

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ВИТАМИНОВ НА МОРФОГЕНЕЗ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ КАРТОФЕЛЯ *IN VITRO* В ЦЕЛЯХ ИНТЕНСИФИКАЦИИ ПРОИЗВОДСТВА ЭЛИТНОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА

Е.П. Мякишева, Д.А. Дурников, О.К. Таварткиладзе

Алтайский центр прикладной биотехнологии, Алтайский государственный университет, г. Барнаул, Россия

Email: emjak@yandex.ru, durnikin@list.ru

В статье показана необходимость использования методов современной биотехнологии в системе первичного семеноводства картофеля на территории Российской Федерации. В настоящий момент времени качество воспроизводимого картофеля не отвечает современным фитосанитарным требованиям, наблюдается низкая урожайность картофеля в целом по стране, и региону на протяжении длительного периода времени. Урожай картофеля, ежегодно получаемый на территории России, значительно ниже общемирового, и не отвечает генетическим возможностям используемых сортов. Современные методы биотехнологии обладают неоспоримыми преимуществами и позволяют круглогодично проводить работы по производству элитного посадочного материала картофеля. Эффективное проведение таких работ обеспечивается тщательным подбором условий культивирования растений *in vitro*, подбору конкретно для каждого сорта питательных сред и отдельных компонентов среды, обеспечивающих максимальные параметры развития растений и их продуктивность в дальнейшем. В ходе исследований, проведенных авторами, изучено влияние витаминного компонента питательной среды по прописи Мурасиге и Скуга, содержащего в своем составе тиамин, пиридоксин и никотиновую кислоту. Данные вещества являются коферментами и участвуют во многих биохимических реакциях растения. Изучено влияние витаминного комплекса на показатели развития надземной части растения (высоту растений и число междоузлий), а также показатели ризогенеза (число и длину корней) для растений-регенерантов картофеля четырех сортов: Адретта, Ред Скарлетт, Любава и Кузнечанка. В ходе проведенного исследования показано положительное влияние витаминного компонента на показатели морфогенеза растений. Для каждого сорта подобрано его оптимальное соотношение в питательной среде.

Ключеві слова: клональное микроразмножение, картофель, *in vitro*, витамины, морфогенез, питательная среда.

INFLUENCE OF VITAMIN MORPHOGENESIS REGENERATED PLANTS POTATO *IN VITRO* TO INTENSIFY PRODUCTION OF ELITE PLANTING MATERIAL

E.P. Miakisheva, O.K. Tavartkiladze, D.A. Durnikin

Altai Center of Applied Biotechnology, Altai State University, Barnaul, Russia

The paper identifies the need to use the techniques of modern biotechnology in primary seed potatoes in the Russian Federation. At present time, the playback of potatoes does not meet current phytosanitary requirements, there is a low yield of potatoes in the whole country, and the region for a long period of time. Harvest potatoes annually produced in Russia is much lower than the world's, and does not meet the genetic capabilities used varieties. Modern methods of biotechnology have undeniable advantages and make it possible to carry out year-round operation for the production of elite planting material of potato. Effective implementation of such activities is provided by careful selection of plant cultivation conditions *in vitro*, selecting specifically for each class of nutrient media and the individual components of the environment, providing maximum parameters of plant growth and productivity in the future. During the studies the authors studied the effect of vitamin nutrient medium component of the recipe Murashige and

Citation:

Miakisheva, E.P., Durnikin, D.A., Tavartkiladze, O.K. (2016). Influence of vitamin morphogenesis regenerated plants potato *in vitro* to intensify production of elite planting material. *Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytskyi Melitopol State Pedagogical University*, 6 (2), 166–173.

Поступило в редакцию / Submitted: 13.06.2016

Принято к публикации / Accepted: 01.08.2016

crossref <http://dx.doi.org/10.15421/201648>

© Miakisheva & al., 2016

Users are permitted to copy, use, distribute, transmit, and display the work publicly and to make and distribute derivative works, in any digital medium for any responsible purpose, subject to proper attribution of authorship.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 License

Skoog medium, containing in its composition, thiamine, pyridoxine and niacin. These substances are involved in the co-enzymes and biochemical reactions in plants. The effect of vitamin complex on the performance of the above-ground parts of the plant (plant height and number of internodes), as well as indicators of root formation (number and length of roots) for plants regenerated total of four potato varieties: Adretta, Red Scarlett, Lubava and Kuznechanka. In the course of the study demonstrated a positive effect of vitamin component indicators of plant morphogenesis. For each class chosen his optimal ratio growth medium.

