

ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ КАРТОФЕЛЯ (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) ПРИ МИКРОКЛОНАЛЬНОМ РАЗМНОЖЕНИИ

Е.В. МАМОНОВ

(Кафедра селекции и семеноводства овощных, плодовых и декоративных культур)

Проведены исследования частоты и характера мутаций у клонов картофеля сорта Луговской, полученных из мини клубней и стеблевых черенков. Показано, что при микроклональном размножении картофеля происходят различные типы мутаций, влияющие на посевные и сортовые качества. Общая частота мутаций в 1-м клубневом поколении достигает  $2,4 \cdot 10^{-4}$ — $6,0 \cdot 10^{-4}$ . Частота отрицательных мутаций составляет  $2,4 \cdot 10^{-4}$ — $4,0 \cdot 10^{-4}$ .

Способы размножения картофеля на безвирусной основе предусматривают ряд обязательных мероприятий, связанных с воздействием на организм химических веществ в различных концентрациях и сочетаниях. Так, регенерация растений из меристем происходит на питательной среде, состоящей из различных ингредиентов: минеральные соли макро- и микроэлементов, витамины, органические вещества, регуляторы роста с повышенным содержанием кинетина. Выращивание регенерантов проводится на модифицированной среде Мурасиге-Скуга с добавлением ауксина для ускорения роста и укоренения. Размножение регенерантов также происходит на модифицированных питательных средах. Дальнейшее размножение осуществляется на почвенных субстратах или на гидропонных установках, где используется минеральная среда с добавлением различных регуляторов роста.

Исследования, проведенные И.И. Ланевой [5], показывают, что при оздоровлении сортов картофеля, отборе меристемных линий и поддержании их методом последовательных черенкований в стерильной культуре *in vitro* в значительной степени происходят генетические и модификационные изме-

нения у растений по сортовым и хозяйственным признакам.

При культивировании *in vitro* клеток, тканей и органов растений получено большое количество клонов с измененными признаками, передающимися в последующих генерациях. Такой тип изменчивости является генотипическим. Природа ее окончательно не выяснена. Проведенные в этом направлении исследования показывают, что причиной генотипической изменчивости может служить высокая гетерозиготность тетраплоидного картофеля, которая проявляется в его генетической нестабильности, хромосомных нарушениях при митотических делениях клеток *in vitro*, в нарушениях репликации ДНК [8, 11, 15].

Культура клеток картофеля на питательной среде характеризуется генетической нестабильностью и способствует созданию генетического многообразия [2, 7, 16]. Важным механизмом генетической изменчивости в культуре *in vitro* является соматический кроссинговер [3].

Процесс культивирования клеток и тканей на искусственных питательных средах обычно сопровождается различными аномалиями митоза, что приводит к возникновению значительного

цитогенетического разнообразия в популяциях каллусных клеток [13]. Установлена изменчивость на хромосомном уровне и у регенерантов: хромосомные транслокации, делеции, изменения ploидности и т.п. [10, 17].

Наиболее ценную группу генотипической изменчивости составляют мутации, характеризующиеся хозяйственно ценными признаками. Обнаружена высокая степень разнообразия мутаций картофеля по морфологии и окраске листьев, урожайности, форме и окраске клубней, срокам созревания, содержанию в клубнях протеина и крахмала, фертильности и семенной продуктивности, устойчивости к раку и некоторым вирусам [9, 10, 14].

Одни исследователи рассматривают генотипическую изменчивость как результат спонтанных мутаций, возникающих и накапливающихся в клетках вегетативно размножаемых растений картофеля, то есть уже существующих в клетках тканей листа и реализующихся затем в регенерантах [18]. Другие считают, что такая изменчивость возникает в процессе культивирования *in vitro* [17]. Подтверждением этому служит и широкий спектр изменчивости среди регенерантов картофеля, возникших из одного протопласта [19].

Проявлению мутаций в культуре *in vitro* могут способствовать самые разнообразные причины: трофические и гормональные факторы питательной среды, в частности, ее несбалансированный состав, продукты метаболизма, шок, вызываемый условиями культуры ткани, отсутствие организменного, органного и тканевого контроля [1].

При культивировании клеток на искусственных питательных средах, содержащих экзогенные фитогормоны, значительно нарушается гормональный баланс, вследствие чего может возникнуть морфологическая и цитогенетическая разнокачественность клеточных популяций [4]. Одной из причин цитогенетической нестабильности регенерантов считается такой трофический

фактор, как широко используемая в питательных средах сахароза [6].

