

УДК 635.21:631.531.02:581

Е. В. Овэс, Н. А. Гаитова, В. В. Бойко, Н. А. Фенина
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
картофельного хозяйства имени А. Г. Лорха», пос. Красково,
Люберецкий район, Московская область, Россия
E-mail: oveselena@mail.ru

ПАРАМЕТРЫ ОЦЕНКИ МОРФОГЕНЕЗА *IN VITRO* В ПРОЦЕССЕ ТИРАЖИРОВАНИЯ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА КАРТОФЕЛЯ

РЕЗЮМЕ

В процессе тиражирования и выращивания необходимых объемов in vitro материала для оригинального семеноводства важное значение имеет период формирования морфологических структур и достижения микрорастений стандартных характеристик. Существующая методика оценки регенерации по количеству дней от момента размещения микрочеренков на новую питательную среду не позволяет осуществить плановый подход к составлению и выполнению программы клонального микроразмножения. В статье предложены новые методические подходы к проведению оценки in vitro материала картофеля по основным фазам развития растений в культуре ткани: интенсивный рост (формирование 2–3 междоузлий), замедленный рост (4–6 междоузлий) и естественное отмирание. Рекомендуются элементы по оценке регенерации in vitro проведены на основе изучения онтогенеза 15 сортов картофеля. Представленные результаты отражают дифференцированный подход сортов к формированию морфологических структур в процессе тиражирования.

Ключевые слова: картофель, *in vitro* материал, микрорастения, морфогенез, регенерация, сортовые признаки.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из главных элементов технологического процесса выращивания высококачественного семенного материала в оригинальном семеноводстве картофеля является получение исходного материала, свободного от вирусных и других инфекций. Согласно требованиям стандарта исходный материал (микрорастения, микроклубни, мини-клубни, базовые клоны), предназначенный для получения оригинального семенного картофеля, должен быть свободным, прежде всего, от вирусной, виroidной и бактериальной инфекции в скрытой форме, что должно подтверждаться результатами лабораторного тестирования с применением метода ПЦР-анализа.

Основой для планирования работ по тиражированию *in vitro* материала является приобретение сертифицированных микрорастений. Их ускоренное микроразмножение осуществляют с помощью черенкования. Размещение экспланта в виде микрочеренка на новую питательную среду способствует дифференциации клеток и образованию новых органов. Рост стебля и корней начинается на 3–4 день после посадки, а период органогенеза и коэффициент размножения зависят от биологических особенностей размножаемых сортов. Фактор сорта оказывает прямое влияние на результативность процесса клонального микроразмножения. В культуре *in vitro* сорта

картофеля растут и развиваются по-разному. Их различия заключаются не только по периоду формирования регенерантов, но и по количеству сформированных междоузлий, образования стебля и развитию корневой системы.

В процессе выполнения исследований в культуре ткани к оценке регенерации картофеля можно встретить самый разнообразный подход. В большинстве случаев морфогенез *in vitro* оценивают по истечении определенного периода от момента размещения эксплантов на новую питательную среду. В исследованиях В. Г. Дархановой и др. (2017) и Н. Н. Чернышевой (2017) приведены данные по оценке морфогенеза *in vitro* на 15 и 30 день. В практике Великолукской сельскохозяйственной академии на протяжении многих лет применяется трехуровневый способ биометрической оценки регенерантов через каждые 7 дней [9, 10]. Аналогичные подходы к оценке морфогенеза можно встретить и в других работах [1, 14]. По мнению G. A. Khadiga и др. (2015), морфогенез *in vitro* зависит от сортовых особенностей, и не все сорта способны сформировать взрослые регенеранты за 21 день.

В Кемеровском НИИСХ В. П. Ходаева (2009) и Н. А. Лапшинов и др. (2010) оценивали регенерацию *in vitro* по количеству сформированных междоузлий и высоте растений. Аналогичную оценку биоматериала в культуре ткани проводили В. Апоор (2009) и L. Koleva и др. (2012), при этом в полученных результатах авторы указывают, что максимальное их количество было сформировано на 35–40 день.

Присутствие тенденции использовать наряду с временным фактором и морфогенетический для оценки регенерации микрорастений можно встретить и у других авторов. При проведении исследований по определению эффективности воздействия источника искусственного освещения на процесс регенерации растений в Белорусской государственной сельскохозяйственной академии Т. В. Никоневич и др. (2016) оценивали формирование морфологических структур исключительно по биометрическим показателям, временной фактор оказался второстепенным. В Сибирском институте физиологии и биохимии растений Ю. А. Маркова и др. (2008) в качестве основного индикатора представляют прирост пробирочных растений по высоте и количеству междоузлий.