Key words: micropropagation, potatoes, *in vitro*, vitamins, morphogenesis, growth medium.

ВВЕДЕНИЕ

Картофель – одна из важнейших пищевых культур, занимающая ведущее место в мировом производстве вслед за пшеницей, рисом и кукурузой. Россия, занимая лидирующее положение в мире по количеству производимого картофеля, остается на одном из последних мест по урожайности. При средней урожайности картофеля в мире 15 т/га в России она составляет всего около 10 т/га. (Кошкин, 2005). За последние десять лет ситуация с отечественным картофелеводством коренным образом не изменилась.

Согласно разработанной министерством сельского хозяйства Российской Федерации стратегии развития селекции и семеноводства на период до 2020 года, необходимо системное совершенствование семеноводства картофеля. Основными инструментами для этого должны послужить разработка и освоение методов выращивания высококачественного семенного материала картофеля на основе создания исходного материала, освобожденного от вирусных, виroidных и бактериальных фитопатогенов с использованием методов биотехнологии (Симаков, Анисимов, 2010).

Западно-Сибирский регион Российской Федерации не реализует в полной мере современные возможности возделывания картофеля. Реальные показатели урожая по региону значительно ниже общемировых, а качество воспроизводимого картофеля не отвечает современным требованиям. На снижение урожайности картофеля в регионе напрямую влияют два основных фактора: неблагоприятная фитопатогенная ситуация и отсутствие качественного семенного материала. (Федорова, 2011).

Современное семеноводство картофеля активно использует биотехнологический метод апикальной меристемы *in vitro* для освобождения от вирусной инфекции и получения элитного посадочного материала. Преимущества данного метода очевидны: качественный посадочный материал сохраняет устойчивость к вирусным заболеваниям и обладает высокой урожайностью в течение 5-8 лет, данное производство является экологически чистым, возможно проводить работы в течение всего года. С применением стандартного лабораторного оборудования и тщательно отработанной и оптимизированной технологии возможно добиться высокой экономической эффективности проводимых работ (Артюхова, Киргизова, 2014).

В настоящее время многие работы отечественных и зарубежных авторов посвящены интенсификации воспроизводства оздоровленного посадочного материала за счет подбора оптимальных параметров культивирования, подбора оптимального сочетания компонентов уже известных а так же создания прописей новых питательных сред, применительно для конкретных сортов картофеля (Леонова, 2010; Назарова, 2011; Koleva et. al., 2012; Fufa et. al., 2014).

Как правило, основой для таких исследований служит питательная среда по прописи Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962). Одним из компонентов, составляющих данную питательную среду является витаминный комплекс, содержащий следующие элементы: витамин В1 (хлоргидрат тиамин $C_{12}H_{17}ClN_4OS$), витамин В6 (пиридоксин $C_8H_{11}NO_3$) и никотиновая кислота (витамин В3, РР, $C_6H_5NO_2$). Данные элементы используются в питательных средах в небольших количествах 0,1-10 мг/л, однако обладают высокой физиологической активностью и важны для нормального протекания морфофизиологических процессов растений, культивируемых на искусственных питательных средах.

Все витамины группы В являются коферментами, улучшают адаптацию тканей и их рост, используются для стимуляции биохимических реакций в клетке. Так тиамин является коферментом цикла Кребса, его введение усиливает рост и дифференциацию растений. В питательной среде тиамин стимулирует развитие крепких корней, способных поглощать больше питательных веществ (Лебедева, Федорова, 2014).

Присутствие в среде никотиновой кислоты оказывает стимулирующее влияние на развитие растений, т.к. она является предшественником синтеза метаболитов, связанных с синтезом ИУК. Использование биологически активных веществ позволяет преодолеть критические моменты и стрессовые воздействия в процессе воспроизводства (Усков, 2009).

Таким образом, данные компоненты питательной среды необходимы для нормального развития растений и протекания в них различных биохимических реакций. Для интенсификации производства элитного посадочного материала картофеля важно учитывать влияние витаминного компонента питательной среды на морфофизиологические характеристики картофеля разных сортов в культуре *in vitro*.

