

УДК 633.49; 630*232.411.4

Толегенова Д., Александрова А., Волков Д., Шамекова М., Жамбакин К.

Институт биологии и биотехнологии растений

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОКЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ В БИОРЕАКТОРЕ ВРЕМЕННОГО ПОГРУЖЕНИЯ

Аннотация

В данной статье описываются результаты оптимизации биотехнологии получения микроклубней картофеля в биореакторе временного погружения. Рынок семенного материала Казахстана нуждается в развитии технологий отечественного производства качественного посадочного материала, обеспечивающий потребности внутреннего рынка. В связи с чем налаживание технологии массового получения посадочного материала в биореакторе имеет большие перспективы в достижении этих целей. В данной работе для оптимизации питательной среды для первого этапа использовалась 3 варианта питательной среды MS с 30 г/л сахарозы: MS без гормонов, MS с BAP 1мг/л и MS с гиббереллиновой кислотой 1мг/л, для второго этапа использовалась одна среда MS с кинетином 1 мг/л и 90 г/л сахарозы. В результате в течении 9 недель культивирования были получены 45 микроклубней из 10 растений картофеля.

Ключевые слова: микроклубни картофеля, биореактор временного погружения, семенной материал.

Введение

Картофелеводство является одним из ключевых отраслей растениеводства, определяющее продовольственную безопасность Казахстана. Казахстан производит до 20% элитных семян картофеля, остальной элитный семенной картофель импортируется из-за рубежа[1]. В 2016 году элитный семенной картофель в основном завозился из Германии 1315 тонн и Нидерландов 1255 тонн. Под картофелем в Казахстане 2016 году было занято 186,7 тыс. га при этом, валовый сбор в составил 3545,7 тыс. тонн. При этом урожайность в 2016 году составила только 19 тонн с гектара, в то время как в Великобритании около 42 т/га, в Северной Америке около 44т/га [2, 3]. Одним из факторов, определяющих низкую урожайность картофеля в Казахстане, является низкое качество семенного материала.

По сравнению с эксплантами, выращенными *in vitro*, микроклубни (размер до 10мм) обладают многими преимуществами. Например, небольшой размер значительно облегчает обработку, хранение и транспортировку по сравнению с растениями *in vitro*. Производство микроклубней не зависит от сезона, потому что они могут производиться в течение года, а наибольшее преимущество микроклубней - короткий период производства для получения первого поколения семян [4]. Кроме того, микроклубни удобны для долгосрочного сохранения зародышевой плазмы, а также для распространения и международного обмена безвирусным материалом [5,6] и для выбора материала в программах селекции растений[4].

В этой работе мы предлагаем использовать биореакторы для производства семенного картофеля. Самые высокие издержки для культивирования тканевых культурах связаны с использованием агара, что составляет до двух третей стоимости за литр среды для культивирования. В биореакторах агар не используется, а жидкая среда используется в виде очень тонкого слоя, вместо того, чтобы погружать растительный материал. При этом, используется большое количество относительно небольших сосудов для растений, которые вручную собираются из разных недорогих деталей. Гидропонная культура в

простых пластиковых сосудах с несколькими уровнями культивирования была проверена на получение микроклубней картофеля [7]. В этом эксперименте дешевые бумажные диски или хлопковые пробки были соединены в каждом слое бумажным мостиком, погруженным в питательный раствор в пластиковый сосуд, и укладывались в отдельные слои с помощью пластиковой опоры. Ускоренный метод позволил получить один микроклубень на экспланте через 30 дней [7]. Массовое получение микроклубней в биореакторах обычно проводят в жидких культурах с использованием различных систем [7,8]. Использование жидких культур по сравнению с твердыми и полутвердыми приводит к увеличению длины побегов, увеличению числа междоузлий и способности получения микроклубней со всех узлов растений [9,10].

