

УДК 632.5.01/08

## ОПТИМІЗАЦІЯ СКЛАДУ ЖЕЛЮЮЧИХ АГЕНТІВ НА РЕГЕНЕРАЦІЮ МІКРОРОСЛИН КАРТОПЛІ, ОТРИМАНИХ *IN VITRO*

Г. М. Шевага<sup>1</sup>, М. М. Кирик<sup>2</sup>, В. М. Гунчак<sup>1</sup>, Т. М. Олійник<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Українська науково-дослідна станція карантину рослин ІЗР НААН  
с. Бояни, Новоселицький р-н, Чернівецька обл., 60321, Україна

<sup>2</sup>Національний університет біоресурсів і природокористування України  
вул. Героїв Оборони, 15; м. Київ, 03041, Україна

<sup>3</sup>Інститут картоплярства НААН  
вул. Чкалова, 22; смт Немішаєве, Бородянський р-н, Київська обл., 07853, Україна  
e-mail: h\_shewaha@mail.ru

*Наведено результати досліджень з оптимізації живильного середовища Мурасіге-Скуга модифікованого кукурудзяним крохмалем для прискореного клонального мікророзмноження рослин картоплі. Встановлено, що модифікація методу покращує показники приживлюваності, сприяє їх активному росту та розвитку живців картоплі в культурі *in vitro*.*

Ключові слова: *in vitro*, кукурудзяний крохмаль, картопляний крохмаль, пшеничний крохмаль, агар, живильне середовище.

У сучасних умовах сільськогосподарського виробництва насінництво картоплі вимагає прискореного розмноження нових сортів на основі насіння високих категорій. Значним резервом для формування високопродуктивного насіння є використання оздоровленого *in vitro* вихідного матеріалу та використання різних методів прискореного розмноження. У практиці зарекомендувала себе технологія клонального мікророзмноження картоплі на основі культивування мериклональних рослин на живильних середовищах *in vitro*. Штучні живильні середовища для культивування *in vitro* рослинних клітин, тканин та органів є багатокомпонентними сумішами, які містять мінеральні та органічні сполуки різної хімічної природи. Вони забезпечують об'єкти, що культивуються, трофічними і фізіологічно активними речовинами на тлі оптимального потенціалу рН [1; 2].

Найчастіше у культурі *in vitro* картоплі використовують щільні живильні середовища, виготовлені на основі агару — суміші високомолекулярних полісахаридів з екстрактів декількох різновидів червоних водоростей, який складається із двох полісахаридів — агарози і агаропектину. Використову-

ється для загущування рідких живильних середовищ, надаючи їм желеподібного стану. В агарі можуть міститися хлориди, сульфати, йони Кальцію, Магнію та Феруму. Концентрація домішок змінюється залежно від джерела морських водоростей і методу виробництва агару. У продажу є очищені агари, які цілком придатні для культури тканини рослин. Виготовляють агар за кордоном, а із країн ближнього зарубіжжя — в Прибалтиці та Росії (з усіх країн близького зарубіжжя тільки в цих країнах є необхідні для його виробництва ресурси сировини). Вартість агару, що ввозиться в Україну, дуже висока, а агароїд, що виробляється в Україні, суттєво відрізняється від агару за хімічним складом і не придатний для застосування в культурі *in vitro* [3; 4].

У світовій практиці відомі дослідження по заміні агару на інші желеуючі компоненти, оскільки собівартість середовищ із заміниками агару значно нижча, ніж агаровмісних. За даними М. Т. Упадишевого, використання гомополісахариду для заміни агару забезпечувало підвищення коефіцієнту розмноження в 1,2–2,3 рази та виходу пагонів — у 1,9–6,9 разів [5].

Бразильські дослідники при клональному мікророзмноженні стреліції (*Strelitzia reginae*) використовували такі желюючі матеріали як агароза, фітогель (Phytigel). Кращі результати отримали за використання фітогелю [6; 7].

Як свідчать літературні джерела, використання ДДКамоду значно покращувало регенерацію рослин при клональному мікророзмноженні деяких овочевих культур [8]. О. В. Білинською встановлено, що заміна агару на ДДКамод діє позитивно на розвиток рослин-регенерантів за рахунок зниження їх вітрифікації, а також стимулює утворення андрогенних структур і рослин-регенерантів у культурі пильників *in vitro* ячменю ярого [9–11].

