DOI: 10.31279/2222-9345-2018-7-30-138-142
УДК 635.21:631.526.32:631.17

К. Т. Етдзаева, Е. В. Овэс, З. А. Марзоев, И. С. Карданова

Etdzaeva K. T., Oves E. V., Marzoev Z. A., Kardanova I. S.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ НА ПРОЦЕСС ОБРАЗОВАНИЯ IN VITRO МИКРОКЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ

THE IMPACT OF DIFFERENT TECHNOLOGIES ON THE PROCESS OF IN VITRO FORMATION OF POTATO MICROTUBERS

Представлены результаты исследований по изучению влияния различных технологий выращивания на количество и выход микроклубней in vitro. Опыты закладывали с использованием контейнеров и пробирок различного диаметра на основе применения различных по составу питательных сред. Объектом исследований служили четыре сорта картофеля – Жуковский ранний, Удача, Невский и Волжанин. Контрольный вариант представлен пробирками 16 мм с агаризованной средой по Мурасиге – Скуга и 6 % сахарозы. Для исследований использовали два состава питательных сред: агаризованная с концентрацией сахарозы 2 % и жидкая с 8 % сахарозы. На результат клубнеобразования in vitro в большей степени влияние оказали биологические особенности изученных сортов, группа спелости не повлияла на процесс клубнеобразования. Высокой способностью к образованию микроклубней характеризовались сорта Жуковский ранний и Волжанин. В вариантах с применением пробирочной технологии они сформировали от 1,2 до 1,6 шт. на растение. Наибольший выход микроклубней отмечен при использовании пробирочной технологии и двух составов питательных сред: агаризованная среда Мурасиге – Скуга с добавлением в период формирования 4–6 междоузлий жидкой среды с высоким содержанием сахарозы (8 %). Применение данного элемента технологии в период, когда органогенез растений в культуре in vitro сформирован, способствует индукции клубнеобразования. По результатам проведенных исследований коэффициент размножения исследуемых сортов увеличился в 1,2–1,6 раза. Важным фактором при выращивании микроклубней остается выход стандартной фракции. По этому показателю у изученных сортов отмечен дифференцированный подход к применяемым технологиям. Для сортов Невский и Удача наибольший выход стандартной фракции получен в вариантах пробирочной культуры – 81–87 %. У сортов Жуковский ранний и Волжанин не зависимо от применяемой технологии выход стандартного материала составил 78–91 %.

The article presents the results of studies on the influence of the technology of cultivation of microtubers on the amount and yield of the standard fraction. Experiment with the use of vessels of different volumes was laid on in vitro material of potato varieties Zhukovsky, Udacha, Nevsky and Volzhanin. For the experiment we used tubes with a diameter of 16 and 25 mm and plastic containers 18x18 cm. The standard version is represented by 16 mm tubes with Murasig Skog agar medium and 6 % sucrose, the variants studied included two nutrient medium compositions: agarized with a sucrose concentration of 2 % and liquid with a sucrose concentration of 8 %. In the case of cuttings, an agarized medium was used, after the formation of 4 cuttings, a liquid nutrient medium was added to the vessels. The element of technology, including the addition of a liquid nutrient medium, positively influenced the process of microtuber formation. In a standard version, ontogeny in vitro was 125–130 days, in variants with the addition of a liquid nutrient medium – 95–110 days. Accelerated morphogenesis was noted in the varieties Zhukovsky and Nevsky. High rates of microtuber formation were noted in varieties Volzhanin and Zhukovsky. In versions with the use of tube technology, they formed from 1.2 to 1.6 pcs. The formation of standard tubers marked a differentiated approach of varieties to the technologies used. For the Nevsky and Udacha varieties the most common tubers are noted when using test tubes – 81–87 %. In the Zhukovsky variety, according to all technologies, the standard tubers were 84–91 %. The formation of standard tubers in the Volzhanin variety was 78 %. According to statistical processing, Volzhanin did not exceed the standard sample. Early ripeness of varieties had no effect on the process of tuber formation in vitro. Varietal and biological features affected the result of the experiment.

