

**МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАНА
ТАШКЕНТСКИЙ ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ**

На правах рукописи

УДК: 577.857.7:581.143.5.633.511

АБДУРАХМАНОВА МАЪСУДА ЮСУПОВНА

**ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА МИКРОКЛОНИРОВАНИЯ
КАРТОФЕЛЯ**

Специальность 5А320501-биотехнология (по видам продукции)

ДИССЕРТАЦИЯ

**На соискание академической степени
магистра**

**Научный руководитель:
д.х.н., проф. Ташмухамедов М.С.**

Ташкент -2013

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
Глава I ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1 Биотехнология картофеля.....	8
1.2 Современное состояние исследований в области роли цитокининов в регуляции процессов роста и развития высших растений.....	13
1.3 Значение цитокининов в культуре тканей высших растений.....	19
Глава II МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	
2.1 Условия проведения эксперимента.....	23
2.2 Методы проведения эксперимента.....	24
2.3 Основные объекты проводимого эксперимента.....	24
Глава III РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	
3.1. Культивировании картофеля <i>in vitro</i>	26
3.2 Определение структурной и концентрационной зависимости действия экзогенных цитокининов при культивировании картофеля <i>in vitro</i>	29
3.3 Определение влияния физиологического состояния латеральной почки и цитокининов на процессы регенерации.....	38
3.4 Интенсивность процесса клубнеобразования в зависимости от яруса расположения латеральной почки и экзогенных цитокининов.....	40
3.5 Стандартизация процессов микроразмножения и получения микроклубней.....	49
ВЫВОДЫ	56
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	57
ПРИЛОЖЕНИЕ	64

**МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО ОБРАЗОВАНИЯ
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ТАШКЕНТСКИЙ ХИМИКО- ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ**

Факультет: Отдел магистратуры	Магистр: Абдурахманова Маъсуда Юсуповна
Кафедра: ”Биотехнология”	Научный руководитель: д.х.н., проф. М.С.Ташмухамедов
Учебный год: 2012-2013	Специальность: 5А320501 - биотехнология (по видам продукции)

**АННОТАЦИЯ МАГИСТРСКОЙ ДИССЕРТАЦИИ НА ТЕМУ
“ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА МИКРОКЛОНИРОВАНИЯ
КАРТОФЕЛЯ”**

Актуальность темы: Для условий культивирования, большое значение при индукции различных морфогенетических процессов имеет использование биологически активных веществ регуляторного характера действия, наиболее активными из которых являются фитогормоны. В связи с этим большее внимание уделяется изучению взаимосвязи между эксплантом и используемыми фитогормонами. В настоящее время определено, что среди фитогормонов наиболее активное участие в регуляции процессов роста и развития принимают цитокинины. Именно поэтому без экзогенных цитокининов не обходится ни один биотехнологический процесс.

Цель и задачи работы: определение реакции апикальных и латеральных, находящихся на разных ярусах, почек растений картофеля *in vitro* на определенные соотношения экзогенных цитокининов. Задачи:

- Определение регенерационной активности адвентивных почек, находящихся на разном удалении от апекса побега, в отсутствие регуляторов роста.

- Определение влияния цитокининов различной структуры на регенерационную активность адвентивных почек, находящихся на разном удалении от апекса побега.

- Определение влияния различных концентраций экзогенных цитокининов на регенерационную активность адвентивных почек, находящихся на разном удалении от апекса побега.

- Установка оптимального соотношения между эксплантом и экзогенным цитокинином, обеспечивающего максимальный коэффициент микроклонального размножения картофеля.

Объект и предмет исследования: микрочеренки – участок стебля с латеральной почкой и листовой пластинкой культивируемого в Узбекистане сорта картофеля Невский, и новых перспективных сортов картофеля Сарнав и Пском, относящихся к тетераплоридному виду *Solanum tuberosum* L.

Методика и методы исследования: - микроклональное размножение на основе индукции к росту адвентивных побегов;

- индукция процесса клубнеобразования у растений картофеля *in vitro*;
- адаптация к грунту растений и микроклубней картофеля, полученных *in vitro*.

Степень новизны итогов исследования с научной точки зрения: Испытано в лабораторных условиях, получены результаты.

Адвентивные почки, находящиеся на разном удалении от апекса побега и корневой системы, обладают различной регенерационной активностью. Наибольшими темпами роста отличаются почки, находящиеся в средней части растения.

Практическое значение и применения итогов исследования: Организация в Узбекистане производства семенного материала элитных классов такой важной продовольственной культуры как картофель, внесет определенный вклад в обеспечение продовольственной безопасности и независимости государства. Полученные результаты будут использованы при составлении технических условий и технологических инструкций по производству микроклубней картофеля.

С помощью размножения *in vitro* возможно в течение полугода из десяти исходных стерильных растений получить свыше полумиллиона растений, способных адаптироваться и вегетировать в грунте. Клубни, полученные в искусственных условиях по сравнению с растениями, полученными в этих же условиях, легко адаптируются к открытому грунту. В настоящее время наиболее экономически оправданным является получение семенного материала картофеля на основе метода культивирования изолированных апикальных меристем и получения микроклубней.

Структура и состав работы: состоит из введения диссертации, 3 глав (литературный обзор, материалы и полученные результаты и их обсуждение), выводы, используемый список литературы и приложение. Общий объем диссертации 64 страниц, в нем содержится 10 рисунков и 10 таблиц. Список использованной литературы 60. Представлены научные работы и достижения ближнего и дальнего зарубежья.

Основные результаты выполненной работы: Анализ действия на рост и развитие растений картофеля цитокининов различной структуры выявили, что среди бензиламинопурина, фурфуроаминопурина и изопентиламинопурина наиболее активным является бензиламинопурин, но наиболее эффективным для размножения картофеля является фурфуроламинопурин. Определено, что для микроразмножения растений наиболее эффективным является культивирование микрочеренков средних ярусов в присутствии фурфуроламинопурина в концентрации 1×10^{-8} М. Для индукции процесса клубнеобразования у прикорневой части растения также

наиболее эффективным является фуруроламинопури в концентрации $1 \times 10^{-8} \text{M}$. Для индукции процесса клубнеобразования у апикальной части растения требуется повышение концентрации фуруроламинопурина до $1 \times 10^{-4} \text{M}$. При микроклональном размножении картофеля наиболее эффективным является использование прикорневой и апикальной частей растений для индукции процесса клубнеобразования, средняя часть растения должна использоваться для регенерации растений и микрочеренкования.

Краткое обобщенное выражение заключения и предложений:

1. Адвентивные почки, находящиеся на разном удалении от апекса побега и корневой системы обладают различной регенерационной активностью. Наибольшими темпами роста отличаются почки, находящиеся в средней части растения.

2. Анализ действия на рост и развитие растений картофеля цитокининов различной структуры выявил, что среди бензиламинопурина, фуруроаминопурина и изопентиламинопурина наиболее активным является бензиламинопури, но наиболее эффективным для размножения картофеля является фуруроламинопури.

3. Было определено, что для микроразмножения растений наиболее эффективным является культивирование микрочеренков средних ярусов в присутствии фуруроламинопурина в концентрации $1 \times 10^{-8} \text{M}$.

4. Для индукции процесса клубнеобразования у прикорневой части растения также наиболее эффективным является фуруроламинопури в концентрации $1 \times 10^{-8} \text{M}$.

5. Для индукции процесса клубнеобразования у апикальной части растения требуется повышение концентрации фуруроламинопурина до $1 \times 10^{-4} \text{M}$.

6. Было определено, что при микроклональном размножении картофеля наиболее эффективным является использование прикорневой и апикальной частей растений для индукции процесса клубнеобразования, средняя часть растения должна использоваться для регенерации растений и микрочеренкования.

Полученные в ходе выполнения данной работы результаты будут использованы при составлении технических условий и технологических инструкций по производству микроклубней картофеля.