Проведенный анализ литературных источников показывает, что в методическом плане используется разнообразный подход к оценке роста и развития микрорастений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Объектом исследований являлись 15 сортов картофеля различных групп спелости. Опыт проводили в 4-кратной повторности по 20 микрорастений. Микрочеренки в асептические условия размещали на питательной среде Мурасиге-Скуга модификации ВНИИ картофельного хозяйства имени А. Г. Лорха, после чего биоматериал переносили в фитотрон с фотопериодом 16 ч и освещенностью 6–7 тыс. люкс. В наших исследованиях рост и развитие биоматериала оценивали по трем основным фазам: интенсивный рост, замедленный рост и естественное отмирание [5]. Наиболее важной частью формообразовательного процесса является фаза интенсивного роста. Она включает два основных этапа: прорастание и образование 2–3 междоузлий.

Фаза замедленного роста наступает при достижении стандартных параметров растений-регенерантов. К этому моменту они формируют 4–6 междоузлий. Биоматериал с искривленными стеблями (переросшие микрорастения) не рекомендуется использовать для высадки на субстрат, но они являются вполне пригодными для последующего черенкования. Диапазон варьирования продолжительности фазы замедленного роста во многом зависит от сортовых особенностей и условий выращивания в фитотроне.

Физиологическое старение *in vitro* материала начинается с фазы естественного отмирания микрорастений. Ее наступление обычно наблюдается с момента полного расхода питательной среды.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Рост и развитие экспланта в культуре ткани определяется его регенерационной способностью. Изучение данного показателя у 15 сортов картофеля различных групп спелости показало, что формирование морфологических структур находилось в прямой зависимости от сортовых особенностей. К наиболее морфогенным относятся сорта, формировавшие стандартные регенеранты на 20–25 день от момента посадки микрочеренков на новую питательную среду. По результатам проведенных наблюдений в данной группе оказались сорта различных групп спелости. Таким образом, ускоренным морфогенезом характеризовались сорта Жуковский ранний, Импала, Скарб, Никулинский, Астерикс и Лорх. Средний период формирования морфологических структур отмечен на сортах Ред Скарлетт, Гала, Накра, органогенез которых завершался на 30–35 день пассажа. Поздним морфогенезом характеризовались образцы, у которых процесс формообразования составил 40 дней, – Удача, Голубизна, Фиолетовый и Великан (табл.). Проведенный анализ регенерационной способности позволяет отметить, что результативность формирования морфологических структур не зависела от группы спелости исследуемых сортов образцов.

Одним из главных критериев оценки микрорастений при их использовании в качестве исходного материала и получении мини-клубней является способность сохранения стандартных характеристик. Согласно нормативным требованиям межгосударственного стандарта стран ЕврАзЭС, к стандартным относятся микрорастения, образующие не менее 4-х междоузлий темно-зеленого цвета с хорошо развитой листовой пластиной и корневой системой. Чем дольше растения способны сохранять свои стандартные характеристики, тем практичнее и результативнее проводимая работа по тиражированию биоматериала в культуре *in vitro*. Фаза замедленного роста исследуемых

Таблица – Онтогенез биоматериала в культуре *in vitro*, дней

Сорт	Группа спелости	Интенсивный рост		Замедленный рост	Физиологическое старение
		Прорастание	2–3 междоузлия		
Жуковский ранний	3	3–4	12–14	20–25	40–60
Удача	3	5–6	20–21	40–50	60–90
Ред Скарлетт	3	4–5	15–20	30–50	70–100
Импала	3	3–4	12–14	20–25	40–60
Невский	4	3–4	14–15	30–40	50–80
Гала	4	3–4	14–15	30–40	50–90
Романо	4	4–5	20–21	35–45	60–80
Накра	5	4–5	20–21	35–45	60–90
Голубизна	5	4–5	20–21	40–50	70–100
Скарб	5	3–4	14–15	25–35	60–90
Никулинский	6	3–4	14–15	25–35	45–80
Фиолетовый	6	4–5	20–21	40–50	70–100
Великан	6	4–5	20–21	40–50	70–100
Астерикс	6	3–4	14–15	25–35	50–80
Лорх	7	4–5	14–15	25–30	40–60

Примечание. 3 – ранний; 4 – среднеранний; 5 – среднеспелый; 6 – среднепоздний; 7 – поздний.

образцов картофеля зависела от сортовых особенностей. По результатам проводимой оценки амплитуда ее варьирования у исследуемых сортов составила от 5 до 20 дней. Короткий период соответствия нормативным требованиям отмечен на сортах Жуковский ранний, Импала и Лорх, лучшие показатели – на сортах Фиолетовый и Ред Скарлетт.