Ключевые слова: картофель, сорт, культура in vitro, питательная среда, микрорастения, микроклубни, технология.

Key words: potato, variety, in vitro culture, medium nutrient, microplants, microtubers, technology.

Етдзаева Кристина Таймуразовна –
биотехнолог лаборатории клонального
микроразмножения
ООО «ФАТ-АГРО»
г. Владикавказ
Тел.: 8-988-875-04-75
E-mail: kristina87etdzaeva@mail.ru

Etdzaeva Kristina Taimyrazovna –
Biotechnologist of Laboratory
of Clonal Micropropagation
LLC «Fat-Agro»
Vladikavkaz
Tel.: 8-988-875-04-75
E-mail: kristina87etdzaeva@mail.ru

Овэс Елена Васильевна –
кандидат сельскохозяйственных наук,
заместитель директора по научной работе
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский
институт картофельного хозяйства имени А. Г. Лорха»
пос. Красково Люберецкого района
Московской области
Тел.: 8-926-153-73-08
E-mail: oveselena@mail.ru

Oves Elena Vasilievna –
Ph.D of Agricultural Sciences,
Deputy Director for scientific Work
FSBSI «All-Russian Research Institute
of Potato Economy named after A. G. Lorkh»
Kraskovo Lyuberetskiy region
Moskovskaya oblast'
Tel.: 8-926-153-73-08
E-mail: oveselena@mail.ru

Марзоев Заурбек Асламбекович –
директор

Marzoev Zaur Aslambekovich –
Director

ООО «ФАТ-АГРО»
г. Владикавказ
Тел.: 8(8672)24-13-93
E-mail: fatagro@mail.ru

Карданова Ирина Сергеевна –
заведующая лабораторией клонального
микроразмножения
ООО «ФАТ-АГРО»
г. Владикавказ
Тел.: 8-918-826-92-98
E-mail: k.irinka88@mail.ru

LLC «Fat-Agro»
Vladikavkaz
Tel.: 8(8672)24-13-93
E-mail: fatagro@mail.ru

Kardanova Irina Sergeevna –
Head of Laboratory of Clonal Micropropagation
LLC «Fat-Agro»
Vladikavkaz
Tel.: 8-918-826-92-98
E-mail: k.irinka88@mail.ru

Способность картофеля образовывать микроклубни имеет важное биологическое и сельскохозяйственное значение. В качестве биоресурса микроклубни позволяют обеспечить сохранность сортов картофеля в генетических коллекциях, а в сельском хозяйстве используются в качестве исходного материала для ведения оригинального семеноводства [1, 2]. Преимущество выращивания микроклубней заключается в отсутствии сезонности, возможности их длительного хранения и высокой практичности при транспортировке и посадке [3, 4].

Применение в составе питательной среды высоких концентраций сахарозы способствует интенсивному столонообразованию, однако использование данного органического вещества в большом количестве в составе питательной среды является не столь благоприятным фактором для морфогенеза *in vitro* [5, 6]. В исследованиях F. Mani [7] наибольший выход микроклубней отмечен в варианте с добавлением в питательную среду 80 г/л сахарозы. В работе М. К. Кокшаровой [5] отражен избирательный подход исследуемых сортов к различным концентрациям сахарозы. Норвежским ученым С. А. Lillo [8] была разработана двухфазная система получения микроклубней, включающая культивирование черенков на агаризованной среде, с последующим добавлением жидкой среды МС, с содержанием 10 % сахарозы. Позже С. L. Lê [3] и J. Gopal [1] доказали, что при увеличении концентрации сахарозы выше 8 % количественный выход микроклубней растёт, но уменьшаются их размерные характеристики.

В настоящее время для получения микроклубней все большее применение обретают пластиковые сосуды. Они удобны для проведения работ в культуре ткани, и главным их преимуществом является возможность проведения различных манипуляций в период онтогенеза растений, к которым относятся как обмен питательной среды в различные фазы роста и развития, так и создание стрессовых условий в период образования столонов.