Целью данной работы явилось изучение особенностей морфогенеза сортов картофеля в культуре *in vitro* в зависимости от содержания витаминного компонента в питательной среде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом для исследования служили 4 сорта картофеля: раннеспелые – Ред Скарлет (Голландия), Любава (Кемеровский НИИСХ); среднеранний сорт – Адретта (Германия); среднеспелый сорт – Тулеевский (Кемеровский НИИСХ и ВНИИКС). Данные сорта были выбраны вследствие их высоких вкусовых качеств, высокой урожайности, крупноплодности. Все сорта внесены в государственный реестр РФ и рекомендованы для выращивания в Западно-Сибирском регионе.

Методика работы основывалась на общепринятых классических приемах работы с культурами изолированных тканей и органов растений (Бутенко, 1971).

В качестве основной питательной среды использовали модифицированную питательную среду по прописи Murashige, Skoog, (1962) (MS) дополненную мезоинозитом 100 мг/л, и гидролизатом казеина 1 г/л (Таварткиладзе, Вечернина, 2014).

Витаминный компонент питательной среды составляли: тиамин 0,1 мг/л; пиридоксин 0,5 мг/л; и никотиновая кислота 0,5 мг/л. Для подбора оптимального содержания витаминного компонента в питательной среде использовали его различные концентрации 0; 1; 1,5; 2; 2,5; 5 мкМ.

Для культуральных сосудов использовали пробирки объемом 10 мл, заполняя их питательной средой по 3–4 мл. В качестве эксплантов использовали микрочеренки, вычлененные из средней части растения с одной пазушной почкой и листом.

Растения-регенеранты культивировали в следующих условиях: фотопериод 16/8 часов свет/темнота, освещенность 2–3 клк, температура $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Длительность пассажа составляла 25 дней.

Через 20 суток фиксировали следующие показатели развития растений: высота побега, мм; число междоузлий, шт./экспл.; количество корней, шт./экспл.; длина корней, мм;

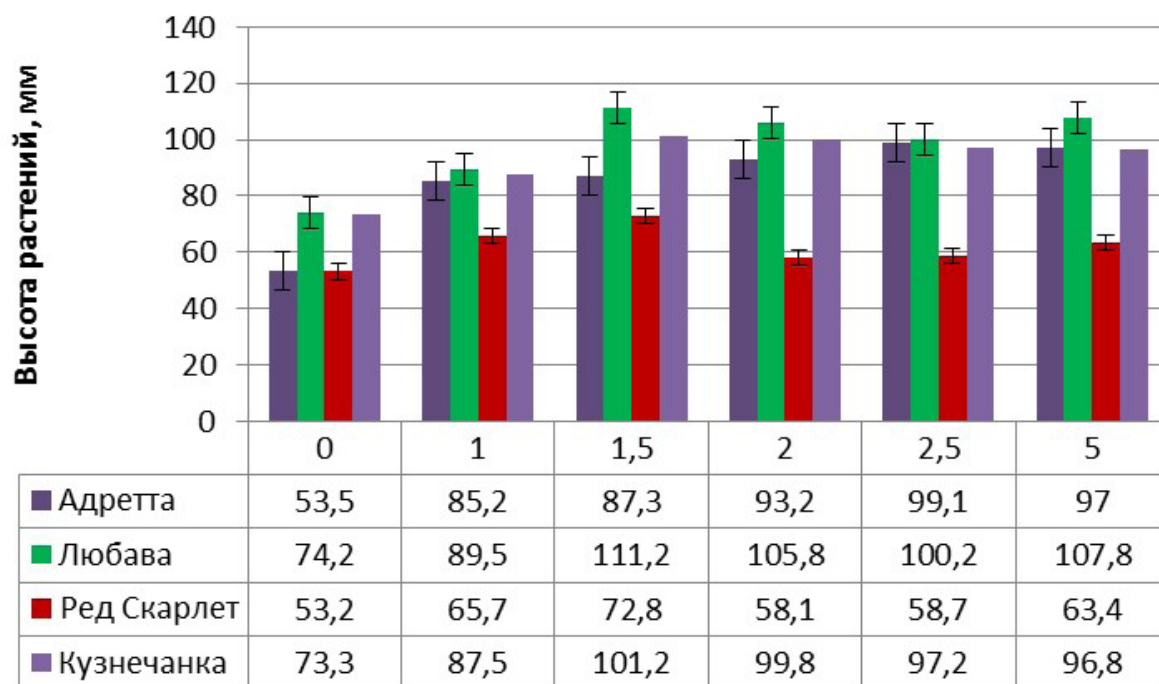
Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ *Microsoft Office Excel 2007*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