Культивирование в жидкой культуре приводит к лучшему росту, поскольку большая площадь эксплантов находится в контакте со средой. Однако есть недостатки в использовании жидких культур, таких как высокая стоимость традиционного биореакторного оборудования и гипергидричность в результате плохого газообмена, поскольку экспланты непрерывно погружаются в среду [11,12]. Ряд методов были протестированы для производства микроклубней в биореакторах: плоские жидкие культуры [13], метод временного погружения в жидкие культуры [8], в том числе приливно отливный способ в стеклянных ферментерах [14], система Rita® [15] и система с двумя стеклянными сосудами [9].

Картофельные микроклубни были получены в биореакторах с большими сосудами, связанными с системой временного погружения (TIS), которая часто используется в системе с двумя потоками [9,12]. Идея состоит в том, что жидкая среда находится в контакте с растительным материалом только в течение короткого периода времени, чтобы избежать гипергидричности, недостатка кислорода и других проблем, которые обычно связаны с жидкими культурами. Временные системы погружения состоят из двух сосудов, один из которых содержит растительный материал, соединенный с другим, который содержит питательную среду. Обычно насос переносит жидкость в сосуд, содержащий растительный материал. Могут контролироваться время и продолжительность погружения. Кроме того, система с двумя сосудами спроектирована таким образом, что сосуды могут быть большого размера. Однако при увеличении размеров сосудов культивируемый материал становится уязвимым к загрязнению. В настоящее время разработано несколько прототипов простых и производительных биореакторов типа TIS [8,9,16]. Так, в одном из биореакторов получено 2,6 микроклубня на эксплант, при общем числе в 390 микроклубней на 10-литровый биореактор [8]. В другом случае из 80 эксплантов получили 229 клубней на 600 мл среды в 5-литровом биореакторе [17], тогда как Пиао с соавторами сообщали о 80 микроклубнях из 50 эксплантов в 1,5 л MS-среды, в 10-литровом TIS биореакторе [8]. Другим фактором, который следует учитывать в исследовании культивирования микроклубней в биореакторе, является размер клубней. Существуют разные мнения относительно оптимального размера микроклубней. для хранения, размах их варьирует 0,1г до 0,2г [18,19]. Микроклубни больше 1,1 г по размеру, оптимальны для прямой посадки в поле [8].

Помимо больших стеклянных сосудов, TIS может быть сделано также в небольших недорогих пластиковых контейнерах. Коммерческий TIS продукт (Rita®) использует прозрачные полисульфоновые сосуды. Тейссон и Альвард протестировали систему Rita® и получили 48-90 микроклубня на сосуд в течение десяти недель [15]. Они получали максимум три микроклубня на один узел, в зависимости от сорта картофеля. Большинство микроклубней были более 0,5 г, но они не испытывались на поле [15]. Другая TIS система, использующая небольшие пластиковые емкости под названием Plantima®, является доступной по цене так же была протестирована на образование клубней *Dioscorea sp.* [20]. Ядровые ферментёры напоминают TIS потому что они используют два сосуда, где растительный материал хранится в одном, а питательный раствор остается главным

образом в другом отдельном сосуде. Акита и Охта ранее использовали банки-ферментеры с подачей воздуха [14]. В таких ферментерах аэрация культур была получена аэрозольным распылением со дна банки. В этих биореакторах, использующих такую полунепрерывную методику поверхностного контроля получали от 100 эксплантов в 10-литровых ферментерах, содержащих 6 литров питательного раствора, были получены от 500 до 960 клубней [14].

Юу с сотрудниками разработали недорогой биореактор, в котором использовались вращающиеся пластиковые сосуды с закрытыми крышками. В этих биореакторах были получены микроклубни более 1 г в 40% из 50 эксплантов, тогда как общее количество 100 микроклубней было получено за 10 недель культивирования в клубнеобразующих средах [21].

Акита и Охта ранее сообщали о подобной вращающейся системе, где 100 микроклубней были получены в сосуде с 200 мл клубне образующей среды [22]. Другой новой системой, использующей метод тонкослойного культивирования, является LiquidLab™ [23]. В LiquidLab™ механизм наклона создается машиной, в результате чего жидкость внутри сосудов для культивирования перемещается из стороны в сторону. Легко контролировать освещение и время наклона. В системе LiquidLab™ сосуды имеют пористые пластыри, прикрепленные к каждой стороне, для аэрации культур. Машины могут одновременно эксплуатировать до 200 сосудов. Система была протестирована для производства микроклубней, где было произведено 75 микроклубней из 50 эксплантов с культуральной средой 200 мл на сосуд [19].