Научный руководитель:

Магистр:

**THE MINISTRY OF HIGH AND SECONDARY EDUCATION
OF THE REPUBLIC OF UZBEKISTAN
TASHKENT CHEMICAL-TECHNOLOGICAL INSTITUTE**

Faculty: department of the master	Master: Abdurahmonova Masudi Yusupovna
Department: Biotechnology	Scientific leader: prof. M.C.Tashmuhamedov
Educational year: 2012-2013	Profession: 5A320501-biotechnology (on production typus)

**ANNOTATION TO THE MASTER'S DISSERTATION ON THE THEME:
«PROCESS OPTIMIZATION MICROPROPAGATION POTATOES»**

The actuality of the theme: mikroshoot - section of the stem with the lateral bud and leaf blade of cultivated potato varieties in Uzbekistan Nevsky, and promising new varieties of potatoes and Sarnano Pskom related to tetraploid form of *Solanum tuberosum* L.

The aim and tasks of the work: to determine, based on the study of the relationship between the physiological state of the explant and exogenous cytokinins.

- To develop the most effective method of micropropagation the improved source material, which brings together in a single cycle plant reproduction and receipt of potato microtubers.

- Definition of regenerative activity of adventitious buds, which are at different distances from the apex of the shoot, in the absence of growth regulators.

- Determination of the effect of cytokinin different structure and different concentrations of activity on regeneration of adventitious buds, which are at different distances from the apex of the shoot.

- Setting the optimum ratio between the explants and exogenous cytokinin, providing maximum efficiency micropropagation of potatoes.

The object and the subject of the research: micropropagation based on induction to the growth of adventitious shoots; induction process in potato tubers in vitro; adaptation to the soil and plants of potato microtubers produced in vitro.

The scientific novelty degree of research results: It was found that adventitious buds that are at different distances from the apex of the shoot and root system, have different regenerative activity. The highest rates of growth differ in kidney, are in the middle of the plant. Analysis of the effect on the growth and development of the potato plant cytokinin different structures revealed that among benzylaminopurine, furfuroaminopurina izopentilaminopurina and is the most active benzylamino-purine, but the most effective for the reproduction of the potato is furfurolaminopurin. It was determined that for the micropropagation of plants is the most efficient cultivation mikrocherenkov middle tiers in the presence furfurolaminopurina concentration 1×10^{-8} M. For the induction process of tuber in

basal parts of the plant are also the most effective at a concentration furfurolaminopurin $1 \times 10^{-8} \text{M}$. For the induction of tuber formation process in the apical parts of the plant requires high concentration furfurolaminopurina to $1 \times 10^4 \text{M}$. When the potato micropropagation is the most effective use of basal and apical parts of the plant to induce the process of tuber, the middle part of the plant is to be used for the regeneration of plants and mikrocherenkovaniya. **The practical importance and applying of research results:** the organization of production in Uzbekistan seed elite classes such important food crops like potatoes, will make a definite contribution to food security and independence of the State. The results obtained in the course of this work the results will be used in the preparation of technical specifications and technological instructions for the production of potato microtubers.

The structure and the staff of the work: consists of entering the theses, 3 parts (the literary review, used sources and material, results and their discussion), findings, used list of the literature and exhibit. The General amount of the dissertation 64 pages, it includes 10 pictures and 10 tables. Seen literatures are 60. Scientific work and achievements of our country and abroad are viewed.

The main results of the done work:

In base of the theses 2 scientific works, 2 theses were published.

The Short Generalized Expression of Conclusion and offers:

It was found that adventitious buds that are at different distances from the apex of the shoot and root system, have different regenerative activity. The highest rates of growth differ in kidney, are in the middle of the plant. Analysis of the effect on the growth and development of the potato plant cytokinin different structures revealed that among benzylaminopurine, furfuroaminopurina izopentilaminopurina and is the most active benzylamino-purine, but the most effective for the reproduction of the potato is furfurolaminopurin. It was determined that for the micropropagation of plants is the most efficient cultivation mikrocherenkov middle tiers in the presence furfurolaminopurina concentration $1 \times 10^{-8} \text{M}$. For the induction process of tuber in basal parts of the plant are also the most effective at a concentration furfurolaminopurin $1 \times 10^{-8} \text{M}$. For the induction of tuber formation process in the apical parts of the plant requires high concentration furfurolaminopurina to $1 \times 10^4 \text{M}$. When the potato micropropagation is the most effective use of basal and apical parts of the plant to induce the process of tuber, the middle part of the plant is to be used for the regeneration of plants and mikrocherenkovaniya.

The results may be using it in composition of instruction for of potato microtubers receipt in industry.

Scientific leader:

Master's student:

**ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС
ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ
ТОШКЕНТ КИМЁ-ТЕХНОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ**

Факультет: Магистратура бўлими	Магистратура талабаси: Абдурахманова Маъсуда Юсуповна
Кафедра: ”Биотехнология”	Илмий раҳбар: к.ф.д.,проф. М.С.Ташмухамедов
Ўқув йили: 2012-2013	Мутахассислик: 5А320501 - биотехнология (махсулот турлари бўйича)

**“КАРТОШКАНИ МИКРОКЛОНЛАШ ЖАРАЁНИНИ
МЎТАДИЛЛАШТИРИШ” МАВЗУСИДАГИ МАГИСТРЛИК
ДИССЕРТАЦИЯСИНИНГ АННОТАЦИЯСИ**

Мавзунинг долзарблиги: Культуралаш шароити учун, турли морфогенетик жараёнларни индукциялаш учун бошқариш таъсир характериға эға бўлган биологик актив моддалардан фойдаланиш катта ахамиятға эға, улардан энг фаоли фитогормонлардир. Шунинг учун эксплант билан фойдаланиладиган фитогормон орасидаги ўзаро боғлиқликни ўрганишға катта эътибор қаратилмоқда. Хозирги кунда аниқланишича фитогормонлар орасида ўсиш ва ривожланиш жараёнларини бошқаришда цитокининлар фаолроқ иштирок этар экан. Айнан шунинг учун ҳам экзоген цитокининларсиз бирорта биотехнологик жараён амалға ошмайди.

Ишнинг мақсади ва вазифалари: in vitro картошка ўсимликларини турли ярусларда жойлашган апикал ва латерал куртакларнинг экзоген цитокининларнинг маълум нисбатига реакциясини аниқлаш

Вазифалари:

- Ўсишни бошқарувчи регуляторлар иштирокисиз ниҳол апексидан турли узокликда жойлашган адвентив куртакларнинг регенерацияланиш фаоллигини аниқлаш.

- Ҳар-хил структурали цитокининларни ниҳол апексидан турли узокликда жойлашган адвентив куртакларнинг регенерацияланиш фаоллигига таъсирини аниқлаш.

-Турли концентрацияли цитокининларни ниҳол апексидан турли узокликда жойлашган адвентив куртакларнинг регенерацияланиш фаоллигига таъсирини аниқлаш

- Картошканинг микроклонал кўпайишининг максимал коэффициентини таъминловчи эксплант ва экзоген цитокинин орасидаги оптимал нисбатни ўрнатиш.

Тадқиқот объекти ва предмети: *Solanum tuberosum* тетраплоид туркумига кирувчи картошканинг Ўзбекистонда ўстириладиган Невсий нави ва янги истикболли Сарнав ва Пском навларининг микроқаламчалари - поянинг латерал куртакли ва барг пластинкали қисми.

Тадқиқот услубияти ва услублари: - адвентив куртаклар ўсишини индукциялаш асосида клонли микрокўпайтириш;

-in vitro шароитида картошка ўсимлиги туганак ҳосил қилиш жараёни индукциялаш;

-in vitro шароитида олинган картошка ўсимлиги ва микротуганакларининг тупроқга мослашуви;

Тадқиқот натижаларининг илмий жиҳатдан янгилик даражаси: Лаборатория шароитида синалди ва натижалар олинди.