Целью проведенных исследований является изучение элементов технологии выращивания микроклубней, способствующих увеличению коэффициента размножения и выхода стандартной фракции в асептических условиях.

Исследования проводили в 2014–2017 гг. в лаборатории клонального микроразмножения компании ООО «Фат-Агро» Республика Северная Осетия–Алания. Объектом исследований являлись раннеспелые сорта Жуковский ранний и Удача и среднеранние Невский и Волжанин. Для закладки эксперимента использовали сосуды различного объема: пробирки диаметром 16 и 25 мм, пластиковые контейнеры размером 18х18 см. В каждом сосуде соответственно разливали по 6, 10 и 400 мл питательной среды. Для исследований использовали минеральный состав Мурасиге – Скуга и два состава питательных сред: агаризованную с концентрацией сахарозы 2 % и жидкую с содержанием 8 % сахарозы. При черенковании использовали агаризованную среду, в пробирке размещали по одному черенку, в контейнере их количество составляло 40 шт. Экспланты культивировали при температуре +20...22 °С и 16-часовом фотопериоде в условиях фитотрона. При формировании регенерантов с 4 междоузлий в асептических условиях открывали сосуды и заливали в них жидкую питательную среду. После данной процедуры сосуды поддерживали в течение двух недель в специализированном инкубаторе при 8-часовом фотопериоде и +20 °С, в отсутствие освещения – при +12 °С. В качестве контрольного варианта в эксперименте использовали традиционный метод получения микроклубней – пробирки Ø 16 мм с агаризованной средой и 6 % сахарозы. Формирование микроклубней происходило в хорошо проветриваемом помещении в условиях непрерывной темноты. Уборку проводили по мере высыхания биомассы растений с определением фракционного состава микроклубней: стандартный (более 8 мм) и нестандартный (менее 8 мм). Опыт закладывали в 4-кратной повторности по 40 микрорастений.

Онтогенез картофеля *in vitro* зависит от многих факторов, но одним из самых важных является создание благоприятных условий в помещении для роста растений (фитотрон). Соблюдение параметров искусственного поддержания микроклимата способствует интенсивному формированию морфологических структур и получению регенерантов, соответствующих стандартным нормативным требованиям. По результатам проведенного эксперимента рост и развитие эксплантов зависели от сортовых особенностей и технологии получения *in vitro* микроклубней. Формирование 4 междоуз-

лий в вариантах с добавлением 2 % сахарозы происходило за 20–37 дней. Интенсивным ростом характеризовался сорт Жуковский ранний, средние показатели морфогенеза отмечены у сортов Невский и Волжанин, более поздние – у сорта Удача. В контрольном варианте период регенерации растений составил 38–60 дней. Характерной особенностью для растений контрольного варианта являлось формирование низкорослых регенерантов. Особенно ярко данное явление наблюдалось на сорте Удача (табл. 1). Изучение влияния фактора сорта исследуемых вариантов показывает, что в среднем регенерация сорта Жуковский ранний произошла за 26 дней, сортов Невский и Волжанин – за 31–32 дня и сорта Удача – за 39 дней. Полученные результаты указывают, что группа спелости исследуемых образцов не оказала влияния на регенерационный период.

Инициация столонов и их ветвление зависят от биологических особенностей сортов и состава питательной среды. У изученных образцов в контрольном варианте образование столонов наблюдали раньше, чем микрорастения достигали стандартных параметров. Таким образом, если сорт Удача сформировал 4 междоузлия за 60 дней, то образование столонов отмечено на 45-й день. Аналогичная закономерность присутствовала и у остальных сортообразцов. Применение элемента в технологии с добавлением жидкой среды способствовало увеличению периода образования столонов на 5–15 дней, но полученные регенеранты характеризовались лучшими показателями формообразования, чем в контрольном варианте.

