

УДК 631.147:582.951.4

А.Ж. Измаганбетова, А.Н. Хусанбаева, А.А. Какимжанова*
 РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, г. Астана
 *e-mail: kakimzhanova@biocenter.kz

Получение и размножение растений-регенерантов картофеля при использовании штаммов гриба *Phytophthora infestans*

В качестве объектов исследований использовали гибриды картофеля, казахстанской селекции. При использовании одноступенчатой и многоступенчатой клеточной селекции на устойчивость к фитофторозу получено 229 пробирочных растений-регенерантов, которые размножали путем микрочеренкования. Растения-регенеранты 9-10-04, 21-10-06, 26-10-07, 18-10-02, 6-10-03, 2-10-03, 23-10-02, полученных с селективных сред микроклонально размножили в количестве 1166 штук, из них 625 растений-регенерантов высадили в почвогрунт в пленочную теплицу. Сбор урожая растений-регенерантов картофеля составил 2464 клубней.

Ключевые слова: *Ph.infestans*, картофель, гибрид, растение-регенерант.

А.Ж. Измаганбетова, А.Н. Құсанбаева, А.А. Кәкімжанова

Phytophthora infestans саңырауқұлақ штаммын қолдану арқылы картоптың өсімдік-регенерантын алу және көбейту

Зерттеу нысаны ретінде қазақстан селекциясындағы картоп гибридтері пайдаланылды. Бірсатылы селекцияны қолдану арқылы 1027 эксплант және 672 каллус ұлпасы *Ph.infestans* саңырауқұлағы қосылған дақылдық фильтраты бар коректік ортаға отырғызылды, оның ішінде регенерацияға 556 каллустық линиядан алынған өсімдік-регенерант саны – 211 (38,0%). Сегіз генотип бойынша төзімді каллустық линиялар саны - 89, оның ішінен 18 пробиркалық өсімдік-регенерант алынды.

Бірсатылы және көпсатылы селекцияны қолданған кезде микрокалемшелеу арқылы фитофторозға төзімділік ретінде 229 өсімдік-регенерант алынды. Селективтік ортадан алынған 9-10-04, 21-10-06, 26-10-07, 18-10-02, 6-10-03, 2-10-03, 23-10-02 өсімдік-регенеранттары микроклональды көбейтілгені - 1166 дана, оның ішінде 625 өсімдік регенеранты жылыжай топырағына отырғызылды. Өсімдік-регенеранттарынан алынған түйнектер саны - 2464.

Түйін сөздер: *Ph.infestans*, картоп, гибрид, каллус, өсімдік – регенерант.

A.J. Izmaganbetova, A.N. Husanbaeva, A.A. Kakimzhanova
 Preparation and reproduction of plants regenerated potato using strains of the fungus *Phytophthora infestans*

The objects of the studies used hybrids potato Kazakhstan selection. When using one-step selection were planted in 1027 and 672 explant hybrid potato calli on selective medium supplemented with CF fungus *Ph.infestans*, are plated onto regeneration callus lines 556, 211 from which the obtained regenerated plants (38.0 %). The number of surviving calluses on eight genotypes was 89 callus lines, of which 18 received probirochnyh regenerated plants. When using a single-stage and multi- cell selection for resistance to late blight obtained 229 -vitro regenerated plants that have been bred by micropropagation. Regenerated plants 9-10-04, 21-10-06, 26-10-07, 18-10-02, 6-10-03, 2-10-03, 23-10-02, derived from selective media micropropagation duplicated in the amount of 1166 units, including 625 regenerated plants were planted in soils in greenhouses. Harvesting plants regenerated potato tubers was 2464.

Keywords: *Ph.infestans*, potatoes, hybrid, callus, regenerated plants.

Для Казахстана выращивание картофеля очень актуально, так как это один из основных продуктов питания у населения. Средняя урожайность картофеля в Казахстане не превышает 16 т/га. Причинами невысокой его урожайности является вред, наносимый культуре картофеля болезнями, вредителями и сорняками. Подсчитано, что картофель повреждается 38 видами грибов, среди которых

наиболее распространенным является фитофтороз.