Ценным качеством генотипической изменчивости служит способность постепенного накопления в каллусных клетках различных изменений, что теоретически может привести к сосредоточению в одной клетке нескольких полезных признаков. По наблюдениям Л.М.Хромовой, отобранные регенеранты чаще характеризуются лишь одним полезным признаком [12].

Таким образом, при микроклональном размножении картофеля происходят различные типы мутаций, которые в значительной степени влияют на сортовые и посевные качества картофеля. В настоящей работе показано проявление генотипической (мутационной) изменчивости хозяйственно ценных признаков картофеля 1-й полевой клубневой репродукции из растений, полученных методом микроклонального размножения.

#### Методика

Изучение частоты и характера мутаций проведено на клонах, полученных из миниклубней и стеблевых черенков картофеля сорта Луговской. Меристемные растения размножены на биотроне ФИБХ РАН (г.Пушино). Миниклубни получены от адаптированных к внешним условиям пробирочных растений, высаженных в гидропонные установки КД-10. Миниклубни диаметром 2 см высаживали 15-20 мая в весенние пленочные теплицы без верхней кровли ЗАО «Дашковка» по схеме 60 x 15 см.

Уход за растениями осуществлялся в соответствии с агротехническими требованиями, предъявляемыми к семеноводческим посадкам. Пространственная изоляция составляла не менее 1000 м. Для борьбы с насекомыми использовали препарат децис. Обработку растений проводили каждые 10 дней из расчета 250 мл на 1га.

Стеблевые черенки выращивали на модифицированной гидропонной установке Минивит. Хорошо укоренённую

рассаду с 3 листьями высаживали в пленочные теплицы без верхней кровли 28 мая. Уход заключался в регулярном поливе, рыхлении, окучивании, подкормке минеральными удобрениями. Для борьбы с сорняками применяли зенкор из расчета 2,0 кг/га.

Во время вегетации вели наблюдения за ростом и развитием растений.

Уборку урожая проводили в начале сентября. При этом тщательно просматривали каждый клон. Отмечали растения с отклонениями от сорта по основным визуальным признакам: форма, количество, поверхность, окраска кожуры, цвет мякоти клубня. Учитывали урожай с одного куста, среднюю массу клубней, фракционный состав. В качестве контроля использовали типичные растения картофеля сорта Луговской, полученные из суперэлитного материала.

### Результаты

Частота распознаваемых соматических мутаций у тетраплоидного картофеля при обычном семеноводстве составляет в зависимости от сорта  $10^{-5}$  и часто не оказывает существенного влияния на фенотип, что затрудняет контроль за качеством сорта. Использование микроклонального размножения картофеля приводит к увеличению мутаций в 1000 раз и они могут происходить с частотой  $10^{-2}$  и больше. Полученное при этом большое количество растений с измененными признаками может служить для селекционеров исходным материалом как для улучшения существующего, так и создания нового сорта [11].

В первичном семеноводстве с использованием микроклонального размножения на стадии лабораторных работ видимые вредные мутации, как правило, удаляются. Для дальнейшего размножения используются растения с внешне неотличимыми признаками. В наших исследованиях посадочный материал (миниклубни и рассада) не отличались от других растений. Наблюдения за ростом и развитием растений в теплицах также не выявили заметных отличительных признаков.

Проведенный клубневой анализ 10000 растений картофеля в 1-й год исследований выявил 6 клонов с резко отличающимися от основного сорта признаками (табл.1).

Три мутации оказались полезными и 3 — вредными. Общая частота мутаций составляла  $6 \cdot 10^{-4}$ , частота вредных мутаций —  $3 \cdot 10^{-4}$ , что в 10 раз больше, чем при обычном семеноводстве. Клоны с полезными мутациями отличались большей массой клубней (80-150 г), количеством клубней (до 15 шт.), выравненностью, белой окраской мякоти (табл.2). У 1-го клона окраска кожуры клубней белая, форма округлая; 2-го — белая и овальная соответственно; 3-го — розовая и овальная. Признаки сохранялись в последующих репродукциях.

Вредные мутации характеризовались большим количеством (до 63 шт.) мелких с плохим отрывом от столонов клубней разной окраски и формы. Клубни 1-го клона имели множество глубоких трещин, отличались химерными тканями кожуры белой, розовой и фиолетовой окраски.