Период формирования микроклубней находился в прямой зависимости от технологии получения *in vitro* материала и сортовых особенностей. Растения контрольного варианта сформировали микроклубни за 125–130 дней. В вариантах с добавлением жидкой питательной среды данный период составил 95–110 дней. Сокращение онтогенеза растений в исследуемых вариантах объясняется усиленным оттоком питательных веществ в результате присутствия высокой концентрации углевода и искусственно созданных стрессовых условий, связанных с размещением сосудов в полной темноте.

Эффективность применения различных методов получения *in vitro* материала оценивают по коэффициенту размножения. Значительное влияние на способность микроклубней в культуре *in vitro* оказывают сортовые особенности. Проведение сравнительной оценки среди исследуемых образцов позволило выявить их предрасположенность к клубнеобразованию *in vitro*. Среди исследуемых вариантов лучший коэффициент размножения отмечен на сорте Волжанин (1,2–1,6 ед.). Высоким показателем характеризовались сорта Жуковский ранний и Невский (1,1–1,4 ед.). Низкий уровень формирования микроклубней отмечен у сорта Удача (0,9–1,1 ед.) (табл. 2).

Согласно полученным результатам исследований С. Л. Lê [3] и Ф. Т. Гериевой [9] использование контейнеров в процессе выращивания микроклубней позволяет увеличить коэффициент размножения и выход стандартной фракции. В наших наблюдениях лучшие результаты были получены при использовании пробирочной культуры.

Таблица 1 – Онтогенез растений в культуре *in vitro*, дней от посадки

Сорт	Вариант	Фаза образования 4 междоузлий	Формирование	
			столонов	микроклубней
Удача	Пробирки Ø 16 мм, 6 % – контроль	60	45	125
	Пробирки Ø 16 мм, 2 % + 8 %	30	55	110
	Пробирки Ø 25 мм, 2 % + 8 %	30	50	120
	Контейнеры, 2 % + 8 %	37	50	120
Жуковский ранний	Пробирки Ø 16 мм, 6 % – контроль	38	25	125
	Пробирки Ø 16 мм, 2 % + 8 %	23	40	110
	Пробирки Ø 25 мм, 2 % + 8 %	20	35	105
	Контейнеры, 2 % + 8 %	25	35	95
Невский	Пробирки Ø 16 мм, 6 % – контроль	42	30	125
	Пробирки Ø 16 мм, 2 % + 8 %	29	45	105
	Пробирки Ø 25 мм, 2 % + 8 %	25	45	105
	Контейнеры, 2 % + 8 %	27	40	95
Волжанин	Пробирки Ø 16 мм, 6 % – контроль	45	30	125
	Пробирки Ø 16 мм, 2 % + 8 %	29	45	105
	Пробирки Ø 25 мм, 2 % + 8 %	27	40	110
	Контейнеры, 2 % + 8 %	27	40	100

Выращивание микрорастений на агаризованной среде с содержанием сахарозы 2 % способствует формированию хорошо развитых регенерантов. Последующее добавление высокой концентрации сахарозы (8 %) показало достоверную прибавку по количеству сформированных микроклубней. В среднем в вариантах пробирочной технологии с применением двух составов питательных сред было получено от 1,1 до 1,6 микроклубня. Высокими показателями образования микроклубней характеризовались сорта Волжанин, Жуковский ранний и Невский.

Главным критерием оценки урожая *in vitro* микроклубней является его соответствие нормативным требованиям стандарта в отношении размерных характеристик. Анализ полученных результатов отражает присутствие дифференцированного подхода исследуемых сортообразцов к применяемым технологиям получения микроклубней. Высокий выход стандартной фракции отмечен у сорта Жуковский ранний. Его превышение по отношению к контрольному варианту составило от 26 до 36 % не зависимо от применяемой технологии. Для сортов Невский и Удача наибольший выход стандартной фракции отмечен в вариантах с применением пробирочной культуры, превышение контроля составило 22–28 %. В то же время у сорта Волжанин присутствующее увеличение контрольного варианта на 19–20 % является статистически не доказуемым.