Фитофтороз является одним из самых распространенных опасных заболеваний картофеля, как в нашей стране, так и за рубежом. Его возбудитель - гриб *Ph.infestans* (Mont.) de Bary из класса оомицетов. Болезнь получила название «фитофтора» от названия грибка, что означает «пожиратель растений». В

благоприятные годы характеризуется быстрым распространением и массовым поражением картофеля, из-за чего обеспечивает эпифитотийное развитие на значительных территориях. Гриб поражает все органы растения (листья, стебель, клубни, цветки, ягоды) на протяжении всей вегетации: от появления всходов до естественного отмирания ботвы [1, 2].

В последние годы для получения новых сортов растений, устойчивых к болезням, вирусам, вредителям, отличающихся высокой урожайностью и продуктивностью, высокими питательными свойствами все больше используются нетрадиционные технологии, такие, как генная и клеточная биотехнологии [3, 4].

Материалы и методы

Для получения органогенных структур, отобранные каллусные линии с селективных сред с КФ гриба *Ph.infestans* культивировали на питательные среды МС с добавлением экзогенных фитогормонов - бензиламинопурина (БАП), 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), индолилуксусной кислоты (ИУК), зеатина, кинетина в следующих концентрациях - 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 мг/л.

Образовавшиеся органогенные структуры генотипов картофеля пересаживали в пробирки на питательные среды МС для получения растений-регенерантов. Для быстрого размножения пробирочных растений-регенерантов картофеля проводили микрочеренкование. Черенкование растений-регенерантов проводили с интервалом 24-28 дней.

Укоренившиеся пробирочные растения-регенеранты картофеля высаживали в пленочную теплицу на глубину 4-6 см при схеме посадки 35x15 см. Проводили морфометрический анализ растений-регенерантов картофеля – подсчитывали количество листьев, побегов, измеряли высоту растений на одном кусте. Учет и структуру урожая клубней растений-регенерантов картофеля проводили путем взвешивания товарной фракции каждого генотипа с одного куста, подсчитывали количество клубней с одного куста. Провели хозяйственно-биологическую характеристику клубней гибридов и растений-регенерантов картофеля первого поколения.

Результаты и их обсуждение

Подбор питательных сред для увеличения выхода растений-регенерантов картофеля. В ходе эксперимента для получения растений-регенерантов гибридов картофеля, с селективных сред с изолятами гриба *Ph.infestans* (одноступенчатая селекция, многоступенчатая селекция, техника двойного слоя) 707 толерантных каллусных линии были пассированы на питательную среду МС для регенерации. Изучили 6 вариантов питательных сред МС для увеличения выхода растений-регенерантов для этого 198 устойчивых каллусных линий гибридов: 21-10-06, 9-10-04, 6-10-03 высаживали на питательные среды для регенерации. Варианты питательных сред отличались между собой соотношением фитогормонов: 1) вариант - 2,4-Д - 0,5 мг/л, кинетин - 0,5 мг/л; 2) вариант - 2,4-Д - 0,5 мг/л, кинетин - 1 мг/л; 3) вариант - 2,4-Д - 0,5 мг/л, кинетин - 0,5 мг/л, БАП - 0,5 мг/л; 4) вариант - 2,4-Д - 0,5 мг/л, БАП - 1 мг/л; 5) вариант - 2,4-Д - 0,5 мг/л, зеатин - 0,5 мг/л; 6) вариант - 2,4-Д - 0,5 мг/л, зеатин - 0,5 мг/л, БАП - 0,5 мг/л.

После культивирования на шести вариантах сред МС устойчивых каллусных линий к изолятам гриба *Ph.infestans* через месяц был подсчитан процент выхода растений-регенерантов. На 6 вариантах в среднем процент регенерации составил 25,2%. В среднем лучший процент регенерации наблюдали на варианте среды №3 - 44,0%. Наименьший выход растений-регенерантов наблюдали на варианте 6, который колебался от 10 до 13,3% в зависимости от генотипа. Самый высокий процент регенерации 50% показал гибрид 6-10-03 при культивировании на варианте среды № 3. У гибрида 21-10-06 процент выхода растений-регенерантов на вариантах сред 1, 2, 4 и 5 составило 20%, а на варианте 3 - 44,4%. Следовательно, вариант 3 среды был наиболее оптимальным для получения пробирочных растений-регенерантов со сформированной корневой и стеблевой системой (рисунок 1).

