

ВЫЖИВАЕМОСТЬ И ПРОДУКТИВНОСТЬ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ, ДЛИТЕЛЬНО КУЛЬТИВИРУЕМЫХ *IN VITRO*, В УСЛОВИЯХ ПОЧВЕННОГО СУБСТРАТА

Сайдвали Файзали Сайдализода¹

Зарафо Суфижоновна Киёмова¹

Нигора Нурахмадовна Назарова¹

Курбон Алиев²

Елена Михайловна Олейникова³

¹Таджикский национальный университет

²Институт ботаники, физиологии и генетики растений Академии наук Республики Таджикистан

³Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I

Представлены результаты экспериментальных исследований, проведенных с целью изучению влияния длительности культивирования растений картофеля, прошедших два, четыре пассажа и хранение *in vitro*, на некоторые физиологические показатели растений картофеля. Установлено, что у растений, выращенных *in vitro* и имеющих разное время пассажа, при перенесении в почву выживаемость резко различалась. Так, выживаемость растений при пересадке в почву после двух и четырех пассажей составляла 94%, но при посадке в почву длительно культивируемых резко уменьшалась до 56%, т. е. была примерно в два раза ниже, чем у растений, прошедших два и четыре пассажа *in vitro*. Процесс длительного культивирования, очевидно, оказывается на выживаемости при пересадке в почву, что обусловлено нарушением водного гомеостаза. Эти данные характеризуют разный уровень адаптации разных по длительности культивирования *in vitro* растений в условиях почвы, что связано с низким синтезом цитокининов, зависящим от длительности черенкования. Показано, что вновь введенные в культуру растения способны к микроклубнеобразованию, при этом у длительно культивируемых растений такая способность не выявлена. Отмечены различия как по количеству микроклубней, так и их массе. При повышении концентрации кинетина (с 0,5 до 1,0 мг/л) в культуральной среде МС и при добавлении 0,2 мг/л ИУК наблюдается слабое стимулирование микроклубнеобразования как у вновь введенных, так и длительно культивируемых растений. Полученные результаты свидетельствуют о том, что содержание цитокининов, особенно у длительно культивируемых растений *in vitro*, снижалось независимо от условий их выращивания, что может свидетельствовать о понижении способности синтезировать цитокинины в процессе длительного культивирования.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: картофель, регенеранты, культивирование, гормоны, микроклубни, *in vitro*, почвенный субстрат.

SURVIVAL AND PRODUCTIVITY OF POTATO PLANTS OF LONG-TERM *IN VITRO* CULTIVATION IN THE CONDITIONS OF SOIL SUBSTRATE

Saidvali F. Saydalizoda¹

Zarafo S. Kiyomova¹

Nigora N. Nazarova¹

Kurban Aliev²

Elena M. Oleynikova³

¹Tajik National University

²Institute of Botany, Physiology and Plant Genetics, Academy of Sciences, the Republic of Tajikistan

³Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great

The authors present the results of experimental studies on the effect of duration of cultivation on certain physiological and biochemical parameters of potato plants that have undergone two and four *in vitro* passages and storage. It was established that *in vitro* grown plants with various passage terms had a considerably different survival rate after transfer to soil. For instance, the survival rate of plants transferred to soil after two and four passages was 94%, but decreased sharply for the plants of long-term cultivation. In that case the survival rate

was only 56%, i.e. approximately two times lower than for the plants that had undergone two and four *in vitro* passages. The process of long-term cultivation obviously affects the survival rate after transfer to soil, and this is caused by impaired water homeostasis. This data is characteristic for plants of different *in vitro* cultivation terms exhibiting various levels of adaptation to soil conditions, which is associated with low cytokinin synthesis that depends on the duration of grafting. It was shown that newly inoculated plants are capable of microtuberization, which was not detected in plants of long-term cultivation. Differences were noted both in the number of microtubers and their weight. When the concentration of kinetin in the MSO culture medium was increased (from 0.5 to 1.0 mg/L) and 0.2 mg/L of IAA was added, there was a weak stimulation of microtuberization in both newly inoculated plants and plants of long-term cultivation. The obtained results indicate that the content of cytokinins (especially in plants of long-term *in vitro* cultivation) decreased regardless of growth conditions, which may indicate a decrease in the ability to synthesize cytokinins in the process of long-term cultivation.