Обобщение полученных данных позволяет отметить избирательный подход исследуемых сортообразцов к применяемым технологиям клубнеобразования *in vitro*. Инициация столонов и формирование микроклубней не зависе-

ли от группы спелости. Несмотря на высокий коэффициент размножения у сорта Волжанин (1,2–1,6 шт.) ни один из исследуемых вариантов достоверно не выделился по выходу стандартной фракции. Сорт Жуковский ранний по количеству сформированных микроклубней немного уступил сорту Волжанин (1,2–1,4 шт.), но по показателям стандартной фракции превысил контроль во всех исследуемых вариантах опыта на 26–37 %. У сорта Невский самые лучшие результаты по количественному составу отмечены в вариантах с применением контейнеров и пробирок Ø 25 мм – 1,3 шт. Однако достоверное превышение на 22 % по выходу стандартной фракции отмечено только по пробирочной технологии. Несмотря на низкую предрасположенность сорта Удача к микроклубнеобразованию, у данного сорта присутствует четкое предпочтение применения пробирочной культуры. В данных вариантах сорт сформировал по 1,1 микроклубня и превысил контрольный вариант по выходу стандарта на 22–26 %.

Сравнительный анализ полученных результатов позволяет отметить, что в изученных вариантах на микроклубнеобразование *in vitro* в равной степени оказали влияние и сортовые особенности, и технология получения микроклубней. Однако наибольший выход микроклубней отмечен при использовании пробирочной технологии. Применение элемента технологии с добавлением жидкой питательной среды с высокой концентрацией сахарозы способствовало индукции клубнеобразования и увеличению выхода стандартной фракции у исследуемых сортов картофеля.

Таблица 2 – Формирование микроклубней при разных технологиях

Сорт	Вариант	Количество клубней, шт.		Выход стандартной фракции, %
		всего	на 1 растение	
Удача	Пробирки Ø 16 мм, 6 % – контроль	116	0,7	58,3
	Пробирки Ø 16 мм, 2 % + 8 %	178	1,1	80,8
	Пробирки Ø 25 мм, 2 % + 8 %	176	1,1	84,4
	Контейнеры, 2 % + 8 %	145	0,9	64,8
Жуковский ранний	Пробирки Ø 16 мм, 6 % – контроль	162	1,0	54,1
	Пробирки Ø 16 мм, 2 % + 8 %	225	1,4	90,7
	Пробирки Ø 25 мм, 2 % + 8 %	198	1,2	80,5
	Контейнеры, 2 % + 8 %	193	1,2	84,2
Невский	Пробирки Ø 16 мм, 6 % – контроль	146	0,9	59,5
	Пробирки Ø 16 мм, 2 % + 8 %	177	1,1	87,1
	Пробирки Ø 25 мм, 2 % + 8 %	210	1,3	81,5
	Контейнеры, 2 % + 8 %	207	1,3	67,0
Волжанин	Пробирки Ø 16 мм, 6 % – контроль	165	1,0	57,3
	Пробирки Ø 16 мм, 2 % + 8 %	220	1,4	64,5
	Пробирки Ø 25 мм, 2 % + 8 %	260	1,6	76,6
	Контейнеры, 2 % + 8 %	194	1,2	77,7
	НСР _{0,5}		0,18	21,15

На основе интерпретации полученных данных для выращивания исходного материала картофеля в оригинальном семеноводстве рекомендуется применение пробирочной технологии с использованием двух составов пи-

тательных сред: первый – агаризованный с содержанием 2 % сахарозы и второй – при формировании растениями 4–6 междоузлий добавление жидкой питательной среды с содержанием 8 % сахарозы.