Ниҳолнинг апекси ва илдиз тизимидан турли масофада жойлашган адвентив куртаклар турлича регенерацияланиш фаоллигига эга. Ўсимликнинг ўрта қисмида жойлашган куртаклар тезроқ ўсиши билан фарқ қилади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти ва татбиқи:

Ўзбекистонда истеъмол учун ишлатиладиган картошка каби муҳим ўсимликнинг элита синфига мансуб экиш материалларини ишлаб чиқариш, озиқ-овқат хавфсизлиги ва Давлатнинг мустақиллигини таъминлашда муҳим ҳиссасини қўшади. Олинган натижалар картошканинг микротуганакларини ишлаб чиқариш бўйича техник шароитлар ва технологик қўлланмалар яратишда фойдаланилади.

Ўсимликларни in vitro усулида кўпайтириш ёрдамида ярим йил давомида ўнта дастлабки стерил ўсимликдан тупроқга мосланувчан ва вегетацияланадиган ярим миллиондан ортиқ ўсимлик олиш имкинини беради.

Сунъий шароитда олинган туганаклар шундай шароитда ўстирилган ўсимликларга нисбатан очиқ тупроқ шароитига енгил мослашади. Ҳозирги кунда изоляцияланган апикал меристемаларни культуралаш ва микротуганаклар олиш иқтисодий жиҳатдан самарали усул ҳисобланади.

Иш тузилиши ва таркиби: Диссертация кириш, 3 бобдан (адабиётлар шарҳи, фойдаланилган манба ва материаллар, олинган натижа ва уларнинг муҳокамаси), хулосалар, фойдаланган адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертациянинг умумий ҳажми 64 бетдан иборат бўлиб, унда 10 та расм ва 10 та жадвал келтирилган. Кўриб чиқилган адабиётлар 60 тадан

иборат. Мамлакатимиз ҳамда яқин ва узоқ чет эл малакатлари олимлари бажарган ишлар кўриб чиқилган.

Бажарилган ишнинг асосий натижалари: Турли структурадаги цитокининларнинг картошка ўсимлиги ўсиши ва ривожланишига таъсири таҳлил қилинганда, бензиламинопурин, фурфуроаминопурин ва изопентиламинопуринлар орасида бензиламинопурин картошкани кўпайтиришда энг самарали таъсирга эга экан.

Аниқланишича ўсимликларни микрокўпайтиришда учун ўрта ярусдаги микроқаламчаларни $1 \times 10^{-8} \text{M}$ концентрациядаги фурфуроаминопурин иштирокида ўстириш кўпроқ самара берар экан.

Ўсимликнинг илдиз атрофи қисмида туганак ҳосил қилиш жараёнини индукциялаш учун ҳам $1 \times 10^{-8} \text{M}$ концентрациядаги фурфуроаминопуридан фойдаланиш яхши натижалар берди.

Ўсимликнинг апикал қисмида туганак ҳосил қилиш жараёнини индукциялаш учун фурфуроаминопуриннинг концентрациясини $1 \times 10^{-4} \text{M}$ гача ошириш мақсадга мувофиқ бўлди.

Картошкани микроклонли кўпайтиришда ўсимликнинг илдизга яқин қисми ва апикал қисмидан фойдаланиш юқори самара берди, ўсимликнинг ўрта қисми эса ўсимликларни регенерациялаш ва микроқаламчалаш учун фойдаланилиши керак.

Диссертация материаллари асосида жами 2 та илмий иш, жумладан 2 та тезис чоп қилинган.

Хулоса ва таклифларнинг қисқача умумлаштирилган ифодаси:

1. Ниҳолнинг апекси ва илдиз тизимидан турли масофада жойлашган адвентив куртаклар турлича регенерацияланиш фаоллигига эга. Ўсимликнинг ўрта қисмида жойлашган куртаклар тезроы ўсиши билан фарқ қилади.

2. Турли структурадаги цитокининларнинг картошка ўсимлиги ўсиши ва ривожланишига таъсири таҳлил қилинганда, бензиламинопурин, фурфуроаминопурин ва изопентиламинопуринлар орасида бензиламинопурин картошкани кўпайтиришда энг самарали таъсирга эга экан.

3. Ўсимликларни микрокўпайтиришда учун ўрта ярусдаги микроқаламча-ларни $1 \times 10^{-8} \text{M}$ концентрациядаги фурфуроаминопурин иштирокида ўстириш кўпроқ самара бериши аниқланди.

4. Ўсимликнинг илдиз атрофи қисмида туганак ҳосил қилиш жараёнини индукциялаш учун ҳам $1 \times 10^{-8} \text{M}$ концентрациядаги фурфуроаминопуридан фойдаланиш яхши натижалар берди.

5. Ўсимликнинг апикал қисмида туганак ҳосил қилиш жараёнини индукциялаш учун фурфуроаминопуриннинг концентрациясини $1 \times 10^{-4} \text{M}$ гача ошириш мақсадга мувофиқ бўлди.

6. Картошкани микроклонли кўпайтиришда ўсимликнинг илдизга яқин қисми ва апикал қисмидан фойдаланиш, ўсимликларни регенерациялаш ва микроқаламчалаш учун ўсимликнинг ўрта қисмидана фойдаланиш кераклиги аниыланди.

Мазкур ишни бажариш жараёнида олинган натижалар картошканинг микротуганакларини ишлаб чиқариш бўйича техник шароитлар ва технологик қўлланмалар яратишда фойдаланилади.

Илмий раҳбар:

Магистратура талабаси:

ВВЕДЕНИЕ

В своей книге «По пути безопасности и стабильного развития» Президент Республики Узбекистана И.А.Каримов отметил: Уникальные природно-климатические условия позволяют получать в течение года несколько урожаев картофеля, многих видов овощей и других культур. В сочетании с созданной производственной материально-технической базой это дает возможность производить свежую и консервированную плодоовощную продукцию в широком ассортименте и в объемах, позволяющих не только удовлетворять потребности населения республики, но и обеспечивать ими население многих стран мира [1].

Он своих произведениях подчеркивает, что «последовательное достижение стратегических целей предопределило необходимость четко выделить основные приоритеты первого этапа реформирования. Первый этап – это начальное звено в цепи мер по переходу от тоталитарного прошлого к цивилизованным рыночным отношениям. В этом особенность и сложность данного периода».

Необходимыми условиями для повышения производительности труда и снижения издержек являются: правильная организация работы на всех участках предприятия, совершенствование технологических процессов, научная организация труда, механизация трудоёмких операций, строгое соблюдение принципов хозяйствования, развертывание социалистического соревнования, укрепление трудовой дисциплины, повышение квалификации работников. Для снижения издержек необходимы правильная организация транспортировки сырья и товаров, улучшение тарного и топливного хозяйства, внедрение передовых форм обслуживания населения и бережное, заботливое отношение к народному добру [2-3].

Картофель относится к ряду наиболее важных продовольственных культур во всем мире. Питательная ценность картофеля определяется большим содержанием в клубнях белка и углеводов, причем аминокислотный состав белка клубней картофеля по содержанию

незаменимых аминокислот наиболее близок к аминокислотному составу белка молока. Также немаловажно то, что картофель является поставщиком витамина С (картофель удовлетворяет 1/3 общей потребности в витамине С).

Картофель относится к числу вегетативно размножаемых культур, то есть размножение картофеля осуществляется с помощью клубней (видоизмененный подземный побег). При размножении вегетативными частями, в растениях накапливаются, от поколения к поколению, большое количество патогенов. Наиболее опасными из них являются вирусные инфекции, которые, накапливаясь в большом количестве, приводят не только к снижению урожайности, но и к физиологическому вырождению сортов. Именно поэтому семенной материал картофеля нуждается в постоянном обновлении, то есть эффективность производства картофеля зависит от постоянного наличия оздоровленного семенного материала, прежде всего свободного от вирусных инфекций.