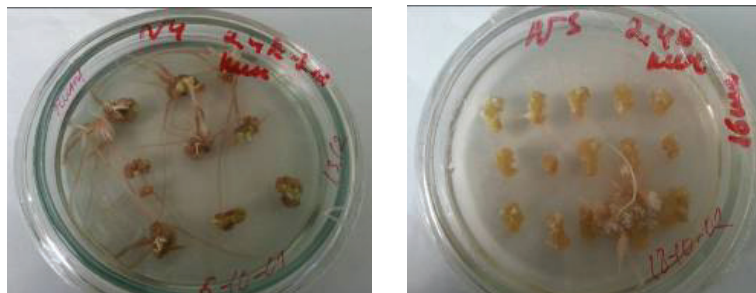
Получение и микроклональное размножение растений-регенерантов картофеля, полученных с селективных сред с КФ гриба Ph.infestans.

Следующим эффективным этапом для увеличения количества растений-регенерантов картофеля является микроклональное

размножение пробирочных растений. Основным требованием микрочеренкования является обеспечение высокого коэффициента размножения пробирочных растений, в связи с этим подбираются оптимальные условия культивирования.

В ходе эксперимента при использовании

одноступенчатой селекции на устойчивость к КФ гриба *Ph.infestans* выход растений-регенерантов гибридов картофеля составил 211 (38%). При культивировании каллусных линий картофеля в течение 3-х пассажей выход растений-регенерантов - 20,2%.



1 – корневой органогенез каллусов, 2 - стеблевой органогенез каллусов

Рисунок 1 – Типы морфогенеза каллусных линий гибридов картофеля

Регенерация каллусных линий картофеля, с селективных сред с КФ гриба *Ph.infestans* при длительном культивировании с КФ снижалась. При использовании одноступенчатой и многоступенчатой клеточной селекции на устойчивость к фитофторозу получено 229 целых пробирочных растений-регенерантов которые размножали путем микрочеренкования.

После подбора питательных сред растения-регенеранты 9-10-04, 21-10-06, 26-10-07, 18-10-02, 6-10-03, 2-10-03, 23-10-02, полученных с селективных сред микроклонально размножили в количестве 1186 штук, из них 625 растений-регенерантов высадили в почвогрунт в пленочную теплицу (рисунок 2).

Высадка и размножение растений-регенерантов картофеля в теплице. Провели посадку в теплицу филиала НЦБ РК (г. Степногорск) гибридов и растений-регенерантов картофеля, полученных на селективных средах с КФ гриба *Ph.infestans* в количестве 658 штук, в том числе гибридов 33 и растений-регенерантов 625 пробирочных растений. В течение вегетации наблюдали рост и развитие растений-регенерантов картофеля.

Через 30 дней провели учет морфометрических показателей роста и развития растений-регенерантов картофеля - 9-10-04, 21-10-06, 26-10-07, 18-10-02, 6-10-03, 2-

10-03, 23-10-02 по 10 растений каждой линии. Сравнительный анализ развития пробирочных растений-регенерантов, полученных с селективных сред проводили по морфометрическим показателям - высота растений, количество листьев и стеблей. Показано, что у гибрида 9-10-04 (исходная форма) и растений-регенерантов 9-10-04 МС, 9-10-04 30-50% КФ высота растений была почти на уровне от 11,1 до 12,0 см. Низкие растения сформированы у линий 9-10-04 5% КФ. Количество сформированных листьев у генотипа 9-10-04 на 4-х вариантах селективных сред отличались между собой: контроль 9-10-04 – 9 листьев, 9-10-04 МС – 7,3 листьев, 9-10-04 5% КФ – 8,0 листьев, 9-10-04 30-50% - 5,5 листьев. Таким образом, при сравнении 4-х линий растений-регенерантов гибрида 9-10-04, полученных с селективных сред по морфометрическим показателям хорошо растущие растения сформированы у гибрида 9-10-04 (контроль), 9-10-04 с МС, 9-10-04 30-50% КФ.

Сбор урожая регенерантов картофеля и изучение структуры урожая. Провели сбор урожая растений-регенерантов картофеля, который составил 2464 клубней, из них 194 клубней гибридов и 2270 клубней растений-регенерантов (таблица).