Использование биореактора позволяет получать большое количество микроклубней – до 165 000 штук с 1 куб.м. модульного биореактора [24].

Объекты и методы исследований

В исследовании в качестве исходного материала для получения микроклубней использовались клубни картофеля сорт Романо (суперэлита), рекомендуемых к использованию в Республике Казахстан. Оригинатором сорта является голландская фирма "Агрико" [25].

Клубни картофеля сначала проращивались в земле в контролируемых условиях световой режим 16/8 при температуре 25°C при влажности 60%. После появления листьев растения проводили скрининг на наличие вирусов, таких как PLRV, PVM, PVX, PVS, PVY. Для определения наличия вирусов проводили диагностику.

ИФА проводили с помощью наборов для диагностики растительных вирусов фирмы BIOREBA. Все стадии и расчет концентрации веществ вели как указано в инструкции к наборам. В работе использовались антитела этой же фирмы [26].

Образцы картофеля были введены в культуру *in vitro*. Верхушечную часть стебля срезали, промывали под проточной водой 30 минут, и стерилизовали 50% водном растворе белизны в течении 5-10 минут, затем в 70% спирте 3-5 секунд, внутри ламинарного бокса. Затем обработанные эксплантаты трижды промывали в стерильной дистиллированной водой. Единичные сегменты помещали в пробирки с питательной средой MS без гормонов. Культивировали при температуре 25–26°C, световом режиме 16/8 (день/ночь), освещении 5000 Люкс.

Введенные культуры картофеля использовались в качестве материала для культивирования в биореакторе временного погружения (TIB). Культивирование в биореакторе состоит из 2 этапов. Этап 1. - Единичные узловыe сегменты после стерилизации переносят в биореактор, который содержит 1000 мл жидкой среды и 30 г/л сахарозы, культивируют в течение 5 недель при световом режиме 16/8 (день/ночь) при 25°C. Большое количество побегов выращивают до 13 см в длину. Этап 2 - Всю среду заменяют на 1000 мл жидкой среды, содержащую 90 г/л сахарозы, и культуру инкубируют в темных условиях при 17°C в течение 4 недель. Вся среда переносится из резервного сосуда в биореактор на 2 минуты каждый час и затем отводится обратно в

резервный сосуд, поэтому культура впитывает среду только 2 минуты через каждый час. Биореактор аэрируют стерильным воздухом.

С целью оптимизации питательной среды для получения микроклубней были использованы варианты питательной среды MS без гормонов и MS с BAP 2 мг/л, MS с гиббереллиновой кислотой (GA) 1 мг/л, MS с BAP 1 мг/л и НУК 1 мг/л.

Результаты и обсуждение

По результатам диагностики 4 растений картофеля сорта Романо на наличие вирусов методом ИФА анализа было выявлено только 2 растения, зараженных вирусом PVM. Во всех случаях диагностики вирусов использовали положительный и отрицательный контроль, приложенные к фирменным наборам. Результаты анализа приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Результаты иммуноферментного анализа образцов картофеля

№ образца	Название растений	PLRV	PVX	PVM	PVS	PVY
К-		0,553	0,781	0,522	0,558	0,522
К+		1,978	3,486	1,537	1,541	1,537
1	Романа 3 (с/э)	0,461	0,424	0,628	0,463	0,475
2	Романа 4 (с/э)	0,448	0,430	0,589	0,440	0,468
3	Романа 1 (с/э)	0,463	0,432	0,738	0,456	0,443
4	Романа 2 (с/э)	0,470	0,437	0,757	0,443	0,476

Значения вирусов при $< 0,1-0,2$ ед. от отрицательного контроля для ИФА уже считаются зараженными. Согласно данным, приведенным в таблице 1, в результате ИФА вирусы PLRV, PVS, PVY и PVX не были обнаружены. Вирус PVM обнаружен в 2 исследуемых пробах, однако, титр его не высок, в вариантах Романа 1 (с/э), Романа 2 (с/э).