Таблица 1

Частота мутаций у картофеля сорта Луговской

Год исследований	Посадочный материал	Объем выборки, шт.	Количество мутаций, шт.			Частота мутаций
			всего	в т. ч.		
				полезные	вредные	
1-й	Миниклубни	10000	6	3	3	$6 \cdot 10^{-4}$
2-й	Миниклубни	12300	3	0	3	$2,4 \cdot 10^{-4}$
3-й	Стеблевые черенки	5000	2	0	2	$4 \cdot 10^{-4}$

По результатам исследований, проведенных во 2-й год, из 12300 проанализированных растений обнаружены 3 мутантных клона с вредными признаками. Частота мутаций составила  $2,4 \cdot 10^{-4}$ . Все мутантные клоны отличались большим количеством (26~32 шт.) и мелкими уродливыми клубнями. По массе клубней в гнезде они отставали от контроля в 1,8-2,4 раза.

В варианте со стеблевыми черенками в контроле сформировалось 1-2 типичных для сорта клубня. Масса клубня изменялась от 40 до 90 г. Из просмотренных 5000 растений обнаружены 2 мутантные формы. Частота мутаций составила  $410^{-4}$ . У 1-го мутантного клона сформировалось в 6 раз больше клубней по сравнению с контролем. Клубни были мелкие, овальные, поверхность в трещинах. Второй мутантный клон имел много мелких уродливых клубней с желтой мякотью.

Полученные данные говорят о том, что резкие мутации, которые встре-

чаются в первичном семеноводстве с использованием микроклонального размножения, отличаются от исходного сорта по нескольким признакам. Полезные мутации отличались по массе, количеству, форме и окраске кожуры клубней; вредные — по массе, количеству, форме, поверхности, окраске кожуры и мякоти клубней (табл. 2).

Тщательный клубневый анализ 1-го полевого потомства от миниклубней и стеблевых черенков позволяет выявить клоны как с полезными мутациями, так и с вредными. Полезные мутации могут служить исходным материалом для дальнейшей селекции. Растения, имеющие отрицательные признаки, должны быть немедленно удалены.

Часто растения с вредной мутацией имеют много мелких клубней, которые по своему размеру могут быть отнесены к семенной фракции. Если не удалять такие растения, семенные посадки могут быстро выродиться. Приняв минимальный коэффициент раз-

Таблица 2

Характеристика мутантных клонов картофеля

Год	Клон	Масса, г			Клубни					
		всех клубней	из них		количество, шт.	форма	поверхность	окраска		
			max.	min.				кожуры	мякоти	
1-й		<i>Полезные мутации</i>								
	1	920	100	60	12	Окр.	Глад.	Белая	Белая	
	2	1200	90	60	15	Овал.	Глад.	Белая	Белая	
	3	950	150	70	10	Овал.	Глад.	Розовая	Белая	
		<i>Вредные мутации</i>								
	1	620	50	<10	28	Урод.	Трещины, сегменты	Белая, розовая, фиолет.	Белая	
	2	670	30	<10	63	Окр.	Глад.	Белая	Желт.	
2-й	3	420	30	<10	36	Урод.	Глад.	Белая	Белая	
	Контроль	750	140	90	7	Овал.	Глад.	Св.роз.	Белая	
		<i>Вредные мутации</i>								
	1	490	40	<10	26	Окр.	Глад.	Белая	Белая	
3-й	2	520	60	<10	32	Урод.	Глад.	Розовая	Желт.	
	3	380	30	<10	29	Урод.	Глад.	Белая	Белая	
	Контроль	910	120	90	8	Овал.	Глад.	Св.роз.	Белая	
		<i>Вредные мутации</i>								
3-й	1	95	40	<10	6	Овал.	Трещины	Розовая	Белая	
	2	80	30	<10	8	Урод.	Глад.	Белая	Желт.	
	Контроль	100	90	40	1-2	Овал.	Глад.	Св.роз.	Белая	

множения семенного картофеля за 5, а мутантного за 10, только одно растение с отрицательными признаками за 4 года размножения может образовать  $10^5$  клубней. Некоторые мутантные растения имеют коэффициент размножения 30 и даже 60.

### Выводы

1. Общая частота мутаций картофеля сорта Луговской в 1-м полевом клубневом поколении достигает  $2,4 \cdot 10^{-4}$ – $6,0 \cdot 10^{-4}$ . Частота вредных мутаций составляет  $2,4 \cdot 10^{-4}$ – $4,0 \cdot 10^{-4}$ .

2. Резкие вредные мутации характеризуются большим количеством мелких клубней, достигающих 26–63 шт. на 1 растение.

3. Растения с полезными мутациями отличаются от исходного сорта по 3–4 признакам (масса, количество, форма и окраска кожуры клубня), а с вредными — по 3–6 признакам (масса, количество, форма, поверхность, окраска кожуры, мякоти клубня).