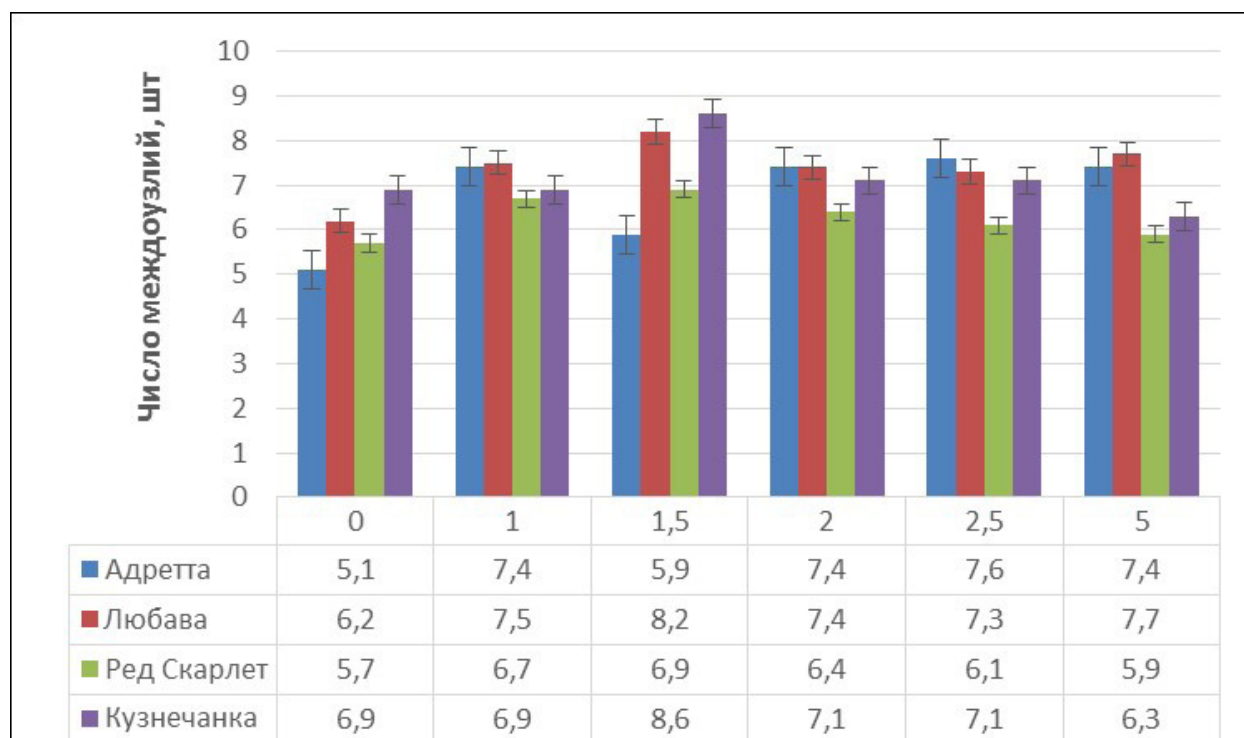
В результате проделанной работы были получены данные, отражающие зависимость морфологических параметров растений от содержания витаминного компонента в питательной среде. Наблюдается положительное воздействие на морфологические параметры развития растений всех изученных сортов картофеля.

При исследовании влияния концентрации витаминного компонента в питательной среде, у изучаемых сортов картофеля наблюдался различный физиологический ответ. Для каждого изучаемого сорта картофеля были отмечены концентрации, на которых происходило усиление ростовых потенций растения, а также концентрации, использование которых оказывает удерживающее воздействие на рост растений.

При проведении этапа собственно размножения важно за короткий срок получить растения определенной морфологической структуры - высокие растения с большим числом междоузлий. Облиственность растений служит показателем их потенциальной энергии роста, т.к. листья – место детерминации физиологических процессов, происходящих в растениях (Усков, 2009). Результаты влияния витаминного компонента на высоту и количество междоузлий растений-регенерантов отражены на рис. 1–2.

Рис. 1. Влияние витаминного компонента питательной среды на высоту растений картофеля в культуре *in vitro*.