Наиболее интенсивным способом получения и размножения безвирусного первичного семенного материала картофеля является биотехнологический метод – метод меристемных культур. Единственным интенсивным методом производства безвирусного первичного материала в больших объемах является получение растений из изолированных апикальных меристем и их микроклональное размножение. Только этот метод позволяет обеспечить в достаточном объеме поля, предназначенные для производства семенного картофеля генетически однородным оздоровленным материалом.

Способ микроклонального размножения оздоровленного исходного материала для семеноводства картофеля базируется на инициации к росту адвентивных побегов, то есть регенерации растений из адвентивных почек. Считается, что основными факторами, обеспечивающими успех в решении проблемы регенерации растений, являются генотип исходного растения, природа экспланта и условия культивирования. К настоящему времени исследования в области определения взаимосвязи между генотипом,

эксплантом и условиями культивирования приобрели наиболее массовый характер. Однако если учесть такое свойство растительной клетки, присущее только растительной клетке, как тотипотентность, то становится очевидным, что регенерировать возможно любой эксплант или любую клетку (кроме одревесневшей) любого генотипа. Исходя из этого, основным решающим моментом при решении проблемы регенерации является подбор таких условий культивирования, которые будут наиболее оптимальными для индукции морфогенетических процессов у изолированных клеток или тканей. Только меняя условия культивирования, можно добиться желаемого морфогенетического ответа от экспланта.

В целом, при культивировании растений *in vitro*, существует всего лишь два, принципиально отличающихся друг от друга, пути регенерации. Это – прямая регенерация – регенерация на основе индукции процессов соматического эмбриогенеза или органогенеза непосредственно из тканей экспланта или непрямая регенерация – регенерация на основе индукции процессов соматического эмбриогенеза или органогенеза в каллусной ткани, индуцированной из тканей экспланта.

В настоящее время существует ряд культур, для которых разработаны способы как прямой, так и непрямой регенерации. Однако для большинства культур существует только один из двух путей регенерации, более того, существуют культуры, для которых методы регенерации еще не разработаны. Именно это и обуславливает большое число исследований в области влияния генотипа растения, природы исходного экспланта и условий культивирования на процессы регенерации.

Роль природы исходного экспланта определяется тем, что для индукции процесса регенерации растений из эксплантов, взятых из различных частей одного растения, требуются различные условия культивирования.

При обсуждении вопроса об оптимизации условий культивирования в связи с проблемами регенерации, основная роль отводится экзогенным

регуляторам роста, без которых практически невозможно индуцировать морфогенетические процессы.

Как правило, при обсуждении вопроса о влиянии на процесс регенерации природы экспланта, имеется в виду принадлежность экспланта к той или иной части растения. В литературе практически не обсуждается вопрос о влиянии на процесс регенерации природы экспланта, связанной не с его принадлежностью к определенному органу, а с физиологическим состоянием. Так, при микроклональном размножении многих видов растений, используется способ, основанный на индукции к росту адвентивных побегов. В этом случае в качестве экспланта используются пазушные и апикальные почки растения, сформированного *in vitro*. По мере роста и развития исходного растения, адвентивные почки закладываются на растении поочередно, по мере роста растения. Следовательно, возможно предположить, что, так как каждая почка находится на определенном расстоянии, как от корневой системы, так и от апекса побега, то для каждой почки будет характерно свое собственное физиологическое состояние, обусловленное как месторасположением на побеге, так и возрастом.

Определение влияния физиологического состояния экспланта на процесс регенерации может быть очень важным для процесса микроразмножения в связи с производственными задачами, когда речь идет о получении растительного материала в достаточно большом количестве. Именно производственные задачи требуют как наибольшей стандартизации и упрощенности процессов культивирования, так и обеспечения максимальной синхронизации процессов роста и развития, в чем немаловажную роль может играть физиологическое состояние экспланта.

Целью настоящей работы являлось – определение реакции апикальных и латеральных, находящихся на разных ярусах, почек растений картофеля *in vitro* на определенные соотношения экзогенных цитокининов.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- Определение регенерационной активности адвентивных почек, находящихся на разном удалении от апекса побега, в отсутствие регуляторов роста.
- Определение влияния цитокининов различной структуры на регенерационную активность адвентивных почек, находящихся на разном удалении от апекса побега.
- Определение влияния различных концентраций экзогенных цитокининов на регенерационную активность адвентивных почек, находящихся на разном удалении от апекса побега.
- Установка оптимального соотношения между эксплантом и экзогенным цитокинином, обеспечивающего максимальный коэффициент микроклонального размножения картофеля.

Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Биотехнология картофеля

На данный момент биотехнология картофеля имеет в своем арсенале большое количество хорошо зарекомендовавших методов. По отношению к картофелю были разработаны способы оздоровления семенного материала методами культивирования изолированных меристем [4].

В настоящее время растительный материал картофеля различной степени организации также используется для создания методами культуры тканей новых генотипов и для селекции требуемых сельскохозяйственных признаков [5].

Развитие нормально сформированных растений в искусственных условиях – это процесс, зависящий от многих факторов. Характер и интенсивность протекания каждого процесса зависят, при культивировании *in vitro*, как от природы экспланта, так и от условий культивирования [6]. Одним из основных факторов, влияющих на процессы роста и развития, являются фитогормоны, или физиологически активные вещества. Клетки, ткани или органы растений *in vitro* нуждаются в экзогенно привносимых регуляторах роста. Причем, соотношение фитогормонов, или физиологически активных веществ, должно быть весьма определенным в зависимости от того, на каком уровне развития находится объект культивирования и какова конечная цель культивирования. На данный момент не существует конкретных рекомендаций по культивированию различных эксплантов различных растений. В работах, где были предприняты попытки обобщить экспериментальный материал по индукции процессов морфогенеза, как правило, отмечается, что не существует общих правил по влиянию гормонов на побегообразование и корнеобразование. Растения проявляют специфическую реакцию на условия культивирования как на таксономическом, так и на морфологическом уровнях [6].

Как уже говорилось, картофель как объект исследования, находит очень широкое применение в биотехнологических работах. По отношению к

картофелю разработаны не только методы микроклонального размножения и оздоровления, но и методы клеточной селекции, генетической трансформации. Так, очень интересными являются исследования [7] по двум направлениям – устойчивость картофеля к вирусам и улучшение свойств (толерантность к абиотическим стрессам, состав крахмала). Ряд исследований показали, что толерантность к стрессам включает механизмы, которые позволяют растениям поддерживать их метаболизм и ограничивать вредное воздействие стресс-факторов. Осмотическое регулирование растений достигается, в основном, путем аккумуляции соединений с низкомолекулярной массой, называемых «осмолитами».

Метод культуры изолированных тканей растений используется уже много лет, как для исследования процессов морфогенеза [8], так и в более практических целях. Например, для получения оздоровленного исходного материала, ускоренного размножения и массового производства многих видов сельскохозяйственных растений. Однако на сегодняшний день в печати практически отсутствуют данные о возможности регулирования интенсивности и направленности процессов роста и развития растений даже такой, исследованной в биотехнологическом отношении, культуры, как картофель.

Качество семенного материала определяется в случае, если речь идет о картофеле, тем, что накопление вирусов в клубнях год от года приводит к снижению урожайности и вырождению сортов. В случае картофеля вырождение посадочного материала обуславливается тем, что вирусные заболевания приводят к физиологическим изменениям, которые не только передаются при вегетативном размножении, но и накапливаются от генерации к генерации. Поэтому для получения семенного материала картофеля необходимо применение методов оздоровления. Существующие традиционные методы позволяют выращивать материнские растения в теплицах (изоляторах) и в дальнейшем размножать их в полевых условиях [5], а также, размножать стеблевым черенкованием тщательно

оттестированные на отсутствие вирусов, бактерий и грибных инфекций растения также в теплицах (изоляторах) под постоянным фитосанитарным контролем. Эти методы не могут обеспечивать увеличивающуюся потребность производителей в высококачественном семенном материале из-за низкой производительности. Методом микроклонирования этот срок можно сократить до одного – двух лет и в течение полугода из десяти исходных стерильных растений получить свыше полумиллиона растений.