KEYWORDS: potato, regenerants, cultivation, hormones, microtubers, *in vitro*, soil substrate.

Bведение

Картофель является одной из распространенных продовольственных культур Таджикистана и его возделывание в экологически чистых горных и предгорных зонах республики имеет большие перспективы как для семеноводства культуры, так и для получения высококачественной продукции. Резкое увеличение валовых сборов картофеля и повышение качества клубней зависят от правильной организации агротехнических и семеноводческих мероприятий [1, 6, 7].

В настоящее время в Таджикистане широкое использование методической базы прикладной биотехнологии позволяет разрабатывать технологии получения свободных от вирусов растений картофеля с высокой потенциальной урожайностью в культуре *in vitro* [1, 5, 7, 11]. Одновременно получили развитие такие теоретические вопросы, как действие и взаимодействие регуляторных факторов (гормонов, углеводов), их роль в реализации генетической информации в процессе репродуктивных функций растений и в управлении этими явлениями в системе *in vitro* и/или *in vivo*.

Наиболее интересные результаты получены при использовании столонов картофеля и их введении в культуру *in vitro*: в экспериментах удалось получить большое количество генетически однородного материала, что позволило ускорить фазы инициации и фазы роста клубнеобразования *in vitro* [1, 3]. В предыдущих работах мы показали, что длительное культивирование растений картофеля *in vitro* нуждается в добавлении в среду значительного количества цитокининов [3, 8]. При этом наиболее заметным является изменение морфологических признаков, особенно образование корней. Поскольку цитокинины способны контролировать образование корней и другие процессы, обеспечивающие укоренение и рост в условиях почвы и, как следствие, адаптацию растений, то логично предположить, что процесс длительного культивирования *in vitro* влияет на содержание фитогормонов [4, 9, 10].

Целью данной работы являлось изучение влияния длительности культивирования растений картофеля, прошедших два, четыре пассажа и хранение *in vitro*, на некоторые физиологико-биохимические показатели.

Методика эксперимента

В экспериментах использовали растения картофеля сорта Файзабад, выращенные *in vitro* и перенесенные из пробирок в почву.

Пробирочные растения выращивали на питательной среде Мурасиге-Скуга, содержащей сахарозу (5%), ИУК (0,2 мг/л) и глицин (0,1 мг/л).

Освещенность поддерживали на уровне 6 тыс. люкс. Размножение растений повторяли 25 дней в течение 8 лет *in vitro*.

Приживаемость растений учитывали при высадке пробирочных растений в почву.

Содержание цитокининов в побегах растений определяли иммуноферментным анализом по С.Ю. Веселову [2]. В экспериментах учитывали микроклубнеобразование *in vitro* растений, вновь введенных в культуру, а также культивируемых в течение 8 лет.

Относительное содержание воды (ОСВ) определяли по формуле [13]:

$$OCB = (m_{сыр} - m_{сух}) / (m_{тург} - m_{сух}) \cdot 100\%,$$

где $m_{сыр}$ – масса сырого веса,

$m_{сух}$ – масса сухого веса,

$m_{тург}$ – насыщенный водный вес.

В таблицах приведены средние арифметические значения из трех вегетационных опытов и трехкратной средней ошибки. Аналитическая повторность четырехкратная.