З огляду на вищевикладене, метою наших досліджень було встановлення можливості використання крохмалів як желеутворюючого компонента середовищ при клональному мікророзмноженні картоплі та оцінка їх впливу на показники приживлюваності та розвитку картоплі в культурі *in vitro*.

**Матеріали і методи.** Дослідження з підбору нових желюючих компонентів проводили в лабораторії біотехнології сільськогосподарських культур Української науково-дослідної станції карантину рослин ІЗР НААН упродовж 2015–2016 рр. в стерильних умовах згідно загальноприйнятих методик за прописом Калініна [12; 13]. Мікроживці культивували на середовищі Мурасіге-Скуга [14] на основі крохмалів (кукурудзяного, картопляного, пшеничного) з концентрацією від 50 г/л до 150 г/л. Контролем слугувало середовище з агаром (8 г/л). Концентрацію крохмалів встановлювали експериментальним шляхом у процесі проведення досліджень. Усі живильні середовища стерилізували шляхом автоклавування під тиском 1 атм. упродовж 15–20 хв., роботу проводили у стерильних умовах ламінарного боксу. При цьому використовували сорти картоплі української селекції: Слов'янка, Поліська рожева. Після висаджування пробірки з рослинами картоплі переносили у культуральну кімнату і вирощували за температури повітря 22–24 °С, відносній вологості 60–80 %, освітленні 4 клк, світловому періоді 16 годин. Після того, як регенеранти утворювали 5–6 вузлів, їх знову живцювали і процес регенерації повторювали. Усі дослідні проводили у трьох

повтореннях по 20 рослин у кожному. У процесі досліджень проводили візуальні спостереження за розвитком живців, періодом ризогенезу (початок утворення коренів, доба) та біометричні обліки розвитку. Спостереження і обробку експериментальних даних проводили через кожні півтора місяці.

**Результати та обговорення.** Оптимальною концентрацією крохмалів для культивування клональних мікророслин картоплі виявилася концентрація 80 г/л. За умов застосування більш високих концентрацій утворювались доволі щільні середовища, що ускладнювало процес висаджування мікроживців, до того ж частина їх ламалася і вибраковувалась. У той же час, середовище з концентрацією крохмалю 50 г/л виявилось рідким і не забезпечувало фіксування мікроживців, що робило його не придатним для використання при клональному мікророзмноженні.

Встановлено, що для досягнення високого рівня приживлюваності найкращим було живильне середовище Мурасіге-Скуга модифіковане кукурудзяним крохмалем, яке сприяло збереженню більшої кількості життєздатних рослин мікроживців картоплі в культурі *in vitro* (рис. 1).

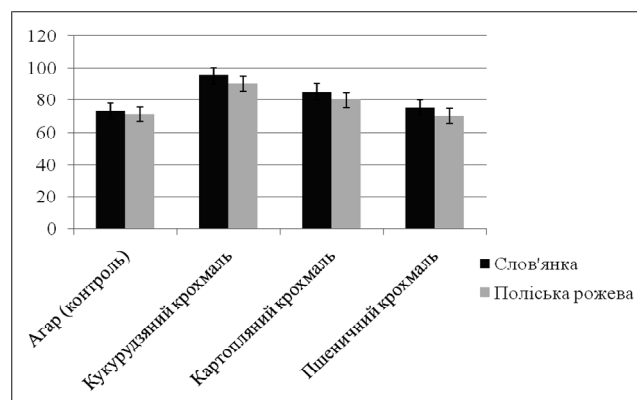


Рис. 1. Приживлюваність клональних мікророслин картоплі в культурі *in vitro* на різних видах крохмалю.

Так, кількість клональних мікророслин сорту Слов'янка, придатних для подальшого розмноження, становила 95 %, для сорту Поліська рожева, відповідно — 90 %. На живильних середовищах з картопляним та пшеничним крохмалем кількість життєздатних рослин складала 80–85 % у сорту Слов'янка та 70–75 % у сорту Поліська рожева. У варіантах із застосуванням агару кількість жит-

тездатних мікроклонів була на рівні 71–73 %. Розвиток живців на середовищах з крохмалю перші тижні після висаджування відбувався швидше, ніж на контрольних середовищах з агаром. Так, якщо в контролі початок розвитку спостерігався на 5–10-у добу, то на експериментальному кукурудзяному середовищі — на 3–7-у добу (табл. 1).