Одной из наиболее актуальных проблем в области биотехнологии картофеля является регуляция процесса клубнеобразования. Познание принципов организации и саморегуляции растений как сложных биологических систем является фундаментальной научной проблемой. В рамках этой проблемы важное место занимают вопросы клубнеобразования. Давно известно, что клубень имеет побеговую природу и формируется в результате разрастания субапикальной зоны stolона. Однако до сих пор остаются дискуссионными и до конца не выясненными природа индуктора клубнеобразования, события начального этапа перехода stolона в клубень, роль гормонов и других факторов [7].

С помощью размножения *in vitro* возможно в течение полугода из десяти исходных стерильных растений получить свыше полумиллиона растений, способных адаптироваться и вегетировать в грунте. Однако, растения, полученные в искусственных условиях, требуют определенных тепличных условий для адаптации к грунту. Одновременное культивирование большого количества растений, полученных *in vitro*, требует больших тепличных площадей, что связано с большими затратами. В этом случае очевидна необходимость технологий, позволяющих получать клубни непосредственно в условиях *in vitro*. Клубни, полученные в искусственных условиях по сравнению с растениями, полученными в этих же условиях, легко адаптируются к открытому грунту.

В настоящее время наиболее экономически оправданным является получение семенного материала картофеля на основе метода

культивирования изолированных апикальных меристем и получения микроклубней.

Отмечено, что клубнеобразование у картофеля представляет собой сложный морфогенетический процесс, состоящий из последовательных этапов. Важной характеристикой конечного результата клубнеобразования является количество сформировавшихся на растении клубней и их размеры. Как показали исследования, число и размеры клубней регулируются на разных уровнях – генетическом (сортовые характеристики), взаимоотношений растения и среды, организменном и др. Предполагается, что одним из механизмов, участвующих в детерминации числа и размеров клубней, является система гормональной регуляции [9].

Как известно, в условиях *in vivo* образование клубней растениями картофеля включает два взаимосвязанных процесса: а) последовательное деление и растяжение клеток внутренней и наружной паренхимы, б) отложением запасных веществ – крахмала и других полисахаридов [9]. Рост клубня осуществляется за счет поступающих из листьев продуктов текущего фотосинтеза, а также ассимилятов, ранее депонированных в стеблях или других частях растения. Молодой клубень – это мощный акцептирующий орган. С переходом растений к клубнеобразованию поток ассимилятов из большинства листьев надземных побегов ориентирован преимущественно в клубни. В условиях *in vitro* образование клубней определяется изменением углеводного состава, фотопериода и соотношения фитогормонов в составе питательной среды. Также было показано, что на процессы роста и развития растений картофеля *in vitro* оказывает положительное влияние совокупное и стадийное электровоздействие. Однако, не смотря на многочисленные исследования, возможность эффективной регуляции процесса клубнеобразования остается до конца не разработанной.

Одним из прикладных направлений биотехнологии картофеля является создание генбанков этой культуры. Что немаловажно, некоторые генбанки обладают также *in vitro* – коллекциями ценных генотипов, прошедших

испытания на устойчивость к патогенам и предназначенных для международного распространения в качестве базисного материала при размножении, выращивания клубней и семян и для длительного хранения.

Коллекция растений *in vitro*, содержащая большое количество генотипов, может стать поставщиком исходного материала не только для фундаментально-прикладных исследований в области физиологии, морфологии, молекулярной биологии, генетики, для селекционного процесса, также подобная коллекция может стать базой для первичного семеноводства.

Растительный материал может быть введен в коллекцию *in vitro* различными с помощью различных методов [10]. Однако для поддержания коллекционного материала необходимы хорошо разработанные методы культивирования, позволяющие длительное время поддерживать и, по мере необходимости, размножать коллекционный материал в виде идентичном исходному, то есть, прежде всего, без генетических аномалий.

Таким образом, как и любая другая технология, технология производства безвирусного семенного картофеля требует постоянного совершенствования. Во-первых, в целях адаптации ее к конкретным условиям, в которых данная технология найдет применение. Во-вторых, совершенствование технологии позволит сделать ее более эффективной, что, естественно, приведет к удешевлению производимой продукции. Это один из наиболее важных моментов, так как при производстве картофеля стоимость семенного материала составляет более половины от общих затрат на производство в целом. Исследование взаимосвязи между используемым для размножения эксплантом и экзогенными физиологически активными факторами, возможно, приведет к созданию более эффективной системы получения в большом количестве исходного оздоровленного материала и адаптации его к грунту с целью дальнейшего репродуцирования.

1.2. Современное состояние исследований в области роли цитокининов в регуляции процессов роста и развития высших растений

Растительные гормоны играют ключевую роль в регулировании развития растений и формировании габитуса. Ответная реакция на изменения условий окружающей среды также обуславливается участием фитогормонов. Окончательное формирование растения и его физиологическое состояние – это результат комбинированного действия различных групп фитогормонов. На данный момент наиболее интенсивно исследуются механизмы, вовлеченные в гормональную перекрестную связь и регулирующие процессы жизнедеятельности растения [11].

На сегодняшний день уже установлено, что основными группами фитогормонов, регулируемыми процессы роста и развития на протяжении всего онтогенеза, являются цитокинины и ауксины.

Цитокинины – группа мобильных фитогормонов, которые наряду с ауксинами играют важную роль в процессе роста и развития растений на протяжении всего онтогенеза. Цитокинины участвуют в регуляции клеточного деления, старения листа, апикального доминирования, филлотаксиса, развития корневой системы, репродуктивных функций [11-18]. Также известно, что цитокинины имеют непосредственное отношение к регуляции активности меристем [19] и к модуляции метаболизма и морфогенетических процессов в ответ на факторы окружающей среды [20-22].

Цитокинины – класс гормонов с установленной специфичностью действия, которые играют центральную роль в клеточном цикле и влияют на многочисленные программы развития. Из-за недостатка биосинтеза регуляторные роли цитокининов до конца не изучены [23].

Цитокинины синтезируются в растениях в очень малых количествах в кончиках корней [24]. Производные аденина, к которым относятся природные цитокинины зеатин и изопентиладенин, участвуют в широком

спектре процессов, обеспечивающих жизнедеятельность растительной клетки. Аденин в фосфорибозидированной форме составляет одно из четырех оснований генетического материала – ДНК, в этом случае аденин может образовывать бинарную молекулярную связь с другим остатком ДНК – тимидином, что определяет функциональность ДНК [25], возможность образования тройной связи – Хукстеновские связи [26] может играть важную роль в функции цитокининов. Также аденин участвует в составе АТФ во всех энергетических процессах, связанных с дыханием и фотосинтезом [26]. В этих случаях аденин свободен по N⁶ положению, а по N⁹-положению либо фосфорибозидирован, либо фосфодезоксирибозидирован. Цитокинины, являясь природными производными аденина по N⁶ положению, имея замещенную группу – изопентил или изопрен, также рибозидируются или фосфорибозидируются по N⁹-положению. Возможно, что способность к гликозидированию и является механизмом регуляции активности цитокининов. В обзоре литературы мы будем рассматривать те или иные процессы, которые связаны с регуляторной деятельностью цитокининов.

Цитокинины были обнаружены в течение 50-х гг. 20-го столетия благодаря их способности инициировать деление клетки. Вскоре после их открытия, Скугом и Миллером [27] была сформулирована гипотеза о цитокинин –ауксиновом балансе процессов морфогенеза у растений [27]. Согласно этой гипотезе цитокинин совместно с ауксином играет существенную роль в морфогенезе растений, регулируя образование побега и корневой системы и их относительный рост.

