

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АСЕПТИЧЕСКИХ ЭКСПЛАНТОВ КАРТОФЕЛЯ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

А.А. Churakov, N.M. Popova,
A.N. Khalipsky, Yu.A. Piryatenets

THE WAY OF OBTAINING ASEPTIC EXPLANTS OF POTATO CULTURE IN VITRO

Чураков А.А. – канд. с.-х. наук, вед. науч. сотр., зав. лаб. селекции Научно-исследовательского центра селекции и семеноводства Красноярского государственного аграрного университета, г. Красноярск.

E-mail: a-tjn@ya.ru

Попова Н.М. – ст. науч. сотр. лаб. селекции Научно-исследовательского центра селекции и семеноводства Красноярского государственного аграрного университета, г. Красноярск.

E-mail: a-tjn@ya.ru

Халипский А.Н. – д-р с.-х. наук, доц., зав. каф. растениеводства и плодовоовощеводства Красноярского государственного аграрного университета, г. Красноярск.

E-mail: khalipskiya@mail.ru

Пирятенец Ю.А. – директор по производству ООО «Сельскохозяйственное предприятие "Дары Малиновки"», г. Красноярск.

E-mail: khalipskiya@mail.ru

Churakov A.A. – Cand. Agr. Sci., Leading Staff Scientist, Head, Lab. of Selection, Research Center of Selection and Seed Farming, Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk.

E-mail: a-tjn@ya.ru

Popova N.M. – Senior Staff Scientist, Lab. of Selection, Research Center of Selection and Seed Farming, Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk.

E-mail: a-tjn@ya.ru

Khalipsky A.N. – Dr. Agr. Sci., Assoc. Prof., Head, Chair of Plant Growing and Fruit-and-Vegetable Growing, Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk.

E-mail: khalipskiya@mail.ru

Piryatenets Yu.A. – Production Director, JSC "Farm Enterprise "Dary Malinovki", Krasnoyarsk.

E-mail: khalipskiya@mail.ru

Цель исследования – поиск дезинфицирующих агентов, обеспечивающих высокую стерильность и сохранность жизнеспособности первичных эксплантов. В лаборатории селекции Красноярского ГАУ проведено изучение малотоксичных стерилизующих веществ для получения первичных эксплантов картофеля в культуре in vitro. Для получения асептических эксплантов использованы следующие агенты: «Доместос» (5 % гипохлорит натрия, анионные, неионогенные ПАВ, мыло, отдушка), «Белизна» (гипохлорит натрия, активного хлора – 95,2 %), медицинский антисептический раствор (объем этилового спирта – 95 %), перекись водорода (36–38 %), «Цефотаксим» – полусинтетический антибиотик группы цефалоспоринов. Культивирование ростков выполнено на агаризованной питательной среде по прописи Мурасиге и Скуга (MS – 1,0, сахаро-

за – 20 г/л, гидролизат казеина) в модификации Всероссийского НИИ картофельного хозяйства. Для установления эффективности стерилизации экспланты осматривались на отсутствие экзофитной инфекции на 3, 5 и 7-й день после высадки. Выращивание первичных эксплантов (этиолированные ростки размером 0,5–2 см) проведено при температуре 22±2 °С, освещенности 5000 лк, влажности 55–65 %, 15-часовом фотопериоде. Объектами исследования были следующие образцы картофеля: Фаворит, Тулеевский, Жуковский ранний, Метеор, Аксамит, Пушкинец, Нептун, Лазурит, Северная роза, Арамис, Красноярский ранний, линия 2108-2, местный Восточной Сибири. Достоверных различий устойчивости изученных генотипов к стерилизующим агентам установлено не было. Максимальный выход асептических эксплантов (50 %) получен

при использовании «Белизны» и дистиллированной воды (соотношение компонентов 1 : 4) и антибиотика «Цефотаксим».

Ключевые слова: биотехнология, исходный материал, микрорастения, эндофитная микрофлора, стерилизация эксплантов, деконтаминация.