На середовищі з агаром відбувалася затримка розвитку кореневої системи порівняно із середовищами з желюючими агентами. Якщо на середовищах з кукурудзяним крохмалю початок ризогенезу у мікроживців картоплі спостерігався на 3–7-у добу після висаджування, то на середовищах з агаром — тільки на 6–9-у добу. У процесі культивування розвиток мікроживців, придатних для подальшого розмноження, на середовищах з крохмалю прискорювався.

При аналізі біометричних показників відмічено пряму їх залежність від типу живильного середовища, на якому культивували рослини (рис. 2).

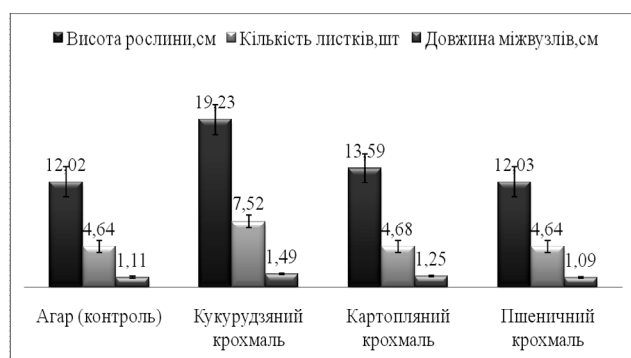


Рис. 2. Біометричні показники розвитку рослин картоплі сорту Слов'янка на живильному середовищі із різними желюючими речовинами.

Найвищі клональні мікророслини сорту Слов'янка формувалися на живильному середовищі з желюванням кукурудзяним крохмалю: висота зеленого приросту дорівнювала 19,23 см, що на 7,21 см більше, ніж мінімальне значення на середовищі з агаром. За довжиною міжвузлів на основному пагоні між мікророслинами, які культивували на живильних середовищах з кукурудзяним, картопляним та пшеничним агаром, вірогідної різниці не було.

Виходячи з результатів проведених досліджень, можна зробити висновок, що за рахунок використання кукурудзяного крохмалю як желеутворювача замість агару відбувається підвищення якості клональних мікророслин картоплі та здешевлення технології, оскільки у стандартній технології за використання агару на 1 л живильного середовища витрачається 8 г агару вартістю 9,12 грн. У розробленій нами технології можливе використання крохмалю, за якого на 1 л витрачається 80 г крохмалю вартістю 1,6 грн. Таким чином, відбувається п'ятикратне здешевлення технології за рахунок використання економічної схеми витрат (9,12 грн. / 1,6 грн. = 5,6).

1. Кушнір Г. П. Мікроклональне розмноження рослин / Г. П. Кушнір, В. В. Сарнацька. — К. : Наукова думка, 2005. — 528 с.

2. Оздоровлення сортів картоплі методом культури апікальних меристем : методичні рекомендації / [Т. М. Олійник, К. А. Слободян, О. О. Шевченко та ін.] ; Ін-т картоплярства НААН. — Немішаєве : КВЦ, 2012. — 28 с.

3. Біотехнологія / Мельничук М. Д., Кляченко О. Л., Коломієць Ю. В., Антіпов І. А. — К. : Аграр Медіа Груп, 2013. — 350 с.

Таблиця 1. Вплив крохмалів на ініціацію стебло- і ризогенезу у мікроживців картоплі в культурі *in vitro*

Сорти картоплі	Желюючі агенти							
	агар (контроль)		кукурудзяний крохмаль		картопляний крохмаль		пшеничний крохмаль	
	Початок, доба							
	стеблогенезу	ризогенезу	стеблогенезу	ризогенезу	стеблогенезу	ризогенезу	стеблогенезу	ризогенезу
Слов'янка	5–6	6–9	3–5	3–7	4–5	7–8	4–5	7–9
Поліська рожева	6–7	7–8	4–5	6–7	5–6	6–7	6–7	7–8

4. Теслюк Н. І. Використання нового желюющего компонента для винограду в культурі *in vitro* / Н. І. Теслюк // Аграрний вісник Причорномор'я. Біологічні та с/г науки. — 2005. — Вип. 29. — С. 141–143.

5. Упадышев Т. М. Оздоровление и размножение нетрадиционных ягодных и плодовых культур / Т. М. Упадышев // Садоводство и виноградарство. — 1996. — № 4. — С. 15–17.