1 – микроклонально размноженные регенеранты, 2 - высадка в почвогрунт, 3 - создание микроклимата для приживаемости регенерантов картофеля

Рисунок 2 – Высадка регенерантов картофеля, полученных с селективных сред в почвогрунт

Таблица - Структура урожая регенерантов, размноженных в теплице

№	Генотип	Число клубней с одного куста				Средний вес клубней с одного куста, (г)	Общее количество клубней
		крупные	средние	мелкие	всего		
1	Гибрид 9-10-04	5,5	1,5	1,5	8,5	365±22,3	17
	9-10-04 R MC	6,6	3,4	1,8	11,8	626±34,2	788
	9-10-04 R 5%	5,0	2,0	-	7,0	300±27,3	7
	9-10-04 R 30%-50%	4,5	2,0	1,5	8,0	405±7,07	23
2	Гибрид 21-10-06	14	2,8	0,2	17,0	344±18,3	85
	21-10-06 R MC	6,8	2,2	2	11,5	525±47,3	315
	21-10-06 R 5%	4,8	1,0	-	5,8	159±58,3	29
3	Гибрид 18-10-02	8,0	4,0	3,0	15,0	910±97,4	15
	18-10-02 R MC 5%-10%	7,8	1,6	0,2	9,6	335±13,7	270
	18-10-02 R 20% КФ	7,3	3,5	1,5	12,0	555±17,5	48
4	Гибрид 26-10-07	5,5	1,0	1,5	8,0	303±27,8	6
	26-10-07 R MC	10,2	3	0,4	13,6	392±15,4	115
	26-10-07 R 5% КФ	7,2	2,0	0,4	12,6	345±51,4	212
5	Гибрид 6-10-03	11,2	3,6	1,0	15,8	571±8,6	29
	6-10-03 R MC	3,8	2,2	2,4	8,4	522±32,3	383
6	Гибрид 2-10-03	3,0	2,0	2,0	7,0	345±13,9	7
	2-10-03 R 10% КФ	7,3	1,3	1	9,0	413±19,6	27
7	Гибрид 23-10-02	2,0	5,0	-	7,0	240±25,2	35
	23-10-02 R 5% КФ	6,8	3,0	1,8	11,5	565±35,6	53
	Итого	6,7	2,5	1,2	10,5	433±49,2	2464



Рисунок 3 – Размножение и сбор урожая регенерантов картофеля в теплице

Клубни растений-регенерантов заложены на хранение для дальнейшего размножения.

Проведен структурный анализ регенерантов по фракциям клубней, цвету и форме клубня,

массе клубней с одного куста (рисунок 3).. Учитывали динамику образования миниклубней картофеля в среднем на один куст в пяти повторностях. В среднем число клубней с одного куста 19 гибридов и растений-регенерантов составило 10,5 штук, в зависимости от генотипа варьировало от 5,8 до 17 штук.

Полученные клубни различались по фракциям, в среднем на одно растение-регенерант число крупных клубней составило

6,7 штук, средних – 2,5 штук, мелких – 1,2 штук. Общее количество собранных клубней – 2464 штук. Средний вес клубней с одного куста составил 433 грамм и варьировал от 159 до 910 гр.

Миниклубни гибридов и растений-регенерантов картофеля, полученных с селективных сред отличались по внешним признакам. Форма клубней растений-регенерантов картофеля была разнообразна - округлая, округло-овальная, овальная форма.

Литература

1. Попкова К.В. Общая фитопатология: учебник для вузов. - М.: Дрофа, 2005. – 44 с.
2. Termorshuizen Aad J. Fungal and Fungus-Like Pathogens of Potato // Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives. - 2007. - P.643-665.
3. Zhu S., Vossen J.H., Visser R.G.F., Jacobsen E. Functional stacking of three resistance genes against *Ph. infestans* potato // Transgenic Res. - 2012. - Vol. 21. - P.89-99.
4. Лети Дж, Калашникова Е.З. Клеточная селекция пшеницы на устойчивость к септориозу // Сельскохозяйственная биотехнология. Избранные работы. - 2000. - С.61-70.