Все растения картофеля сорта Романо были введены в культуру *in vitro*, однако для культивирования в биореакторе были использованы свободные от вирусов образцы. Экспланты прорастивались в пробирках в течении 4 недель до образования 5-6 листьев, после чего в стерильных условиях под ламинарным боксом разрезали на единичные сегменты. Далее полученные сегменты помещают в сосуд биореактора, где прорастивается картофель и образуются микроклубни. Этот сосуд сообщен с сосудом, содержащим питательную среду MS. При оптимизации сред были использованы 3 варианта MS на первой стадии культивирования: без гормонов, с содержанием BAP 1 мг/л, GA 1 мг/л. В качестве ингибитора роста патогенной микрофлоры добавляли антибиотик Цефотаксим.

В результате наблюдалось ускорение корнеобразования в среде с GA 1 мг/л. При культивировании в эксплантов в среде с BAP 1 мг/л наблюдалось незначительное ускорение корнеобразования по сравнению со средой MS без гормонов.

Таблица - Развитие эксплантов (в днях), со дня посадки единичных сегментов на питательную среду

Вариант	Начало появления корешков	Полноценный корешки
MS без гормонов	10	15
MS + BAP 1г/л	7	14
MS + GA 1мг/л	5	10

В течение роста эксплантов в биореакторе наблюдалось ингибирование роста эксплантов после 3 недель культивирования в одной и той же питательной среде. Это выражалось в уменьшении скорости удлинения корней и побегов. Предположительно это связано с уменьшением концентрацией углеводов- сахарозы [27]. Также при культивировании в течение 3 недель в некоторых случаях наблюдалось заражение среды посторонней микрофлорой, возможно из-за уменьшения действия антибиотика или же ухудшении фильтрации воздуха. Эту проблему решает замена старой питательной среды на новую среду MS.



Рисунок 1- Стадия проращивания эксплантов картофеля

После достижения длины эксплантов картофеля до 7-10 см, питательная среда была заменена на MS для клубнеобразования с 90 г/л сахарозы и кинетина 1 мг/л. Биореактор помещали в термостат для обеспечения затемненных условий и необходимой температуры 17°C. Процесс клубнеобразования начался на первой неделе после обеспечения необходимых условий. Во время клубнеобразования наблюдался рост корней и столонов, в то время как рост побегов практически прекратился.

В результате культивирования в течение 9 недель были получены 45 микроклубней из 10 эксплантов. На одно растение приходилось $4,1 \pm 1,6$ микроклубней. Свежая масса варьировалась от 0,02 г до 1,8 г. В среднем она составила $0,25 \pm 0,2$ г.



Рисунок 2 – Стадия клубнеобразования картофеля на 9 неделе

Таким образом, из одного биореактора объемом 6 литров при культивировании 100 единичных сегментов можно получить 400-500 микроклубней, при расчете, что из одного растения можно получить 4-5 микроклубней.

Выводы

В итоге была проведена работа по проверке суперэлитного картофеля сорта Романо, в результате которого было выявлено 2 растения из 4 заражены вирусом PVM. Эти растения были введены и сохранены в культуре *in vitro* в коллекции лаборатории.

При культивировании в биореакторе наиболее подходящей питательной средой для получения микроклубней является среда MS с 30 г/л сахарозы и гиббереллиновой кислотой 1мг/л на этапе проращивания эксплантов и MS с 90 г/л сахарозы и кинетина 1мг/л. В результате было получено 45 микроклубней с 10 эксплантов, то есть $4,1 \pm 1,6$ микроклубней, со средней свежей массой $0,25 \pm 0,2$ г. Было сделано заключение, что питательную среду необходимо менять каждые 2-3 недели в зависимости от уровня углеводов. В дальнейшем исследования по оптимизации технологии будут продолжены на других отечественных сортах картофеля.