The research objective was looking for disinfecting agents ensuring high sterility and safety of primary explant viability. Studying of low-toxic sterilizing substances for receiving primary explant of potatoes in culture in vitro was carried out in the Laboratory of Selection of Krasnoyarsk SAU. For receiving aseptically explant the following agents were used: "Domestos" (5 % sodium hypochlorite, anion, nonionic surfactant, soap, fragrance), "Belizna" (hypochlorite of sodium, active chlorine – 95.2 %), medical antiseptic solution (the volume of ethyl alcohol – 95 %), hydrogen peroxide (36–38 %), "Cefotaxime" – semisynthetic antibiotic of cephalosporin group. Sprouts cultivation on agar nutrient medium was performed according to the prescription of Murashige and Skoog (MS – 1.0, sucrose 20 g/l, casein hydrolyzate) in modification of All-Russia Research and Development Institute of Potato Production. For the establishment of the efficiency of sterilization the explants were examined to ensure the absence of exophyte infection for the 3, 5 and 7-th days after planting. The cultivation of primary explant (bleached-out plants 0.5–2.0 cm) was carried out under the temperature of 22±2 °C, illuminance 5000 lux, humidity 55–65 %, photoperiod of 15 hours. The following samples of potatoes were objects of the research: Favourite, Tuleevsky, Zhukovsky ranny, Meteor, Aksamit, Pushkinets, Neptune, Lazurit, Severnaya roza, Aramis, Krasnoyarsky ranny, line 2108-2, local Vostochnoy Sibiri). Reliable distinctions of the resistance of studied genotypes to sterilizing agents had not been established. The maximum exit of aseptic explants (50 %) was received when using "Belizna" and distilled water (components ratio 1: 4) and antibiotic "Cefotaxime".

Keywords: biotechnology, initial material, microplants, endophytic microflora, explants' sterilization, decontamination.

Введение. Вегетативное размножение картофеля способствует снижению качества поса-

дочного материала с каждым этапом его размножения. В мировой практике семеноводства культуры размножение оздоровленного исходного материала в культуре *in vitro* является основным источником получения материала для полевых репродукций. Меристемная культура позволяет в течение короткого времени из ограниченного количества оздоровленных микрорастений производить большие объемы посадочного материала (микрорастения, миниклубни). Сохранение живой коллекции *in vitro* дает доступ к оздоровленному исходному материалу, который может быть использован в процессе семеноводства. Длительное культивирование микрорастений в лабораторных условиях может приводить к появлению модификаций, сказывающихся на типичности образцов. Сохранить сортовую идентичность, урожайные свойства и качественные характеристики картофеля позволяет поддержание образцов в полевой коллекции [1, 2]. Ежегодное использование клубней из полевой репродукции сопряжено с необходимостью получения асептических эксплантов для пробирочной культуры. Существует довольно большое количество способов введения в культуру *in vitro*, основная задача которых получить максимальное количество стерильных эксплантов, способных к дальнейшей регенерации [1, 4–7]. Ранее широко используемый для дезинфекции хлорид ртути отличается высокой токсичностью, поэтому сейчас имеет ограниченное применение.

Цель исследования: поиск дезинфицирующих агентов, обеспечивающих высокую стерильность и сохранность жизнеспособности первичных эксплантов.

Объекты и методики исследования. Объектами исследования в полевой культуре и *in vitro* были 16 сортов и 1 образец картофеля (*Solanum tuberosum* L.) различного эколого-географического происхождения, представляющие интерес для семеноводства, селекции, а также прошедшие эколого-географические испытания под эгидой ФАНО России. Пять изученных сортов допущены к использованию по 11-му региону (Восточная Сибирь), в т. ч. два (Красноярский ранний, Тулеевский) являются стандартами в госсортоиспытании Красноярского края, республик Хакасия и Тыва.

Подготовка клубней из полевой репродукции банка здоровых сортов для введения в культуру *in vitro* состояла в отборе типичных клонов, от которых в дальнейшем отбирались клубни среднего размера, без внешних повреждений и признаков заболеваний. На следующем этапе клубни маркировались и помещались в культуральной комнате для выгонки ростков. Проращивание проводилось в темноте, при температуре 22 ± 2 °С и относительной влажности воздуха около 70 %. Срок проращивания варьировал в зависимости от сортовых особенностей и составлял 30–60 дней до получения ростков длиной 0,5–2 см. Для введения в культуру *in vitro* использовали этиолированные ростки. После снятия ростков они промывались в течение 5 мин в воде с ПАВ, а затем 10 мин в проточной воде. Оценку эффективности дезинфицирующих агентов проводили на 20 ростках по каждому образцу и варианту опыта. Использовали следующие препараты для поверхностной стерилизации: «Доместос» (5 % гипохлорит натрия, неионогенные (активные) поверхностно-активные вещества, мыло, отдушка), «Белизна» (гипохлорит натрия, активного хлора 95,2 %),