В химическом отношении природные цитокинины представляют собой N⁶-замещенные производные аминопурина. Изопентиладенин (ИП) зеатин (З) и дигидрозеатин (ДЗ) – основные цитокинины, обнаруженные у высших растений. Свободные основания и их рибозидные формы считаются биологически активными веществами. Гликозидированные конъюгаты

играют роль в транспорте цитокининов, защите от деградации и реверсивной и неревверсивной инактивации [28].

Многочисленные сообщения приписывают стимулирующую или ингибирующую функцию цитокининам многих процессах развития, таких, как рост корня и управление апикальным доминированием у побега, развитие хлоропластов и старение листа [14]. Выводы о биологических функциях цитокининов главным образом были сформулированы на основе исследований последствий экзогенного влияния цитокининов или эндогенного изменения уровня цитокининов [23, 29-30,10].

Один из подходов к изучению роли цитокининов основывается на исследовании трансгенных растений с пониженным или повышенным содержанием цитокининов. Изучались растения с уменьшенным содержанием цитокининов, которые возможно, дадут более точную информацию о лимите цитокининов и, следовательно, регуляции [23].

На основе трансгеноза создаются мутанты, отличающиеся недостатком эндогенного цитокинина. Растения с низким уровнем цитокининов образуют побеги с уменьшенными размерами зон апикальных меристем. Был продлен пластохрон и деление клеток листа составляло только 3-4% от «дикого» типа, что указывало на абсолютную необходимость цитокинина для развития листовой пластинки. На контрасте, корень трансгенного растения был расширен, отличался более высокими темпами роста и более развитыми боковыми корнями. Эти результаты подтверждают, что цитокинины - важный регуляторный фактор деятельности меристем и морфогенеза с противоположными ролями в побеге и корне.

Катаболический фермент цитокинин оксидаза, возможно, играет важную роль в контроле уровня цитокининов в тканях растений. Активность цитокинин оксидаз изучена для многих видов высших растений и в различных растительных тканях [23, 28, 31-34]. Фермент является НАДФ содержащей оксидоредуктазой, катализирующей разложение цитокининов, имеющих ненасыщенные изопреноидные боковые цепи. Свободные

основания, ИП и З и их соответствующие рибозиды являются их предпочтительными субстратами для этого фермента. Показано, что продуктами реакции катаболизма ИП являются аденин и ненасыщенный альдегид 3-метил-3-бутенал [28].

Недавно был изолирован цитокинин оксидазный ген из кукурузы [33]. Манипуляции экспрессией *СКХ-гена* может быть использована как мощное средство для изучения релевантности изопентил- и зеатин -типов цитокининов в течение целого жизненного цикла высших растений.

Изучались аналоги четырех предполагаемых генов цитокинин оксидазы из *Arabidopsis thaliana* и их оверэкспрессия у трансгенных растений табака [23]. Результаты показывают важную роль цитокининов в регуляции роста высших растений посредством дифференцированного влияния на продолжительность клеточного цикла в меристемах корня и побега.

Анализ последствий недостатка эндогенного уровня цитокининов показывает, на основе таких параметров, как замедление клеточного деления, уменьшение листового примордия, уменьшенный размер растений, что цитокинины имеют двойную функцию. Цитокинины поддерживают активность деления клеток и включаются в процесс перехода недифференцированных клеток в дифференцированное состояние. Как было указано в более ранней работе [27], цитокинины участвуют в образовании меристем побега и клеточном делении.

Известна координация факторов клеточного деления и клеточной дифференцировки в мутантных растениях с низким содержанием цитокининов – трансмембранные белки рецептора (напр., CLV1) и факторы транскрипции у однодольных (напр, WUS, STM, KNAT1), которые взаимодействуют в регуляторных процессах [29]. Последние данные показывают, что существует обратное взаимодействие между цитокининами и некоторыми факторами транскрипции [10,30-33]. Регуляторная роль цитокининов в дифференциации у мутантов может реализовываться через локальные градиенты гормона или через различия в распределении других

метаболитов цитокининов. Это может изменить экспрессию специфического гена, что в свою очередь влияет на клетку.

Экспериментальные данные об изменении концентрации и локализации цитокининов сообщены для табака [35]. Для трансгенных растений было характерно неполное апикальное доминирование.

Уменьшение образования клеток листа и их сокращенное число указывает на необходимость участия цитокининов в образовании листа на основе управления клеточным циклом и нормальной скорости деления, обеспечивающим нормальные размеры листовой пластинки [23]. Эта функция цитокининов подтверждается тем, что трансгенные растения арабидопсиса с увеличенным содержанием цитокининов отличались более интенсивным делением клеток листа [23]. Кроме того, цитокинин ограничивает размеры клетки листа, так как трансгенные растения отличались большими размерами клеток листа контрольных растений.

Кроме того, компенсирующий механизм образования нормальных органов в трансгенных растениях может быть активизирован экспрессией доминантно-негативной формой *sdc2* [33]. В любом случае, фенотип листа при оверэкспрессии *AtСКХ* подтверждает то, что деление клеток и рост в листьях табака не связаны между собой.

Интересно [23] то, что фенотип цветка трансгенных растений не изменялся. Это предполагает, что цитокинины играют менее важную роль в регуляции развития репродуктивных органов, чем в развитии вегетативных органов. Это может быть связано с тем, что на фазе развития репродуктивных органов, вступает в силу более строгий механизм контроля активности меристем, чтобы обеспечить соответствующее направление реализации генетической программы.

В отличие от стимулирующей роли в развитии побега, цитокинины играют отрицательную роль в развитии корня. Увеличенное количество клеток в корнях трансгенных растений с уменьшенным содержанием цитокининов и уменьшенный размер клеток указывает на то, что более

интенсивное развитие корневой системы обусловлено увеличенной скоростью деления клеток, а не их ростом. В присутствии более низкого уровня цитокинина клетки меристемы корня проходят более пролонгированную меристематическую фазу в конечном счете вовлекаются в дополнительный митотический цикл, прежде, чем оставят меристематическую зону и начнут удлиняться. Авторы пришли к выводу о том, что активность инициалей перед тем, как клетки выйдут из зоны корневой меристемы регулируются механизмом, который чувствителен к цитокининам.

Обобщая результаты исследований растений с низким уровнем цитокининов можно прийти к выводу о том, что цитокинины прежде всего влияют на морфогенез регулируя клеточный цикл. Определены многочисленные функции и некоторые молекулярные механизмы действия цитокининов в течение разных фаз клеточного цикла. Гормон необходим для входа клеток мезофилла листа в S-фазу, также прохождение S-фазы в присутствии цитокининов ускоряется [23]. Экспрессия некоторых генов, контролирующих клеточный цикл, регулируется цитокининами, включая *cdc2*, *CycD3*, и другой B-type циклинов [33-35]. Есть подтверждение, что гены, регулирующие клеточный цикл экспрессируются в соответствии с тканью – специфичностью и, что эффект цитокининов в клеточном цикле меняется между различными типами клеток [36-37].

Увеличенный рост органов у растений с оверэкспрессией D- и B-типов циклинов [38-39] подтверждает гипотезу, которая гласит о том, что цитокинин действует через регуляцию прохождения клеточного цикла. Вероятно, деградирующие цитокинины быстро накапливаются в течение перехода клетки в G-2 фазу в количестве на несколько порядков выше, чем в клетке в других фазах [40]. Не известно, каким образом регулируются уровни цитокинина для того, чтобы в конечном итоге нормально выравниться.

