach, E. 1988. *In vitro* Regeneration von Tomatenpflanzen mit verbesserter Resistenz gegen *Clavibacter michigonensis* ssp. *michigonensis* (Smith) Davies n. a. — Arch. Züchtungsforsch., Berlin, 18, 3, 139—147.
- Shepard, J. F. 1982. Cultivar dependant cultural refinements in potato protoplast regeneration. — Plant Sci Lett., 26, 127—132.

Sreenivasa, S. M., Christopher, T., Subnash, K. 1988. Multiple shoot formation in embryo culture of *Solanum melongena*. — *Current Sci.*, 57, 4, 197—198.

Wenzel, G., Foroughi-Wehr, B. 1990. Progeny test of barley, wheat and potato regenerated from cell cultures after in vitro selection for disease resistance. — *Theor. Appl. Genet.*, 80, 3, 359—365.

KARTULIKALLUSTE REGENERATSIOONI SÖLTUVUS INDUKTSIOONI TINGIMUSTEST

Ülle KOLLIST, Elve TIKK

Viirusresistentsete kloonide saamiseks koekultuuri meetodil on uuritud 21 Eesti kartuliaretuses kasutatava kartulisordi kalluste regeneratsiooni- võimet Murashige-Skoogi söötme erineva kasvuainete ja suhkrisaldusega variantidel. Võrreldud söötmevariantidest osutusid efektiivseteks kaks (13 ja 14), mis sisaldasid väikeses kontsentratsioonis auksiini ja suures kontsentratsioonis tsütokiniini (0,1 mg/l indolüüläädikhapet, 6 mg/l bensüülaminopuriini) ning suures kontsentratsioonis suhkruid (4—6%).

Uuritud kartulisordid erinesid morfogeneetilise potentsiaali poolest — kuue sordi kallused andsid sobival söötmel võrseid, ülejäänud sortidel arenesid ainult üksikud regenerandid ning kaks sorti ei olnud meie katseis regeneratsioonivõimelised. Katsetulemuste põhjal väljavalitud kuus sorti on sobivad edaspidises töös viirusresistentse materjali saamiseks.

DEPENDENCE OF POTATO CALLI REGENERATION ON INDUCTION CONDITIONS

Ülle KOLLIST and Elve TIKK

The shoot regeneration ability of potato calli was studied on Murashige-Skoog media with various supplements of growth regulators as well as sugars to get virus-resistant clones. This was carried out by tissue-culture method from 21 potato cultivars used by Estonian potato breeders. Two of the 21 media variants examined turned out to be effective, containing auxin in low concentration and cytokinin in high concentration (0.1 mg/l indoleacetic acid and 6 mg/l benzylaminopurine) and sugars in an increased concentration (4—6%).

The results demonstrate the genotype-dependent regeneration ability of potato calli: the calli from 6 potato cultivars regenerated shoots on suitable nutritive media, others formed only single shoots, and two cultivars were not able to regenerate shoots.

Six cultivars with the best shoot regeneration capacity can be used for further investigations of virus-resistance.