6. Gonzães M. Analysis of anther culture response in hexaploid triticale / M. Gonzães, I. Fernandes, N. Jouve // Plant Breeding. — 1997. — Vol. 116. — P. 302–304.

7. Duarte de Oliveira P. P. Controle de oxidação no cultivo *in vitro* de embriões de estrelícia (*Strelitzia reginae*) / P. P. Duarte de Oliveira, P. Renato, P. Moacir. // Rev. bras. horticult. ornam. — 2007. — Vol. 13, № 2. — P. 107–112.

8. Белинская Е. В. Модифицированный крахмал как компонент питательной среды для получения гаплоидов ячменя в культуре пыльников *in vitro* / Е. В. Белинская, П. Г. Дульнев // Физиология и биохимия культурных растений. — 2007. — Т. 39, № 2. — С. 136–143.

9. Белинская Е. В. Особенности морфогенеза в культуре *in vitro* пыльников ячменя на средах с химически модифицированными крахмалами / Е. В. Белинская, П. Г. Дульнев // Физиология и биохимия культурных растений. —

2012. — Т. 44, № 5. — С. 440–448.

10. Білінська О. В. Застосування кукурудзяних крохмалів з підвищеним вмістом амілози (мутації *ae* і *su2*) у складі штучного живильного середовища для одержання гаплоїдів ярого ячменю у культурі пиляків *in vitro* / О. В. Білінська // Вісник Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна. Серія: біологія. — 2010. — Вип. 11 (№ 905). — С. 60–65.

11. Гончарова С. А. Вивчення впливу заміників агар-агару на гідратацію тканин у рослин-регенерантів колекційних сортозразків огірка / С. А. Гончарова // Генетичні ресурси рослин. — 2004. — № 1. — С. 47–50.

12. Калинин Ф. Л. Технология микроклонального размножения растений. / Ф. Л. Калинин, Г. П. Кушнир, В. В. Саринацкая. — К.: Наук. думка, 1992. — 290 с.

13. Мельник П. О. Оптимізація середовища для культивування рослин картоплі / П. О. Мельник, Г. М. Шевага // Актуальные проблемы иммунитета и защиты сельскохозяйственных культур от болезней и вредителей: тез. докл. междунар. научно-практич. конференции (11–14 сентября 2007 г.). — Одесса, 2007. — С. 53.

14. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Planta. — 1983. — № 157 — P. 385–391.

## ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ЖЕЛИРУЮЩИХ АГЕНТОВ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ МИКРОРАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ, ПОЛУЧЕННЫХ *IN VITRO*

Г. Н. Шевага<sup>1</sup>, Н. Н. Кирик<sup>2</sup>,  
В. М. Гунчак<sup>1</sup>, Т. Н. Олейник<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Украинская научно-исследовательская станция карантина растений ИЗР НААН, с. Бояны

<sup>2</sup>Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев

<sup>3</sup>Институт картофелеводства НААН, пгт Немешаево

Приведены результаты исследований по оптимизации питательной среды Мурасиге-Скуга модифицированного кукурузным крахмалом для ускоренного клонального микро-размножения растений картофеля. Установлено, что модификация метода улучшает показатели приживаемости, способствует их активному росту и развитию черенков картофеля в культуре *in vitro*.

Ключевые слова: *in vitro*, кукурузный крахмал, картофельный крахмал, пшеничный крахмал, агар, питательная среда.

## THE OPTIMIZATION OF JELLIFYING AGENT COMPOSITION ON REGENERATION OF *IN VITRO* OBTAINED POTATO MICROPLANTS

H. M. Shevaha<sup>1</sup>, M. M. Kyryk<sup>2</sup>,  
V. M. Hunchak<sup>1</sup>, T. M. Oliinyk<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ukrainian Research Station of Plant Quarantine, Institute of Plant Protection, NAAS, Boiany

<sup>2</sup>National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv

<sup>3</sup>Institut of Potato Planting, NAAS, Nemishaieve

Results of studies on the optimization of Murashige and Skoog culture medium with modified maize starch for the acceleration of potato plants micropropagation are provided. It has been established that the method modification increases surveillance parameters, promotes active *in vitro* growth and development of potato springs.

Key words: *in vitro*, maize starch, potato starch, wheat starch, culture medium.