медицинский антисептический раствор (объем этилового спирта – 95 %), перекись водорода (36–38 %), «Цефотаксим» — полусинтетический антибиотик группы цефалоспоринов (эффективен против многих грамположительных и грамотрицательных бактерий). Для разбавления дезинфицирующих агентов использовалась дистиллированная автоклавированная вода. После стерилизационной выдержки экспланты трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Затем ростки высаживали на среду по прописи Мурасиге и Скуга (MS – 1,0, сахара – 20 г/л, без ростостимулирующих фитогормонов, агар для микроклонирования – 7 г/л) в модификации ВНИИКХ [3]. Для установления эффективности стерилизации экспланты осматривались на отсутствие экзофитной инфекции на 3, 5 и 7 день после высадки. Схемы дезинфекции представлены в таблице 1. С момента введения в культуру *in vitro* пробирки с первичными эксплантами размещались на стеллажах в фитотроне с температурой 22 ± 2 °С, освещенностью 5000 лк, влажностью 55–65 %, 15-часовым фотопериодом.

Таблица 1

Варианты дезинфекции ростков картофеля для введения в культуру *in vitro*

| Вариант | Схема дезинфекции | Соотношение компонентов | Стерилизационная выдержка, мин |
|---------|--|-------------------------|--------------------------------|
| 1 | Медицинский антисептический раствор, 70 % | 1 | 5 |
| | Медицинский антисептический раствор 95 %, перекись водорода 3 % | 1 : 1 | 20 |
| 2 | Медицинский антисептический раствор 95 %, перекись водорода 3 % | 1 : 1 | 4 |
| 3 | Медицинский антисептический раствор 70 % | 1 | 5 |
| 4 | Медицинский антисептический раствор 70 % | 1 | 1 |
| | Медицинский антисептический раствор 95 %, перекись водорода 15 % | 1 : 1 | 5 |
| 5 | Медицинский антисептический раствор 95 %, перекись водорода 15 % | 1 : 1 | 4 |
| 6 | Доместос, стерильная дистиллированная вода | 1 : 4 | 10 |
| 7 | Белизна, стерильная дистиллированная вода | 1 : 4 | 10 |
| | Цефотаксим, 4 % водный раствор | 1 | 5 |

Присутствие эндофитной инфекции оценивали спустя 20–25 дней после высадки и отрастания микропобегов.

О наличии инфекции судили по изменению цвета среды, образованию колоний (при бактериальной инфекции) или грибницы и спороношению.

Результаты исследования и их обсуждение. Перечень образцов в коллекции *in vitro* картофеля, поддерживаемых в Красноярском ГАУ, приведен в таблице 2.

Источниками формирования коллекции послужили сорта, полученные из ФГБНУ ВНИИКХ им. А.Г. Лорха (Фаворит, Тулеевский, Жуковский

ранний, Метеор), ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский ГАУ (Аksamит, Пушкинец, Нептун, Северная роза, Лазурит), собственные образцы (Арамис, Красноярский ранний, линия 2108-2), а также перспективные родительские компоненты в селекции (Вега, Гала, Фиолетовый, местный образец Восточной Сибири).

Таблица 2

Образцы картофеля в меристемной коллекции

| Образец | Группа спелости | Устойчивость | Примечание |
|---------------------------|-----------------|---------------|---|
| Фаворит | 05 | Рак, нематода | Пригоден для производства картофеля «фри» |
| Арамис | 05 | Рак, нематода | Сорт совместной селекции Красноярского ГАУ и ВНИИКХ, допущен к использованию по 11-му региону |
| Вега | 03 | Рак, нематода | Столовый сорт с привлекательным внешним видом клубней |
| Тулеевский | 05 | Рак | Допущен к использованию по 4, 10, 11, 12 регионам |
| Гала | 04 | Рак, нематода | Привлекательный внешний вид клубней |
| 2108-2 | 04 | Рак, нематода | Перспективная линия совместной селекции Красноярского ГАУ и ВНИИКХ |
| Пушкинец | 03 | Рак, нематода | Формирование ранней продукции, лёжкасть, допущен к использованию по 11-му региону |
| Нептун | 03 | Рак | Овальные клубни с мелкими глазками, кожура гладкая, желтая |
| Северная роза | 04 | Рак | Пластичный сорт с высокими вкусовыми качествами клубней |
| Лазурит | 03 | Рак, нематода | Дружное формирование ранней продукции, высокая товарность |
| Красноярский ранний | 03 | Рак | Сорт совместной селекции Красноярского ГАУ и ВНИИКХ, допущен к использованию по 5, 10, 11, регионам |
| Местный, Восточная Сибирь | 05 | Восприимчив | Адаптивность, гладкая кожура |
| Фиолетовый | 06 | Рак | Садово-огородный, для диетического питания |
| Жуковский ранний | 03 | Рак, нематода | Раннее формирование товарной продукции, экологическая пластичность |
| Метеор | 01 | Рак, нематода | Раннее формирование товарной продукции, высокая устойчивость к фитофторозу по клубням |
| Ред леди | 03 | Рак, нематода | Экологическая пластичность, привлекательный внешний вид клубней |
| Аksamит | 03 | Рак | Интенсивное накопление урожая |