В процессе выполнения работ в культуре ткани одним из главных показателей являлся количество сформированных междоузлий. Чем выше их количество, тем больше регенерантов можно получать при каждом пассаже. Этот показатель также зависит от сортовых особенностей, а также регулируется внешними и внутренними факторами. К внешним относятся свет, тепло и влажность, к внутренним – физиологический возраст регенеранта и состав питательной среды. Наиболее существенное влияние на органогенез растений, выращиваемых в пробирочной культуре, оказывает последний из перечисленных факторов. В современной практике применяется большое разнообразие питательных сред для регенерации эксплантов и ускоренного *in vitro* тиражирования. Несбалансированность состава питательных сред может приводить к нарушению процесса формирования почки (геммогенеза), что, в свою очередь, приводит к снижению интенсивности роста и проявлению разнокачественности (не выравненности) среди регенерантов после осуществления нескольких циклов черенкования.

Поддержание и хранение образцов в культуре ткани требует регулярного специализированного контроля биоматериала на идентичность. В процессе долгосрочного поддержания *in vitro* коллекций без тщательного соблюдения параметров высадки и оценки образцов в полевой культуре происходят различные модификации, которые не всегда можно устранить в процессе выращивания оригинального семенного материала. Модификации в лабораторных *in vitro* коллекциях в основном заключаются в смещении фаз роста и развития, группы спелости, изменения габитуса куста, продуктивности растений и др. На процесс закрепления модификаций в культуре ткани основное влияние оказывает применение различных нестандартизированных составов питательных сред. Присутствие различного видового состава и концентраций рострегулирующих веществ способствует закреплению данных модификаций в культуре *in vitro* [7, 8]. Не рекомендуется использовать для ускоренного размножения *in vitro* материал сомнительного происхождения. Основопологающим элементом, обеспечивающим сохранение качественных характеристик *in vitro* материала в процессе тиражирования и наращивания объемов микрорастений, является соблюдение программы ускоренного клонального микроразмножения. Плановый подход к выполнению программы способствует получению *in vitro* материала гарантированного качества, соответствующего требованиям стандарта.

Основными элементами, способствующими сохранению качества исходного материала в процессе ускоренного микроразмножения, являются использование сертифицированных партий микрорастений и строгое соблюдение параметров работы в культуре ткани. Исходный оздоровленный материал в большей степени, чем остальные классы в оригинальном семеноводстве, подвержен заражению различными патологиями. Источниками заражения в большинстве из случаев является многолетняя коллекция сортов *in vitro*, которая бесконтрольно поддерживается десятилетиями. Причиной идентификации вирусов, бактериозов и вирида веретинovidности клубней картофеля в производимой партии исходного материала может стать механический перенос инфекции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ литературных источников показывает, что в методическом плане используется разнообразный подход к оценке роста и развития исходного материала в виде микрорастений. Рекомендации или методические указания по оценке

морфогенеза при выращивании необходимых объемов исходного материала для оригинального семеноводства не разработаны. Применение временного фактора, отражающего количество дней от момента посадки микрочеренков на новую питательную среду, не позволяет объективно оценить и планировать периоды роста и развития различных сортов картофеля в лабораторных условиях. Развитие эксплантов зависит от сортовых особенностей, и полная регенерация может варьировать от 20 до 45 дней. Соответственно подход к составлению программы клонального микроразмножения также должен быть дифференцированным.

В процессе тиражирования и выращивания оригинального семенного материала большое значение имеет период соответствия микрорастений требованиям стандарта. Соответствие микрорастений нормативным требованиям определяется по количеству сформированных междоузлий, независимо от времени размещения биоматериала на новую питательную среду. Таким образом, для практического использования в процессе клонального микроразмножения рекомендуется проводить оценку морфогенеза *in vitro* по фазам роста. Представленные рекомендации объективно отражают темпы развития и регенерации биоматериала в культуре ткани. Рекомендуемый подход к оценке материала наиболее практичен для составления программы клонального микроразмножения и выращивания микрорастений с последующей высадкой на субстрат и получения мини-клубней.