Также в настоящее время активно предпринимаются попытки определения механизма действия цитокининов на основе определения групп

генов, отвечающих за их эндогенный синтез, трансформации этими генами растительных тканей, получения тканей, способных к индукции побегообразования без участия экзогенных цитокининов [41]. Выделены мембранные рецепторы цитокининов, определены гены первичного ответа на цитокинин, кодирующие белки, соответствующие регулятору ответа бикомпонентной регуляторной системы [42].

В силу относительно установленной специфичности биологической активности цитокининов они являются обязательным компонентом условий культивирования изолированных тканей растений. Практически ни один, из существующих на данный момент, способов регенерации растений не возможен без участия экзогенных цитокининов.

1.3. Значение цитокининов в культуре тканей высших растений

В культуре *in vitro* нашли широкое применение не только естественные цитокинины высших растений – iP и зеатин, но и фурфууроламинопурин (кинетин) – вещество, выделенное из ДНК спермы лосося, показавшее большую активность в плане инициации клеточного деления, и 6-бензиламинопурин – синтетический цитокинин. Причем в большинстве случаев в культуре тканей растений именно кинетин и БАП находят наиболее широкое применение в силу большей активности по сравнению с зеатином и iP-ом [43].

Следует отметить [43,6], что наряду с условиями культивирования большое значение при разработке способов индукции морфогенетических процессов *in vitro* и их интенсификации имеет природа экспланта. Как правило, при обсуждении вопроса о влиянии на процесс регенерации природы экспланта, имеется в виду принадлежность экспланта к той или иной части растения. В литературе практически не обсуждается вопрос о влиянии на процесс регенерации природы экспланта, связанной не с его принадлежностью к определенному органу, а с физиологическим состоянием.

Так, при микроклональном размножении многих видов растений, используется способ, основанный на индукции к росту адвентивных побегов. В этом случае в качестве экспланта используются пазушные и апикальные почки растения, сформированного *in vitro*. По мере роста и развития исходного растения, адвентивные почки закладываются на растении поочередно, по мере роста растения. Следовательно, возможно предположить, что, так как каждая почка находится на определенном удалении, как от корневой системы, так и от апекса побега, а известно, что цитокинины синтезируются в апексах корней, а ауксины в апексе побега и в молодых листьях, то для каждой почки будет характерно свое собственное физиологическое состояние, обусловленное как месторасположением на побеге, так и возрастом.

Определение влияния физиологического состояния экспланта на процесс регенерации позволит подойти к решению такой проблемы, как синхронизация морфогенетических процессов.

Таким образом, основой целенаправленной регуляции морфогенетических процессов может быть выявление взаимосвязи между экзогенными цитокининами и физиологическим состоянием экспланта.

С другой стороны, коммерческая значимость такой культуры, как картофель, определила то, что именно по отношению к ней наиболее интенсивно развиваются методы биотехнологии. В странах с развитым аграрным сектором производство семенного картофеля полностью базируется на биотехнологических методах производства. Получение новых сортов также все больше базируется на методах культивирования изолированных клеток, тканей и органов. Нужно отметить, что картофель, именно в силу своих биологических особенностей, относится к числу тех культур, для которых раньше всего стали разрабатываться методы культивирования *in vitro*.

Культивируемые клетки и ткани высших растений обладают рядом уникальных особенностей. Их можно выращивать в виде неорганизованной

клеточной массы, а с другой стороны, возможно, экспериментально реализовать способность клеток и тканей осуществлять программу развития, генетически присущую данному растению. Изменяя условия культивирования, в ряде случаев можно заставить изолированные клетки образовывать зародышеподобные структуры, почки или побеги и на их основе – растения - регенеранты. Выбирая в качестве объекта для получения растения либо интегрированную систему (изолированный зародыш, меристему апикальных и пазушных почек), либо изолированные клетки или протопласты, можно создавать принципиально разные технологии. В первом случае растения – регенеранты будут идентичны исходному растению, которое, таким образом, клонируется. Во втором случае с большой вероятностью возникнут варианты исходной формы и многие из них передадут измененные признаки потомству, создавая генетическое разнообразие форм для селекции. Генетические изменения обуславливаются спонтанными мутациями, неизбежно происходящими во всех культурных растениях. Большинство таких изменений нежелательно. Считается, что одним из факторов, обуславливающих возникновение мутаций в культивируемых *in vitro* тканях, являются вещества, присутствующие в питательной среде, в первую очередь такие регуляторы роста, как НУК, 2,4-Д или БАП [8].

Исходя из вышеизложенного, как и любая другая технология, технология производства безвирусного семенного картофеля требует постоянного совершенствования. Во-первых, в целях адаптации ее к конкретным условиям, в которых данная технология найдет применение. Во-вторых, совершенствование технологии позволит сделать ее более эффективной, что, естественно, приведет к удешевлению производимой продукции. Это один из наиболее важных моментов, так как при производстве картофеля стоимость семенного материала составляет более половины от общих затрат на производство в целом. Исследование взаимосвязи между используемым для размножения эксплантом и

экзогенными физиологически активными факторами может привести к созданию более эффективной системы получения в большом количестве исходного оздоровленного материала в виде растений и микроклубней *in vitro* и адаптации его к грунту с целью дальнейшего репродуцирования.

Заключение по I- главе

Таким образом, проанализировав литературу, можно сказать, что картофель относится к числу культур, по отношению к которым наиболее интенсивно стали разрабатываться и применяться методы биотехнологии. Несмотря на то, что биотехнологический способ получения и размножения исходного безвирусного материала уже разработан и применяется, однако на данный момент он является достаточно дорогостоящим и трудоемким. Поэтому актуальным остается оптимизация способа получения исходного материала картофеля как основы первичного семеноводства. В этом плане наиболее эффективным является разработка способов более интенсивного размножения, в основе которых лежат исследования в области регуляторной активности экзогенных фитогормонов, особенно цитокининов, и регенеративной способности используемых для размножения эксплантов.

Глава II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

2.1. Условия проведения эксперимента.

Эксперименты проводились на базе лаборатории клеточных технологий ИБОХ АН РУз.

Культивирование растительного материала. Микрочеренки культивировали на питательных среды следующего состава: соли по Мурасиге и Скугу, витамины В5 по Гамборгу, сахароза – 3%, агар-агар – 0,7%. В качестве регуляторов роста для регенерации меристем и микроразмножения использовали кинетин и аденин в различных концентрациях (табл. 2.1).

Таблица 2.1

**Состав сред для культивирования растений и микроклубней картофеля
(в мг/л)**

Среда А		Среда В	
Компоненты	Количество	Компоненты	Количество
NH ₄ NO ₃	1650	NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900	KNO ₃	1900
CaCl ₂ x 2H ₂ O	440	CaCl ₂ x 2H ₂ O	440
MgSO ₄ x 7H ₂ O KH ₂ PO ₄	370	MgSO ₄ x 7H ₂ O KH ₂ PO ₄	370
H ₃ BO ₃	170	H ₃ BO ₃	170
MnSO ₄ x 4H ₂ O	6,2	MnSO ₄ x4H ₂ O	6,2
CoCl ₂ x 6H ₂ O	22,3	CoCl ₂ x6H ₂ O	22,3
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025
ZnSO ₄ x7H ₂ O	0,025	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	8,6	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	8,6
KJ	0,25	KJ	0,25
FeSO ₄ x7H ₂ O	0,83	FeSO ₄ x7H ₂ O	0,83
Na ₂ ЭДТАx2H ₂ O	37,3	Na ₂ ЭДТА x 2H ₂ O	37,3
Иннозитол	100	Иннозитол	100
Гидролизат казеина	100	Гидролизат казеина	100
Сахароза	80	Сахароза	80
Кинетин	0,01	Кинетин	20,0
Аденин	40		

Условия культивирования растительного материала – температура 20-22⁰С, освещенность – 2000-3000 Лк, фотопериод – 16:8 (день, ночь).