4. Клоны с измененными положительными признаками могут быть использованы как для улучшения существующего сорта, так и для дальнейшей селекционной работы.

5. Высокая частота вредных мутаций в 1-м полевом клубневом поколении ( $10^{-4}$ ) и высокий коэффициент размножения (30–60) может привести к быстрому вырождению сорта.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Аветисов В.А.* Биотехнологические основы расширения генетического разнообразия картофеля. Автореф. докт. дис. М., 1997. С. 18–20. — 2. *Бутенко Р.Г.* Клеточные технологии в селекционном процессе // Состояние и развитие сельскохозяйственной биотехнологии. Л., 1986. С. 29–38. — 3. *Жученко А.А.* Экологическая генетика культурных растений. Кишинев: Штиинца, 1980. — 4. *Кунах В.А., Зосимович В.П.* Влияние кинетина на уровень и типы aberrаций хромосом в культуре тканей *Naplorappus gracilis* // Генетика, 1977. Т.13, № 8. С.1355–1365. — 5. *Ланева И.И.* Фено- и генотипическая изменчивость мериклонов картофеля в процессе оздоровления методом апикальной меристемы. Автореф. канд. дис. М., 1993. — 6. Мелик -

*Саркисов О.С.* Физиолого-биотехнологические аспекты безвирусного картофелеводства. Автореф. докт. дис. М., 1995. — 7. *Мусин С.М., Ланева И.И., Мусина Р.А.* К вопросу о контроле генетической стабильности сортов в системе безвирусного семеноводства картофеля: соматические мутации и варибельность мериклонов // Селекция и семеноводство картофеля. Тр. НИИКХ. М., 1992. С.73–81. — 8. *Паллилова А.Н., Павлю'сук Н.В.* Спонтанная соматическая изменчивость у картофеля и ее значение для селекции на устойчивость к вирусам // Актуальные проблемы современного картофелеводства. Минск, 1997. — 9. *Равкин А.С.* Действие ионизирующих излучений и химических мутагенов на вегетативно размножаемые растения. М.: Наука, 1981. — 10. *Сидоров В.А., Кучко А.А., Гайдук П.П., Глеба Ю.Ю.* Соматические вариации среди растений, полученных из протоклонов картофеля // Докл.АН СССР, 1985. Т.281. № 3. С.704–707. — 11. *Хромова Л.М.* Возможности соматической варибельности генотипов картофеля для улучшения сортов // Исследования по клеточной селекции картофеля. Труды НИИКХ, М, 1984. С.68–75. — 12. *Хромова Л.М.* Система ранних тестов для скрининга соматоклонов у картофеля. Биология культивируемых клеток и биотехнология: Тез.докл. Межд.конф. 2–6 авг. 1988. Новосибирск, 1988. С.255–256. — 13. *Шамина З.Б.* Особенности генетической изменчивости соматических клеток растений // Биотехнология, 1987. № 3. С.361–364. — 14. *Яковлева Г.А., Дубинин В.Л., Гончарова Н.Н.* Морфогенез в каллусной культуре картофеля и селекционная оценка регенерантов // Биология культивируемых клеток и биотехнология: Тез.докл. Межд.конф. 2–6 авг. Новосибирск, 1988. — 15. *Яшина И.М.* Перспективы использования методов культуры клеток и тканей селекции картофеля // Исследования по клеточной селекции картофеля. Тр. НИИКХ. М., 1984. С.5–13. — 16. *D Amato F.* // Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture, 1977. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. P. 343–357. — 17. *Gill B.S., Kam-Morgan L.N.W., Shepard J.F.* // J.Heredity, 1987. V.78. № 1. P.15–20. — 18. *Orton T.J.* // Iowa State J. Res. 1987.V. 61. № 4. P.481–498. — 19. *Thomas E., Bight S.W.J., Franklin J.* // Theor. and Appl. Genet. 1982. V.62. № 1. P.65–68.

### SUMMARY

The research into both frequency and mutations' character with potato clones of Lуговskaya variety obtained from minitubers and pedicellate cuttings has been done. It's shown in this article that microclonal potato propagation leads to various mutations types influencing sowing and high quality of potatoes. The general frequency of mutations in one-tuber generation reaches  $2,4 \cdot 10^{-4}$ – $6,0 \cdot 10^{-4}$ . Negative mutations frequency shows  $2,4 \cdot 10^{-4}$ – $4,0 \cdot 10^{-4}$ .