Литература

1. Gopal J., Chamail A., Sarkar D. In vitro production of microtubers for conservation of potato germplasm: effect of genotype, abscisic acid, and sucrose // *In Vitro Cellular Developmental Biology*. 2004. 40(5). P. 485–490.
2. Rahman M. H., Haider S. A., Hossain M., Islam R. Involvement of jasmonic acid and light periods on potato microtuber growth response // *International Journal of Biosciences*. 2013. Vol. 3 (5). P. 87–94.
3. Lê C. L. In vitro microtuberization: an evaluation of culture conditions for the production of virus-free seed potatoes // *Potato Research*. 1999. 42. P. 489–498.
4. Wrobel S. Assessment of potato microtuber and in vitro plantlet seed multiplication in field conditions – Growth, development and yield // *Field crops research*. 2015. 178. P. 26–33.
5. Кокшарова М. К., Лепп Ф. Р., Келик Л. А. Влияние сахарозы и регуляторов роста на индукцию образования микроклубней картофеля в культуре in vitro // *Вестник биотехнологии*. 2017. № 1(11). С. 12.
6. Jin H., Liu J., Song J., Xie C. H. Impact of Plant Density on the Formation of Potato Minutubers Derived from Microtuber-sand Tip-Cuttings in Plastic Houses // *Journal of Integrative Agriculture*. 2013. 12 (6). P. 1008–1017.
7. Mani F., Mhamdi M., Bettaieb T., Hannachi C. Shoot regeneration, micropropagation and microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars // *Journal of New Sciences*. 2014. 7 (2). 10–18.
8. Lillo C. A. Simple two-phase system for efficient in vitro tuberization in potato // *Journal of Agricultural Science: Norw.* 1989. 3 (1). P. 23–27.
9. Получение исходного клубневого материала картофеля различными способами ускоренного размножения в условиях РСО-Алания / Ф. Т. Гериева, С. С. Басиев, З. И. Ревазова, К. Т. Етдзаева // *Известия Горского ГАУ*. 2013. Т. 50, № 3. С. 67–70.

References

1. Gopal J., Chamail A., Sarkar D. In vitro production of microtubers for conservation of potato germplasm: effect of genotype, abscisic acid, and sucrose // *In Vitro Cellular Developmental Biology*. 2004. 40(5). P. 485–490.
2. Rahman M. H., Haider S. A., Hossain M., Islam R. Involvement of jasmonic acid and light periods on potato microtuber growth response // *International Journal of Biosciences*. 2013. Vol. 3 (5). P. 87–94.
3. Lê C. L. In vitro microtuberization: an evaluation of culture conditions for the production of virus-free seed potatoes // *Potato Research*. 1999. 42. P. 489–498.
4. Wrobel S. Assessment of potato microtuber and in vitro plantlet seed multiplication in field conditions – Growth, development and yield // *Field crops research*. 2015. 178. P. 26–33.
5. Koksharova M. K., Lepp F. R., Kelik L. A. Influence of sucrose and growth regulators on induction of the formation of potato microtubers in culture in vitro. *Bulletin of Biotechnology*. 2017. № 1(11). P. 12.
6. Jin H., Liu J., Song J., Xie C. H. Impact of Plant Density on the Formation of Potato Minutubers Derived from Microtuber-sand Tip-Cuttings in Plastic Houses // *Journal of Integrative Agriculture*. 2013. 12 (6). P. 1008–1017.
7. Mani F., Mhamdi M., Bettaieb T., Hannachi C. Shoot regeneration, micropropagation and microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars // *Journal of New Sciences*. 2014. 7 (2). 10–18.
8. Lillo C. A. Simple two-phase system for efficient in vitro tuberization in potato // *Journal of Agricultural Science: Norw.* 1989. 3 (1). P. 23–27.
9. Production of the initial tuber material of potato by various methods of accelerated reproduction in conditions of North Ossetia-Alania / F. T. Gerieva, S. S. Basiev, Z. I. Revazova, K. T. Yedzayeva // *Proceedings of the Gorsky State Agrarian University*. 2013. Vol. 50, № 3. P. 67–70.