Список литературы

1. Влияние концентраций витаминов и гормонов в питательной среде на рост и развитие картофеля в культуре *in vitro* / Д. Л. Антонова [и др.] // Картофелеводство: сб. науч. тр. / РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству». – 2016. – Т. 24. – С. 322–326.
2. Влияние механохимического препарата пихты на морфогенез картофеля (*Solanum tuberosum* L.) при микроразмножении *in vitro* / В. Г. Дарханова [и др.] // Науч. журн. Кубанского ГАУ. – 2017. – № 130 (06). – С. 1–9.
3. Колонизация растений картофеля *in vitro* условно патогенной бактерией *Escherichia coli* / Ю. А. Маркова [и др.] // Доклады академии наук. – 2008. – Т. 420. – № 2. – С. 279–281.
4. Лапшинов, Н. А. Эффективность использования модифицированной среды Кемеровского НИИСХ при оздоровлении картофеля / Н. А. Лапшинов, В. П. Ходаева, В. И. Куликова // Достижения науки и техники АПК. – 2010. – № 7. – С. 16–17.
5. Методические рекомендации по тиражированию *in vitro* материала на основе БЗСК для оригинального семеноводства картофеля / Е. В. Овэс [и др.]. – М.: ВНИИКС. – 2017. – 25 с.
6. Никонович, Т. В. Влияние спектрального состава света на морфофизиологические реакции растений-регенерантов *Solanum tuberosum* L. в условиях культуры *in vitro* / Т. В. Никонович // Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений: сб. ст. Междунар. науч. конф., Минск, 18–20 авг. 2014 г. / ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси». – Минск, 2014. – С. 183–189.
7. Овэс, Е. В. Современные способы сохранения сортовых ресурсов картофеля / Е. В. Овэс, С. В. Жевора // Картофель и овощи. – 2015. – № 12. – С. 21–23.
8. Трускинов, Э. В. Проблемы оздоровления коллекции картофеля ВИР от вирусных болезней / Э. В. Трускинов // Картофелеводство: сб. науч. тр. «Методы биотехнологии в селекции и семеноводстве картофеля» / Рос. акад. с.-х. наук, ВНИИКС. – М., 2014. – С. 52–59.

9. Федорова, Ю. Н. Оптимизация получения растений картофеля в культуре *in vitro* / Ю. Н. Федорова, А. Н. Кононенко, Н. В. Лебедева // Изв. Санкт.-Петербургского гос. ун-та. – 2012. – № 28. – С. 15–17.
10. Федорова, Ю. Н. Правильно выбирайте технологию ускоренного размножения картофеля на оздоровленной основе / Ю. Н. Федорова // Картофель и овощи. – 2009. – № 4. – С. 21.
11. Ходаева, В. П. Продуктивность оригинального семенного материала в зависимости от способа размножения оздоровленного картофеля / В. П. Ходаева, В. И. Куликова // Достижения науки и техники АПК. – 2009. – № 9. – С. 18–19.
12. Чернышева, Н. Н. Модификация компонентного состава питательной среды для индукции морфогенеза растений – регенерантов картофеля (*Solanum tuberosum*) сорта Гала в культуре *in vitro* / Н. Н. Чернышева, К. Ю. Гусева // Аграрная наука – сельскому хозяйству: сб. науч. ст. Алтайского гос. аграр. ун-та. – 2017. – С. 324–325.
13. Anoop, B. Effect of Growth Regulators on Meristem-tip Development and *in vitro* Multiplication of Potato Cultivar 'Kufri Himalini' / B. Anoop, J. S. Chauhan // Nature and Science. – 2009. – Vol. 7 (9). – P. 31–34.
14. Effect of growth regulators on *in vitro* multiplication of potato / A. B. Rabbani, [et al.] // International Journal Agriculture and Biology. – 2001. – Vol. 3, № 2. – P. 181–182.
15. Khadiga, G. A. Micro tuber induction of two potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties namely, Almera and Diamant / G. A. Khadiga, S. M. Rasheid, M. K. Mutasim // International Research Journal of Biological Sciences. – 2015. – Vol. 4 (3). – P. 84–89.
16. Micropropagation of Potato *Solanum tuberosum* / L. Koleva [et al.] // Journal of Biology. – 2012. – Vol. 8 (3). – P. 45–49.

Поступила в редакцию 04.09.2018 г.

E. V. OVES, N. A. GAITOVA, V. V. BOYKO, N. A. FENINA

IN VITRO MORPHOGENESIS ASSESSMENT PARAMETERS IN THE COURSE OF REPLICATION OF POTATOES INITIAL MATERIAL

SUMMARY

In the course of replication and cultivation of necessary volumes of in vitro material the period of formation of morphological structures and achievement of microplants of standard characteristics is important for original seed farming. The existing regeneration assessment technique by the number of days from the moment of placement of microshanks on new nutrient medium does not allow to carry out planned approach to drawing up and implementation of the program of clonal microreproduction. New methodical approaches to a material in vitro to potatoes assessment are offered the main phases of development of plants in the culture of fabric: intensive growth (formation of 2–3 interstices), the slowed-down growth (4–6 interstices) and natural dying off. The recommended elements by assessment regeneration in vitro are carried out on the basis of studying of ontogenesis of 15 potatoes varieties. The presented results reflect the differentiated varieties approach to formation of morphological structures in the course of replication.

Key words: potatoes, *in vitro* material, microplants, morphogenesis, regeneration, varietal characteristics.