Для картофеля сорта Адретта хорошие показатели развития надземной части растений (высота и количество междоузлий) были отмечены при использовании широкого диапазона концентраций витаминов от 2 до 5 мкМ. Максимальные показатели развития были отмечены при концентрации 2,5 мкМ, при этом высота растений составила $99,1 \pm 0,5$ мм, на растениях формировалось по $7,6 \pm 0,2$ междоузлия.

Рис. 2. Влияние витаминного компонента питательной среды на число междоузлий растений картофеля в культуре *in vitro*.

Максимальная высота регенерантов сортов картофеля селекции НИИСХ г. Кемерово Любава и Кузнечанка была отмечена при использовании комплекса витаминов в концентрации 1,5 мкМ. При этом максимальная высота растений составила $111,2 \pm 0,6$ мм и $101,2 \pm 0,4$ мм соответственно. Кроме этого для сорта Любава и при увеличении концентрации витаминов до 5 мкМ у регенерантов формировались растения выше 100 мм, состоящие из 7-8 междоузлий, наблюдалось вытягивание растений за счет увеличения зоны междоузлия, что на этапе собственно размножения облегчает техническое проведение работ по микрочеренкованию.

Регенеранты картофеля Ред Скарлет на всех изученных вариантах питательных сред обладали наименьшей высотой растений, по сравнению с другими сортами. Максимальные показатели развития вегетативной части растений были отмечены при использовании комплекса витаминов в концентрации 1,5 мкМ. При данной концентрации была отмечена максимальная высота растений $72,8 \pm 0,5$ мм, максимальное число междоузлий на растении не превышало $6,9 \pm 0,2$ шт. Кроме этого отмечалось утолщение стебля, формировались листья большего размера и более темного цвета. При понижении концентрации витаминов в питательной среде до 0 и повышении до 5 мкМ для данного сорта отмечалось замедление ростовых процессов и скручивание листьев растения.

Для успешного проведения этапа адаптации необходимо получить растения с хорошо развитой корневой системой. Для успешного укоренения растений картофеля в культуре *in vitro* применяют различные регуляторы роста ауксиновой природы (Гусева и др., 2013). Известно, что витамины группы В являются природными предшественниками метаболитов, отвечающих за синтез в растении индолилуксусной кислоты. Таким образом, введение в питательную среду витаминов в оптимальной для растения концентрации стимулирует развитие корневой системы. При использовании питательных сред без внесения витаминов наблюдалось уменьшение таких показателей ризогенеза как количество и средняя длина корней для всех изученных сортов картофеля (рис. 3-4).

Из всех изученных сортов картофеля Ред Скарлетт оказался наиболее чувствительным на отсутствие витаминов, происходило снижение показателей ризогенеза до $13,2 \pm 0,4$ шт/экспл. корня, средняя длина которых не превышала $13,5 \pm 0,5$ мм. Максимальные показатели развития корневой системы для данного сорта были зарегистрированы при использовании 1,5 мкМ витаминного комплекса. Высокие концентрации 2,5-5 мкМ так же снижали показатели укоренения растения.