Данная работа была выполнена в рамках проекта «Использование биореактора для высокоэффективного получения безвирусного посадочного материала картофеля» на базе Института биологии и биотехнологии растений.

Литература

1. Новые перспективы семеноводства картофеля в Казахстане http://farmers.kz/ru/news/potato_farming/novye-perspektivy-semenovodstva-kartofelya-v-kazahstane
2. Комитет по статистике МНЭ РК <http://stat.gov.kz>
3. FAOSTAT <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
4. Ranalli, P. The canon of potato science: 24. Microtubers.// Potato Research/- 2007/- Vol. 50.-pp 301–304.
5. Thieme, R. An *in vitro* potato cultivar collection: microtuberization and storage of microtubers.// FAO/IBPGR Plant Genetic Resources Newsletter.- 1992.- Vol. 88/89. pp 17–19.

6. Mix-Wagner, G. The conservation of potato cultivars.// Potato Research.- 1999.- Vol. 42.- pp 427–436.
7. Nhut, D.T., N.H. Nguyen and D.T.T. Thuy. A novel *in vitro* hydroponic culture system for potato (*Solanum tuberosum* L.) microtuber production.// Scientia Horticulturae.- 2006.- Vol. 110 - pp. 230–234.
8. Piao, X.C., D. Chakrabarty, E.J. Hahn and K.Y. Paek. A simple method for mass production of potato microtubers using a bioreactor system.//Current Science.- 2003.- Vol. 84.- pp 1129–1132.
9. Jiménez, E., N. Pérez, M. de Fera, R. Barbón, A. Capote, M. Chávez, E. Quiala and J.C. Pérez. Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system.// Plant Cell, Tissue and Organ Culture.- 1999.- Vol. 59.- pp. 19–23.
10. Jova, M.C., R.G. Kosky, M.B. Pérez, A.S. Pino, V.M. Vega, J.L. Torres, A.R. Cabrera, M.G. García and J. De La Caridad Ventura. Production of yam microtubers using a temporary immersion system.// Plant Cell, Tissue and Organ Culture.- 2005.- Vol. 83.- pp103–107.
11. Eibl, R. and D. Eibl. Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures.// Phytochemistry Reviews.- 2008.- Vol. 7.- pp 593–598.
12. Etienne, H. and M. Berthouly. Temporary immersion systems in plant micropropagation.// Plant Cell, Tissue and Organ Culture.- 2002.- Vol. 69.- pp 215–231.
13. Estrada, R., P. Tovar and J.H. Dodds.. Induction of *in vitro* tubers in a broad range of potato genotypes.//Plant Cell, Tissue and Organ Culture.- 1986.-7.- pp. 3–10.
14. Akita, M. and S. Takayama. Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control.//Plant Cell Reports.- 1994.- Vol. 13.- pp.184–187.
15. Teisson, C. and D. Alvard. *In vitro* production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion.// Potato Research.- 1999.- Vol. 42.- pp 499–504.
16. Ebadi, M., A. Iranbakhsh and G.B. Khaniki. Shoot micropropagation and microtuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.) by the semi-continuous bioreactor.// Pakistan Journal of Biological Sciences.- 2007.- Vol. 10.- pp 861–867.
17. Pérez, N.M., D.C. Restrepo, J.D. García and D.R. Giraldo. *In vitro* tuberization of potato(*Solanum tuberosum* L.) variety Diacol Capiro in temporary immersion bioreactors and grow evaluation in field. //Ciencia.- 2008.- Vol. 16.- pp 288–295.
18. Alix, M.J., S. Savvides, J. Blake, R. Herrmann and R. Hornung. Effects of illumination source, culture, ventilation, and sucrose on potato (*Solanum tuberosum*) microtuber production under short days.// Annals of Applied Biology.- 2001.- Vol.139.- pp 175–187.
19. Kämäräinen-Karppinen, T., E. Virtanen, V.-M. Rokka and A.M. Pirttilä. Novel bioreactor technology for mass propagation of potato microtubers.// Plant Cell, Tissue and Organ Culture.- 2010.- Vol. 101.- pp 245–249.
20. Yan, H., L. Yang and Y. Li. Improved growth and quality of *Dioscorea fordii* Prain et Burk and *Dioscorea alata* plantlets using a temporary immersion system.// African Journal of Biotechnology.- 2011.- Vol. 10.- pp 19444–19448.
21. Yu, W.-C., P.J. Joyce, D.C. Cameron and B.H. McCown. Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors.// Plant Cell Reports.- 2000.- Vol. 19.- pp 407–413.
22. Akita, M. and Y. Ohta. A simple method for mass propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) using a bioreactor without forced aeration.// Plant Cell Reports.- 1998.- Vol. 18.- pp 284–287.
23. Adelberg, J. Efficiency in thin-film liquid system for *Hosta* micropropagation.// Plant Cell, Tissue and Organ Culture.- 2005.- Vol. 81.- pp 359–368.
24. Hulscher M., Krijgsheld H.T., Jongedijk E. Mass propagation of potato microtubers in jar fermentors.//Act. Hort. - 1996. - V. 440. P. 533–537