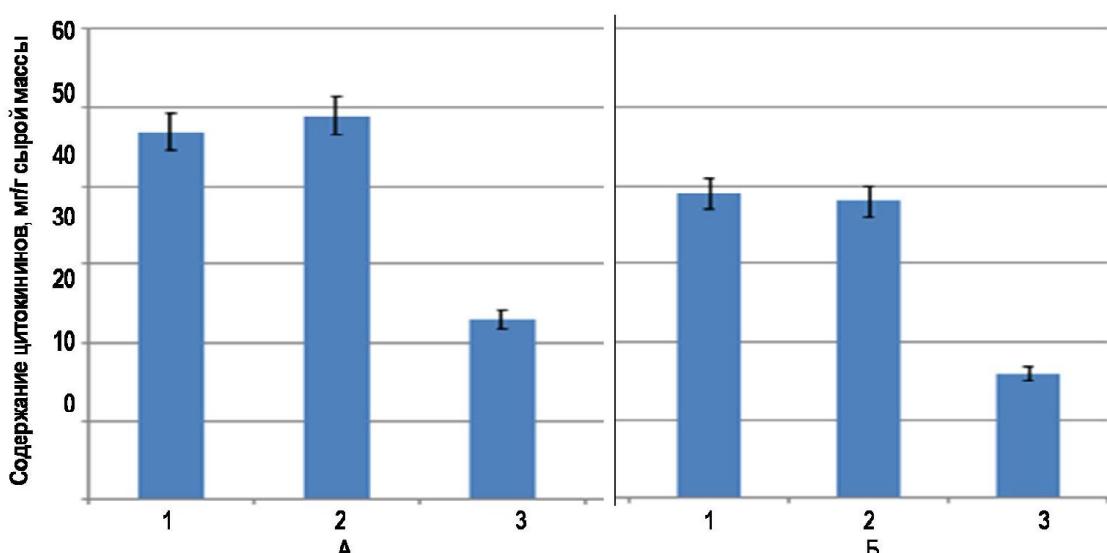
Результаты и их обсуждение

На рисунке представлено суммарное содержание цитокининов у вновь введенных в культуру растений в нескольких вариантах:

1 – растения, прошедшие два черенкования;

2 – растения, прошедшие четыре черенкования;

3 – растения после 8 лет культивирования *in vitro*.



Анализ суммарного содержания цитокининов у растений, прошедших разные сроки культивирования *in vitro*: А – *in vitro*; Б – растения в условиях почвы; 1 – два черенкования; 2 – четыре черенкования; 3 – 8 лет культивирования *in vitro*

Как видно из данных, представленных на рисунке, длительное культивирование растений картофеля *in vitro* приводило к уменьшению суммарного содержания цитокининов примерно в 2 раза (позиции А3 и Б3 на рис.). Это проявлялось как при культивировании растений в пробирках, так и в почве.

Вновь введенные в культуру растения (два и четыре черенкования) не отличались между собой по суммарному содержанию цитокининов. Однако при пересадке в почву вновь введенные и длительно культивируемые растения существенно различались по содержанию цитокининов, т. е. при переносе в почву через 8 лет культивирования растения не полностью восстанавливают синтез цитокининов. Так, у растений, высаженных в почву после 8 лет культивирования *in vitro*, содержание цитокининов составило 16 мг/г сырой массы, тогда как у растений, высаженных после двух и четырех черенкований, – соответственно 39 и 38 мг/г сырой массы.

Изменение содержания цитокининов, особенно у длительно культивируемых растений *in vitro*, проявились независимо от условий их выращивания, что может свидетельствовать о понижении способности синтезировать цитокинины в процессе длительного культивирования. Этот факт наводит на мысль о том, что снижение содержания цитокининов в надземной части (побеги) является характерной особенностью картофеля, длительно культивируемого в условиях *in vitro*.

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ НАУКИ

Известно, что при высадке пробирочных растений в почвенный субстрат многие из них либо повреждаются, либо погибают. В наших экспериментах отмечены как увядание, так и гибель растений, которые прошли 8 лет культивирования *in vitro* (табл. 1).