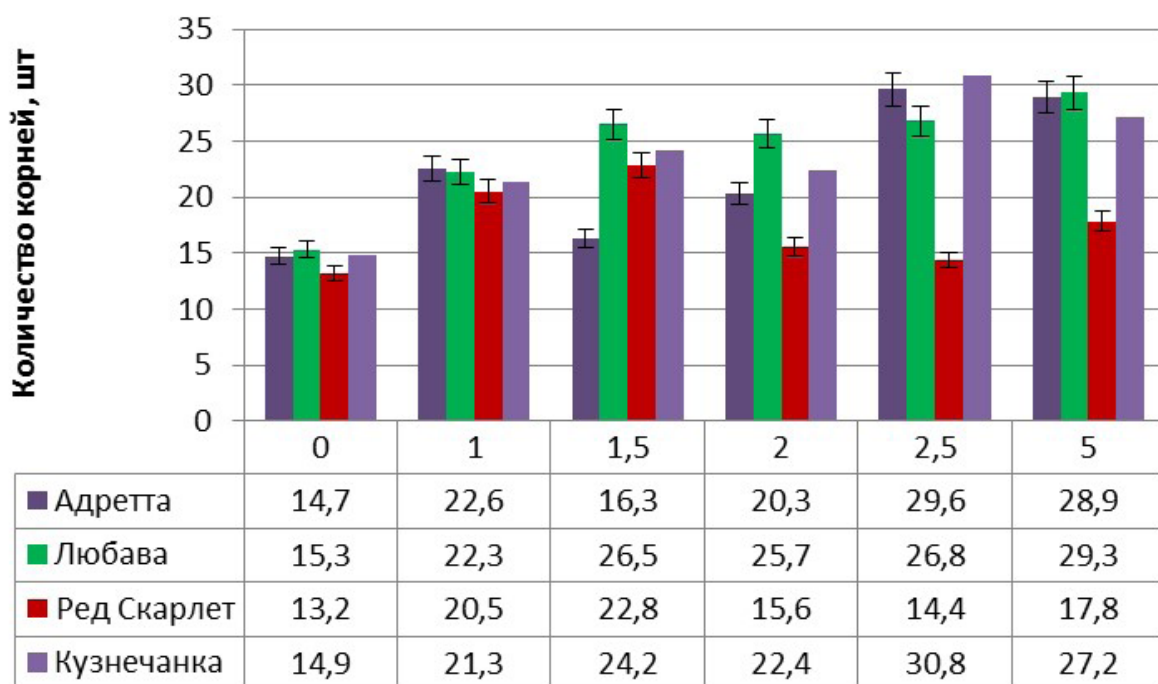


Рис. 3. Влияние витаминного компонента питательной среды на количество корней растений картофеля в культуре *in vitro*.

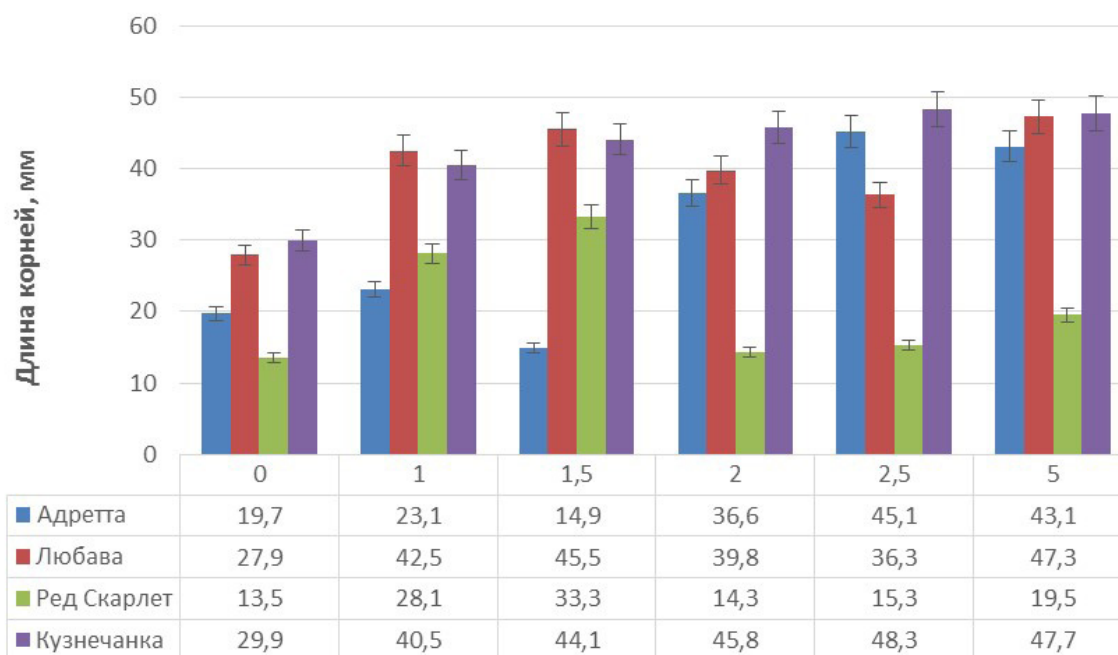


Рис. 4. Влияние витаминного компонента питательной среды на длину корней растений картофеля в культуре *in vitro*.

Для картофеля Сорта Адретта оптимальной оказалась концентрация 2,5 мкМ. При этом на растении формировалось по $29,6 \pm 0,7$ шт/экспл. корней, средняя длина которых составляла $45,1 \pm 0,8$ мм. При данных характеристиках корневой системы растения успешно проходят этап адаптации с использованием гидропонных систем, растения легко закрепить в вегетационной кассете.