Использование для поддержания коллекции оздоровленных образцов картофеля чередования полевых и лабораторных репродукций требует регулярного введения в культуру *in vitro* новых эксплантов. Отобранные клоны протестированы на наличие скрытой инфекции, зараженный материал выбракован. Основной проблемой при описанном способе поддержания коллекции является получение асептических

эксплантов. В настоящее время установлена широкая группа эндофитной микрофлоры, представители которой играют как ростостимулирующую, так и ингибирующую роль в развитии растений [8–10]. Однако для исходного материала картофеля в асептической культуре наличие микрофлоры является основанием для выбраковки таких эксплантов.

По результатам исследования не выявлено сортовых особенностей по устойчивости эксплантов к дезинфицирующим агентам. Например, в варианте с максимальным выходом первичных

растений χ^2 фактическое (1,28) меньше χ^2 теоретического (22,4). От выбора стерилизующего агента напрямую зависит сохранение эксплантов в жизнеспособном состоянии (табл. 3).

Таблица 3

**Регенерация первичных эксплантов после обработки дезинфицирующими агентами,
% от общего количества эксплантов**

| Вариант стерилизации | Нежизнеспособных эксплантов/в т. ч. стерильных | Эксплантов с инфекцией: экзо-/эндофитной | Стерильных регенерировавших эксплантов |
|----------------------|--|--|--|
| 1 | 90/80 | 0/0 | 10 |
| 2 | 20/0 | 85/10 | 5 |
| 3 | 30/0 | 90/0 | 10 |
| 4 | 100/100 | 0/0 | 0 |
| 5 | 90/80 | 15/0 | 5 |
| 6 | 60/60 | 0/40 | 20 |
| 7 | 40/40 | 0/10 | 50 |

Применение дезинфицирующих агентов с высокой концентрацией действующих веществ (медицинский антисептический раствор 70; 95 %, перекись водорода 15 %) и их смесей с продолжительным воздействием на экспланты (более 5 мин) приводило к высокой гибели ростков. В то же время в вариантах 1 и 4 не наблюдалось зарастания среды. Сокращение стерилизационной выдержки и концентрации стерилизующих веществ (варианты 2, 3, 5) не привело к существенному повышению количества стерильных жизнеспособных микрорастений. В то же время увеличилось число жизнеспособных микрорастений с экзофитной инфекцией. Низкий выход стерильных эксплантов потребовал разработки новых методов дезинфекции с использованием других стерилизующих агентов. Применение для дезинфекции препарата на основе гипохлорита натрия (вариант 6) показало высокую эффективность в борьбе с поверхностной инфекцией. Однако и в данном случае наблюдалась значительная гибель эксплантов. Это может быть обусловлено наличием в дезинфектанте «Доместос» поверхностно-активных веществ, плохо смываемых дистиллированной водой. Во время отрастания микрорастений при описанном способе дезинфекции наблюдалось развитие эндофитной инфекции, сохранявшейся в области примордий и попадавшей на питательную среду. Замена препарата гипохлорита натрия («Белизна») и использование водного раствора антибиотика «Цефотаксим» для ополаскивания ростков после стерилизационной выдержки (вариант 7) позволили получить макси-

мальное количество стерильных регенерировавших эксплантов.

Выводы. В результате лабораторного эксперимента по влиянию стерилизующих агентов на выход асептических эксплантов не установлено достоверных различий между использованными образцами картофеля. Лучший результат получен при обработке по следующей схеме:

1. Этиолированные ростки обработаны препаратом «Белизна» (действующее вещество – гипохлорит натрия, активного хлора – 95,2 %), разбавленным дистиллированной водой с соотношением компонентов 1 : 4. Стерилизационная выдержка – 10 мин.

2. Двукратное промывание дистиллированной автоклавированной водой и ополаскивание перед высадкой в пробирки антибиотиком «Цефотаксим».