Таблица 1. Выживаемость пробирочных растений в почве

Варианты	Количество растений, шт.	Количество выживших, шт.	Потери при высадке в почву, %
Два черенкования	180	169 ± 10	94
Четыре черенкования	180	171 ± 11	95
Восемь лет культивирования	180	102 ± 9	56

Как показывают результаты учета, приживаемость при перенесении в почву пробирочных растений, имеющих разное время пассажа, резко различалась. Так, выживаемость при пересадке в почву растений двух и четырех пассажей составляла 94%, и резко уменьшалась при посадке в почву длительно культивируемых. Выживаемость длительно культивируемых растений составила 56%, т. е. примерно в два раза ниже, чем растений, прошедших две и четыре посадки *in vitro*. Эти данные характеризуют разный уровень адаптации растений в условиях почвы у разных по длительности культивирования *in vitro* растений, что связано с низким синтезом цитокининов в зависимости от времени посадки в почву. Процесс длительного культивирования, очевидно, сказывается на выживаемости при пересадке в почву, за счет нарушения водного гомеостаза у растений, что видно из данных таблицы 2.

Таблица 2. Относительное содержание воды в листьях растений картофеля

Варианты	ОСВ	Водный дефицит, %
Два черенкования	0,868	13,2 ± 1,8
Четыре черенкования	0,842	14,8 ± 1,7
Восемь лет культивирования	0,632	36,8 ± 2,6

По данным таблицы 2 можно отметить существенные различия показателей относительного содержания воды (ОСВ) между вариантами опыта. Так, у вновь введенных в культуру растений водный дефицит составляет примерно 13–15%, а у длительно культивируемых растений – более 36%. Отмеченные различия свидетельствуют о том, что скорость потери воды играет главную роль в адаптации растений в условиях почвы (*in vivo*).

Такой эффект, очевидно, является следствием нарушения синтеза цитокининов при длительном культивировании в условиях стресса, поскольку пересадка растений в почву является стрессующим фактором, требующим быстрых адаптивных реакций, которые нарушены у растений при длительном культивировании *in vitro*, при этом также нарушается процесс микроклубнеобразования (продуктивность) (табл. 3).

Таблица 3. Микроклубнеобразование у разных по длительности культивирования *in vitro* растений

Варианты	Количество микроклубней, шт.	Вес одного микроклубня, мг
Кинетин (0,5 мг/л), ИУК (0,2 мг/л), глицин (0,1 мг/л), сахароза (5%)		
Два черенкования	1,83	410 ± 12
Четыре черенкования	1,82	402 ± 13
Восемь лет культивирования	0,32	12 ± 2
Кинетин (1,0 мг/л), ИУК (0,2 мг/л), глицин (0,1 мг/л), сахароза (5%)		
Два черенкования	1,88	525 ± 16
Четыре черенкования	1,97	532 ± 17
Восемь лет культивирования	0,83	112 ± 12

Известно, что цитокинины способны стимулировать микроклубнеобразование *in vitro* [12, 14, 15]. В наших экспериментах с экзогенным кинетином была определена способность к микроклубнеобразованию у разных по длительности культивирования растений (табл. 3, приведено среднее значение для 10 пробирочных растений).

Из данных таблицы 3 видно, что реакция растений к экзогенным цитокининам (кинетин) у вновь введенных в культуру растений и у растений при длительном культивировании отличается.

При использовании 0,5 мг/л кинетина в культуральной среде и при добавлении 0,2 мг/л ИУК и 5% сахарозы вновь введенные в культуру растения способны к микроклубнеобразованию, что не выявлено у длительно культивируемых растений. Эти различия явно видны как по количеству микроклубнеобразования, так и по массе. При повышении концентрации кинетина до 1,0 мг/л наблюдается слабое стимулирование микроклубнеобразования как у вновь введенных, так и длительно культивируемых растений. Различия у растений разных сроков культивирования (2 черенкования, 4 черенкования и 8 лет культивирования) существенны.