Растения картофеля селекции НИИСХ г Кемерово Любава и Кузнечанка положительно отзывались на высокие концентрации витаминов в питательной среде. Так у регенерантов сорта Любава, при 5 мкМ витаминов формировались растения с хорошо развитой корневой системой – $29,3 \pm 0,6$ шт/экспл. корней, средняя длина которых составляла $47,3 \pm 0,4$ мм. Растения сорта Кузнечанка показали лучшие параметры развития при 2,5 мкМ витаминного комплекса. Средняя длина корней составила $48,3 \pm 0,6$ мм, на растениях формировалось по $30,8 \pm 0,9$ корней. При этом для обоих сортов происходило утолщение корней и активное формирование корневых волосков, что в дальнейшем обеспечивает успешную адаптацию к нестерильным условиям выращивания *in vivo*.

В результате проведенного исследования, было установлено, что различные генотипы картофеля неоднозначно реагируют на внесение витаминного компонента в питательную среду. Необходимо использовать среды, содержащие индивидуальные для каждого сорта концентрации, что позволит получить максимальные морфологические характеристики развития растений.

ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований были оптимизированы питательные среды по содержанию витаминного компонента для пробирочных растений-регенерантов в культуре *in vitro*.

У изучаемых регенерантов картофеля при использовании различных концентраций витаминов в питательной среде были отмечены морфологические параметры развития, специфичные для каждого сорта. Это свидетельствует о том, что реализация потенциала того или иного сорта напрямую связана с генотипом культуры и влиянием факторов питательной среды.

Для картофеля сорта Адретта максимальные параметры развития растений наблюдались при использовании витаминного компонента в концентрации 2,5 мкМ, для картофеля сорта Ред Скарлетт – 1,5 мкМ. Максимальные показатели развития вегетативной части растения для сортов картофеля Любава и Кузнечанка были получены при добавлении в питательную среду витаминов в

концентрации 1,5 мкМ. Лучшие показатели ризогенеза для сорта Любава были отмечены при 5 мкМ, Кузнечанка – 2,5 мкМ витаминного комплекса.

Полученные практические результаты работы целесообразно использовать при производстве элитного посадочного материала картофеля с использованием меристемной культуры *in vitro*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Артюхова С.И., Киргизова И.В. Модификации питательной среды с использованием биотехнологических методов микрোকлонального размножения картофеля для культивирования в Омской области // Омский научный вестник. – 2014. – №2. – С 187–191.
- Бутенко Р.Г. Культура тканей и клеток растений. – М., – 1971. – 45 с.
- Гусева К.Ю., Бородулина И.Д., Мякишева Е.П., Таварткиладзе О.К. Изучение ризогенеза сортов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) в культуре *in vitro* // Известия АлтГУ. – 2013. – №2. – С. 69–72.
- Гусева К.Ю., Бородулина И.Д., Мякишева Е.П., Таварткиладзе О.К. Укоренение *in vitro* сортов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) // Известия АлтГУ. – 2013. – №1. – С. 56–60.
- Кошкин Е.И., Гатаулина Г.Г., Дьяков А.Б. и др. Частная физиология полевых культур / под ред. Е. И. Кошкина. – М.: Колос, 2005. – 344 с.
- Лебедева Н.В., Федорова Ю.Н. Применение витаминов при ускоренном размножении картофеля // Вестник российского государственного аграрного заочного университета. – 2014. – С. 15–17.
- Леонова Н. С. Изменчивость в культуре картофеля (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro* и возможности ее использования в селекции и семеноводстве: автореф. дис. на соиск. уч. степ. д.б.наук: 03.01.06 «Биотехнология» / Леонова Нина Семеновна. – Улан-Уде, 2010. – 34 с.
- Назарова В.Ф. Оптимизация элементов технологии семеноводства картофеля на основе микрোকлонального размножения посадочного материала: автореф. дис. на соиск. уч. степ. канд.с.-х. наук: 06.01.05 «Селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений» / Назарова Валентина Федоровна; НИИСХ. – Москва, 2011. – 21 с.
- Симаков Е.А., Анисимов Б.В. Филиппова Г.И. Стратегия развития селекции и семеноводства картофеля на период до 2020 года // Картофель и овощи, 2010, №8 С. 2–4.
- Таварткиладзе О.К. Вечернина Н.А. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений: монография. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та. – 2014. – 251 с.
- Усков А.И. Воспроизводство оздоровленного исходного материала для семеноводства картофеля: размножение исходных растений // Достижения науки и техники АПК. – 2009. – №12. – С. 17–20.
- Федорова Ю.Н. Повышение эффективности производства семенного картофеля путем оптимизации параметров тканевой технологии в условиях Северо-Западной зоны Российской Федерации: автореф. дис. д-ра с.-х. наук: 06.01.05 «Селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений» / Федорова Юлия Николаевна. – Брянск, 2011. – 42 с.
- Koleva Gudeva Liljana, Mitrev S., Trajkova Fidanka, Ilievski Mite Micropropagation of Potato *Solanum tuberosum* L. // Electronic Journal of Biology. – 2012. – Vol. 8(3). – P. 45-49.
- Fufa M., Mulugeta D. Microtuber Induction of Two Potato (*Solanum tuberosum* L.) Varieties //Advances in Crop Science and Technology Fufa and Diro, Adv Crop Sci Tech. – 2014. – P. 122.