25. Государственный реестр селекционных достижений, рекомендуемых к использованию в Республике Казахстан – Астана.- 2017 – С. 31-34.

26. <http://www.bioreba.ch/>

27. Yu W.C., Joyce P.J., Cameron D.C., McCown B.H. Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors.// Plant Cell Rep.- 2000.- Vol.19.- pp. 407–413.

Толегенова Д., Александрова А., Волков Д., Шамекова М., Жамбакин К.

Өсімдіктер биология және биотехнология институты

КАРТОП МИКРОТҮЙНЕКТЕРІН УАҚЫТША ТОЛТЫРУ БИОРЕАКТОРЫНДА АЛУ ЖАҒДАЙЛАРЫН ОҢТАЙЛАНДЫРУ

Аңдатпа

Осы мақалада уақытша толтыру биореакторынан картоп микротүйектерін алу биотехнологиясын оңтайландыру нәтижелері сипатталады. Қазақстанның тұқымдық нарығы, ішкі нарық қажеттілік қамтамасыз ететін, отандық сапалы көшет материалдарын өндіріс технологияларын дамытуға мұқтаж. Осыған байланысты биореакторда көшет материалдарын жаппай алу технологиясын оңтайландыру осы мақсаттарға қол жеткізу барысында үлкен жетістіктерге ие. Осы жұмыста бірінші кезеңде қолданылатын қоректік ортаны оңтайландыру үшін 30 г/л сахарозамен 3 нұсқа қолданылды: гормонсыз MS, 1мг/л БАП-мен MS және 1мг/л гибберел қышқылымен MS, екінші кезеңде 1 мг/л кинетинмен MS және 90 г/л сахароза қоректік ортаның нұсқасы қолданылды. 9 апта өсіру нәтижесінде картоптың 10 өсімдігінен 45 микротүйек алынды.

Түйін сөздер: картоп микротүйнектері, уақытша толтыру биореакторы, тұқымдық материал.

Tolengeova D., Aleksandrova A., Volkov D., Shamekova M., Zhambakin K.

Institute of Plant Biology and Biotechnology

OPTIMIZATION OF CONDITIONS OF OBTAINING MICROTUBERS IN THE TIME IMMERSION BIOREACTOR

Annotation

This article describes the results of optimizing the biotechnology of obtaining potato microtubers in the temporary immersion bioreactor. The seed market of Kazakhstan needs to develop technologies of domestic production of quality planting material, providing the requirement of the domestic market. Therefore, establishment of technology for mass production of planting material in the bioreactor has great prospects in achieving these goals. In this study, a nutrient medium MS without hormones, MS with BAP 1 mg / L and MS with gibberic acid 1 mg / L and 30 g / l sucrose for the first stage of cultivation, for the second stage MS with kinetin 1 mg / l and 90 g / l of sucrose is used. As a result, during the 9 weeks of cultivation 45 microtubers from 10 potato plants were obtained.

Key words: potatoes microtubers, temporary immersion bioreactor, seed material.