Таким образом, при низких концентрациях цитокинина было обнаружено слабое столоно-микроклубнеобразование у культивируемых в течение восьми лет растений, а при повышенной концентрации наблюдалось определенное стимулирование образования микроклубней *in vitro*.

Выводы

1. Вновь введенные в культуру растения (два и четыре черенкования) не отличались между собой по суммарному содержанию цитокининов. При пересадке в почву вновь введенные и длительно культивируемые растения существенно различались по содержанию цитокининов, т. е. при переносе в почву через 8 лет культивирования растения не полностью восстанавливают синтез цитокининов.

2. Процесс длительного культивирования, очевидно, сказывается на процессе выживаемости при пересадке в почву, что связано с нарушением водного гомеостаза и синтеза цитокининов. Отмечены существенные различия относительного содержания воды (ОСВ) у вновь введенных и длительно культивируемых растений *in vitro*.

3. При использовании 0,5 мг/л кинетина в культуральной среде и при добавлении 0,2 мг/л ИУК и 5% сахарозы вновь введенные в культуру растения способны к микроклубнеобразованию, при этом такая способность не выявлена у длительно культивируемых растений. Эти различия отмечены как по количеству микроклубней, так и их массе. При повышении концентрации кинетина до 1,0 мг/л наблюдается небольшое стимулирование микроклубнеобразования как у вновь введенных, так и длительно культивируемых растений. Различия у растений разных сроков культивирования (2 черенкования, 4 черенкования и 8 лет культивирования) существенны.

Библиографический список

1. Алиев К.А. Биотехнология растений: культура столонов – новый способ оздоровления растений картофеля / К.А. Алиев, Н.Н. Назарова, А.Ф. Салимов. – Душанбе : Дониш, 2014. – 114 с.
2. Веселов С.Ю. Использование антител для количественного определения, очистки и локализации регуляторов роста растений / С.Ю. Веселов. – УФА : БашГУ, 1998. – 136 с.
3. Микроклубнеобразование столоновых растений картофеля *in vitro* в зависимости от условий культивирования / М. Шкурова, Н.Н. Назарова, З.Б. Давлятназарова, А.Ф. Салимов, К.А. Алиев // Известия АН РТ. – 2007. – № 3. – С. 39–44.
4. Медведев С.С. Физиология растений : учебник / С.С. Медведев. – Санкт-Петербург : БХВ-Петербург, 2013. – 496 с.
5. Мирзохонова Г.О. Влияние фитогормонов и водного дефицита на инициацию, рост клубней и активность белоксинтезирующей системы растений-регенерантов картофеля *in vitro* : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.12 / Г.О. Мирзохонова. – Душанбе, 2006. – 128 с.