Литература

1. Овзс Е.В., Анисимов Б.В., Симаков Е.А. и др. Особенности морфогенеза *in vitro* и оценка фенотипической идентичности сортовых признаков картофеля // Картофель и овощи. – 2018. – № 7. – С. 33.
2. Полухин Н.И., Мызгина Г.Х., Колошина К.А. Последствие длительного культивирования коллекции *in vitro* в оригинальном семеноводстве картофеля на оздоровленной основе // Достижения науки и техники АПК. – 2016. – Т. 30, № 10. – С. 52–53.

3. Симаков Е.А., Усков А.И., Варицев Ю.А. и др. Новые технологии производства оздоровленного исходного материала в элитном семеноводстве картофеля: рекомендации. – М.: Агропрогресс, 2000. – 80 с.
4. Шахов В.В., Ташматова Л.В., Мацнева О.В. и др. Эффективность стерилизующих агентов при введении сортов вишни в культуру in vitro // Современное садоводство. – 2018. – № 4. – С. 32–37.
5. Косолапова А.С., Ламберова М.Э. Исследование влияния ультразвука на отдельные стадии в технологии культуры растительных клеток и тканей in vitro. I. Стерилизация эксплантов // Химия растительного сырья. – 2010. – № 2. – С. 179–180.
6. Мякишева Е.П., Таварткиладзе О.К., Дурникин Д.А. Новые особенности процесса клонального микроразмножения сорта картофеля селекции Западной Сибири // Биологичний вісник МДПУ. – 2016. – № 1. – С. 375–389.
7. Кушнаренко С.В. и др. Создание коллекции in vitro сортов и гибридов картофеля как исходного материала для криоконсервации // Биотехнология. Теория и практика. – 2013. – № 1. – С. 28–33.
8. Sturz A.V., Christie B.R., Matheson B.G. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy // Canadian Journal of Microbiology, 1998. – Vol. 44, № 2. – P. 162–167.
9. Tian X.L. et al. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities in vitro // World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2004. – Vol. 20, Iss. 3. – P. 303–309.
10. Sturz A.V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization // Plant and Soil, 1995. – Vol. 175, Iss. 2. – P. 257–263.
2. Poluhin N.I., Myzgina G.H., Koloshina K.A. Posledejstvie dlitel'nogo kul'tivirovanija kollekcii in vitro v original'nom semenovodstve kartofelja na ozdorovlennoj osnove // Dostizhenija nauki i tehniki APK. – 2016. – T. 30, № 10. – S. 52–53.
3. Simakov E.A., Uskov A.I., Varicev Ju.A. i dr. Novye tehnologii proizvodstva ozdorovlennogo ishodnogo materiala v jelitnom semenovodstve kartofelja: rekomendacii. – М.: Agroproggress, 2000. – 80 s.
4. Shahov V.V., Tashmatova L.V., Macneva O.V. i dr. Jeffektivnost' sterilizujushhih agentov pri vvedenii sortov vishni v kul'turu in vitro // Sovremennoe sadovodstvo. – 2018. – № 4. – S. 32–37.
5. Kosolapova A.S., Lamberova M.Je. Issledovanie vlijanija ul'trazvuka na otdel'nye stadii v tehnologii kul'tury rastitel'nyh kletok i tkanej in vitro. I. Sterilizacija jeksplantov // Himija rastitel'nogo syr'ja. – 2010. – № 2. – S. 179–180.
6. Mjakisheva E.P., Tavartkiladze O.K., Durnikin D.A. Novye osobennosti processa klonal'nogo mikrorazmnozhenija sorta kartofelja selekcii Zapadnoj Sibiri // Biologichnij visnik MDPU. – 2016. – № 1. – S. 375–389.
7. Kushnarenko S.V. i dr. Sozdanie kollekcii in vitro sortov i gibridov kartofelja kak ishodnogo materiala dlja kriokonservacii // Biotehnologija. Teorija i praktika. – 2013. – № 1. – S. 28–33.
8. Sturz A.V., Christie B.R., Matheson B.G. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy // Canadian Journal of Microbiology, 1998. – Vol. 44, № 2. – P. 162–167.
9. Tian X.L. et al. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities in vitro // World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2004. – Vol. 20, Iss. 3. – P. 303–309.
10. Sturz A.V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization // Plant and Soil, 1995. – Vol. 175, Iss. 2. – P. 257–263.

Literatura

1. Ovjes E.V., Anisimov B.V., Simakov E.A. i dr. Osobennosti morfogeneza in vitro i ocenka fenotipicheskoj identichnosti sortovyh