REFERENCES

- Artyuxova, S.I., Kirgizova, I.V. (2014) Modifikaczii pitatel'noj sredy s ispol'zovaniem biotexnologicheskix metodov mikroklonal'nogo razmnozheniya kartofelya dlya kul'tivirovaniya v Omskoj oblasti. *Omskij nauchnyj vestnik*, 2, 187–191. (in Russian).
- Butenko, R.G. (1971). *Kul'tura tkanej i kletok rastenij*. Moscow. (in Russian).
- Fedorova, Yu.N. (2011). *Povishenie effektivnosti proizvodstva semennogo kartofelya putem optimizacii parametrov tkanevoi tehnologii v usloviyah Severo_Zapadnoi zoni Rossijskoi Federacii*. Thesis of Doctoral Dissertation. Bryansk. (in Russian).
- Fufa, M., Diro, M. (2014). Microtuber Induction of Two Potato (*Solanum tuberosum* L.) Varieties. *Adv Crop Sci Tech.*, 2, 122.
- Guseva, K.Yu., Borodulina, I.D., Myakisheva, E.P., Tavartkiladze, O.K. (2013). Ukorenenie in vitro sortov kartofelya (*Solanum tuberosum* L.). *Izvestiya AltGU*, 3, 56-60. (in Russian).
- Guseva, K.Ju., Borodulina, I.D., Mjakisheva, E.P., Tavartkiladze, O.K. (2013). Izuchenie rizogeneza sortov kartofelja (*Solanum tuberosum* L.) v kul'ture in vitro. *Izvestija AltGU*, 2, 69-72. (in Russian).

- Koleva-Gudeva, L., Mitrev, S., Trajkova, F., Ilievski, M. (2012). Mite Micropropagation of Potato *Solanum tuberosum* L. *Electronic Journal of Biology*, 8(3), 45-49.
- Koshkin, E.I., Gataulina, G.G., Dyakov, A.B. (2005). *Chastnaya fiziologiya polevikh kultur*. E.I. Koshkin (ed.). Moscow: Kolos. (in Russian).
- Lebedeva, N.V., Fedorova, Ju.N. (2014). Primenenie vitaminov pri uskorenno razmnnozhennii kartofelja *Vestnik rossijskogo gosudarstvennogo agrarnogo zaochnogo universiteta*, 15–17. (in Russian).
- Leonova, N. S. (2010). *Izmenchivost v kulture kartofelya _Solanum tuberosum L., in vitro i vozmozhnosti ee ispolzovaniya v selekcii i semenovodstve*. Thesis of Doctoral Dissertation. Ulan Ude. (in Russian).
- Nazarova, V.F. (2011). *Optimizaciya elementov tehnologii semenovodstva kartofelya na osnove mikroklonalnogo razmnnojeniya posadochnogo materiala*. Thesis of Doctoral Dissertation. Moskva. (in Russian).
- Simakov, E.A., Anisimov, B.V. Filippova, G.I. (2010). Strategiya razvitiya selekcii i semenovodstva kartofelya na period do 2020 goda. *Kartofel' i ovoshhi*, 8, 2–4. (in Russian).
- Tavartkiladze, O.K., Vechernina, N.A., (2014). *Metody biotehnologii v selekcii, razmnnozhennii i sohranennii genofonda rastenij: monografiya*. Barnaul: Altai University. (in Russian).
- Uskov, A.I. (2009). Vospriizvodstvo ozdorovlennogo ishodnogo materiala dlya semenovodstva kartofelya_ razmnnojenie ishodnih rastenii. *Dostijeniya nauki i tehniki APK*, 12, 17–20. (in Russian).