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ НАУКИ

6. Особенности выращивания микроклубней картофеля в биотехнологической системе / М.А. Чернобровкина, С.Л. Чернобровкин, Ю.Ц. Мартиросян, В.В. Розанов, О.С. Мелик-Саркисов // Сельскохозяйственная биология. – 1994. – № 3. – С. 65–72.
7. Партоев К. Селекция и семеноводство картофеля в условиях Таджикистана / К. Партоев. – Душанбе : Дониш, 2013. – 190 с.
8. Регуляция некоторых морфологических признаков генотипов картофеля *in vitro* в условиях засоления / С.Ф. Караев, З.С. Киемова, Н.Н. Назарова, К.А. Алиев // Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды : сб. матер. Всероссийской научной конф. с международным участием и школы молодых ученых. – Иркутск, 2018. – Ч. II. – С. 1258–1263.
9. Романов Г.А. Как цитокинины действуют на клетку / Г.А. Романов // Физиология растений. – 2009. – Т. 56. – С. 294–311.
10. Симаков Е.А. Генетические и методологические основы повышения эффективности селекционного процесса картофеля : автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук : 06.01.05 / Е.А. Симаков. – Москва, 2010. – 48 с.
11. Технологический процесс воспроизводства исходного семенного картофеля на оздоровленной основе / Х. Эмомов, Н.Н. Назарова, Р.С. Бобохонов, А.Ф. Салимов, С.Х. Ашурев, М.К. Алиев // Кишоварз. – 2010. – № 3 (47). – С. 16–18.
12. Чайлахян М.Х. Фотопериодическая и гормональная регуляция клубнеобразования у растений / М.Х. Чайлахян. – Москва : Наука, 1984. – 69 с.
13. Barrs H.D. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves / H.D. Barrs, P.E. Weatherley // Australian Journal of Biological Sciences. – 1962. – Vol. 15. – Pp. 413–428.
14. Kakimoto T. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases // Plant & Cell Physiology. – 2001. – Vol. 42 (7). – Pp. 677–685. DOI: org/10.1093/pcp/pce112.
15. Potato breeding in India / S.K. Luthra, S.K. Pandey, B.P. Singh, G.S. Kang, S.V. Singh, P.C. Pande // CPRI, Shimla Technical Bulletin. – 2006. – No. 74. – 90 p.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ Принадлежность к организации

Сайдвали Файзали Сайдализода – ассистент кафедры физиологии растений и биотехнологии, Таджикский Национальный университет, Республика Таджикистан, г. Душанбе, e-mail: saidvali-1989@mail.ru.

Зарафо Суфижоновна Киёмова – кандидат биологических наук, зав. кафедрой физиологии растений и биотехнологии, Таджикский национальный университет, Республика Таджикистан, г. Душанбе, e-mail: venera_2002@mail.ru.

Нигора Нурахмадовна Назарова – доктор сельскохозяйственных наук, профессор кафедры физиологии растений и биотехнологии, Таджикский национальный университет, Республика Таджикистан, г. Душанбе, e-mail: lab.gen@mail.ru.

Курбон Алиев – доктор биологических наук, член-корр. Академии наук Республики Таджикистан, зав. лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии растений, Институт ботаники, физиологии и генетики растений АН РТ, Республика Таджикистан, г. Душанбе, e-mail: lab.gen@mail.ru.

Елена Михайловна Олейникова – доктор биологических наук, профессор кафедры селекции, семеноводства и биотехнологий ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I», Россия, г. Воронеж, e-mail: cichor@agronomy.vsau.ru.

Дата поступления в редакцию 12.02.2019

Дата принятия к печати 28.04.2019

AUTHOR CREDENTIALS Affiliations

Saidvali F. Saydalizoda, Assistant, the Dept. of Plant Physiology and Biotechnology, Tajik National University, the Republic of Tajikistan, Dushanbe, e-mail: saidvali-1989@mail.ru.

Zarafo S. Kiyomova, Candidate of Biological Sciences, Head of the Dept. of Plant Physiology and Biotechnology, Tajik National University, the Republic of Tajikistan, Dushanbe, e-mail: venera_2002@mail.ru.

Nigora N. Nazarova, Doctor of Agricultural Sciences, Professor, the Dept. of Plant Physiology and Biotechnology, Tajik National University, the Republic of Tajikistan, Dushanbe, e-mail: lab.gen@mail.ru.

Kurban Aliev, Doctor of Biological Sciences, Corresponding Member, Academy of Sciences of the Republic of Tajikistan, Institute of Botany, Physiology and Genetics of Plants, Academy of Sciences of the Republic of Tajikistan, the Republic of Tajikistan, Dushanbe, e-mail: lab.gen@mail.ru.

Elena M. Oleynikova, Doctor of Biological Sciences, Professor, the Dept. of Plant & Seed Selection Dredging, and Biotechnologies, Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great, Russia, Voronezh, e-mail: cichor@agronomy.vsau.ru.

Received February 12, 2019

Accepted April 28, 2019