Для индукции процесса клубнеобразования использовали среды того же гормонального состава, но меняли фотопериод и содержание сахарозы.

Для адаптации растений и микроклубней картофеля к грунту использовали подкормку в течение первых 10-ти дней раствором солей по МС и раствором кристаллона.

Для определения влияния цитокининов различной структуры на рост и развитие картофеля *in vitro* использовали цитокинины, различающиеся по замещению N⁶- группе аденина: фурфуроламинопурин (кинетин) (Calbiochem), 6-бензиламинопурин (БА) (Serva) и N⁶-(2-изопентил)аденин или 6-(γ,γ-диметилаллиламино)пурин (2-iP) (Sigma) в концентрациях 1×10⁻⁸, 1×10⁻⁶, 1×10⁻⁴ М. Условия культивирования: среда для культивирования – минеральная основа – макро- и микросоли по Мурасиге и Скугу, витамины В₅ по Гамборгу, сахара – 3 г/л, гидролизат казенина – 100 мг/л, инозитол – 100 мг/л (контроль). В опытных вариантах в среду добавляли кинетин, БА, 2-iP в концентрациях 1×10⁻⁸, 1×10⁻⁶, 1×10⁻⁴ М. Экспланты культивировались в условиях факторостатной комнаты при температуре 20-22⁰С, освещенности – 2000 Лк, фотопериоде 16:8 (день: ночь).

2.2. Методы проведения эксперимента

В работе были использованы следующие методы:

- микроклональное размножение на основе индукции к росту адвентивных побегов [24-27];
- индукция процесса клубнеобразования у растений картофеля *in vitro* [24-27];
- адаптация к грунту растений и микроклубней картофеля, полученных *in vitro* [24-27].

2.3. Основные объекты проводимого эксперимента

Материалом для исследования являлись микрочеренки – участок стебля с латеральной почкой и листовой пластинкой культивируемого в Узбекистане сорта картофеля Невский, и новых перспективных сортов картофеля Сарнав и Пском, относящихся к тетераплоридному виду *Solanum tuberosum* L.

Заключение по II главе

Для исследований были использованы сорта картофеля из биотехнологической коллекции. Для оптимизации процессов микроразмножения индукции клубнеобразования были использованы различные экспланты и различные соотношения экзогенных цитокининов. Условия проведения экспериментов были стабильными, что позволило точно определить влияние экзогенных факторов на интенсивность и направленность морфогенетических процессов.

Глава III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Культивировании картофеля *in vitro*

Как уже обозначалось, наиболее эффективный способ получения и размножения исходного безвирусного материала картофеля на данный момент основывается на методах клеточных технологий. Наиболее широко применяемый метод микроразмножения картофеля основывается на индукции к росту адвентивных побегов из латеральных почек. В принципе этот способ представляет собой черенкование, проводящееся в стерильных условиях на искусственных питательных средах безвирусных растений.

Растения – регенеранты, получаемые в результате микроразмножения адаптируются к грунту в специальных условиях, прежде всего, максимально исключая возможность повторного заражения. Как правило, при микроклональном размножении существует такая проблема, как несинхронизированное образование регенерантов, что является негативным моментом, снижаемым эффективность работы, при масштабном производстве. Также недостатком данного способа является то, что необходимо произвести большое количество растений к определенному сроку посадки в грунт, особенно если сроки культивирования в грунте лимитированы сезонностью. Посадка материала, полученного *in vitro* в грунт должна по максимуму производиться в короткие сроки, так как растянутая посадка в дальнейшем затрудняет проведение агротехнических приемов, так как растения, высаженные в разные сроки, естественно, будут находиться на разных этапах развития.

В настоящее время как альтернатива стали разрабатываться способы получения микроклубней картофеля *in vitro*. Производство микроклубней имеет следующие положительные стороны – микроклубень легче адаптируется к грунту, легко переносит период покоя и, в отличие от растения может храниться до 8 месяцев, что позволяет накопить микроклубни в достаточном количестве к моменту посадки. Опять таки, как

и в случае с растениями, синхронизация процесса клубнеобразования может значительно упростить процедуру размножения.

Как и в случае растений, так и в случае микроклубней, условия культивирования должны обеспечивать такое их физиологическое состояние, которое позволяет растениям быстро адаптироваться к грунту, а микроклубню легко переносить период покоя и также легко адаптироваться к грунту. Именно эти моменты и составляют основу технологий *ex vitro*, которым в настоящее время уделяется большое внимание. Это обуславливается тем, что сама по себе продукция *in vitro* не может найти самостоятельного применения, в случае, когда речь идет о способах размножения. Коммерческую значимость имеет продукт репродукции *in vitro* материал в нативных условиях. В принципе, технологии *ex vitro* – это технологии тиражирования продукта, полученного в искусственных условиях, в условиях естественных. Эффективность *ex vitro* технологий определяется физиологическим состоянием материала, полученного *in vitro* с одной стороны, и тем насколько разработаны агротехнические приемы для культивирования этого материал, с другой стороны.

В настоящее время способы получения и размножения исходного безвирусного материала картофеля направлены либо на размножение растений, либо на получение микроклубней. Однако на наш взгляд, сочетание в едином производственном цикле процессов микроразмножения растений и получения микроклубней, позволит наиболее гибким и эффективным.

С другой стороны синхронизация процессов развития растений и образования микроклубней также может поднять эффективность производства.

Как уже отмечалось, ни один морфофизиологический процесс у растений не проходит без участия фитогормонов. Характерной особенностью фитогормонов, отличающей их от других физиологически активных веществ (витаминов, микроэлементов), является то, что они включают

физиологические и морфогенетические программы, например такие, как корнеобразование, созревание плодов и т.д [44]. Место синтеза индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) - развивающиеся почки и молодые, растущие листочки. Отсюда ауксин полярно передвигается по живым клеткам проводящих пучков до кончиков корней со скоростью 0,5-1,5 см/ч. Цитокинины образуются в апексе корня и по сосудам ксилемы пассивно транспортируются во все части растения.

Практически любой процесс регенерации растительных клеток, тканей и органов не возможен безучастия экзогенных регуляторов роста. Наиболее активными в плане регуляторной активности морфогенетических процессов являются цитокинины. Как правило, концентрации используемых для индукции процессов морфогенеза цитокининов лежат в пределах от 1 до 10 мкМ, в соответствии с генотипом растения, типом экспланта и целью культивирования [43]. Высокие концентрации регуляторов роста эффективны для индукции таких морфогенетических процессов, как увеличение частоты регенерации или одновременная пролиферация к росту большого числа побегов из пазушных меристем, быстрое образование побегов второго, третьего и более порядков. Но высокие концентрации фитогормонов могут, особенно для двудольных растений, привести к спонтанным изменениям на генетическом уровне. Если учесть то, что цитокинины и ауксины имеют такую особенность, как синтезироваться в одних частях растений, а включаться в процессы регуляции в других частях, то, возможно именно неравномерное распределение эндогенных гормонов и обуславливает неодинаковую регенерационную активность изолированных эксплантов, имеющих анатомо-морфологическое сходство.

Таким образом, целью настоящей работы являлось, на основе изучения взаимосвязи между физиологическим состоянием экспланта и экзогенными цитокининами, разработать максимально эффективный способ микроразмножения исходного оздоровленного материала, объединяющего в едином цикле размножение растений и получение микроклубней.

3.2. Определение структурной и концентрационной зависимости действия экзогенных цитокининов при культивировании картофеля *in vitro*.

В результате более чем 50-летних исследований установлено, что цитокинины играют наиболее важную роль в процессах роста и развития высших растений [11]. Определено, что цитокинины участвуют в регуляции клеточного деления [12], старения листа, апикального доминирования, филлотаксиса [13-14], развития корневой системы [15], репродуктивных функций [16]. Также известно, что цитокинины имеют непосредственное отношение к регуляции активности меристем [17] и к модуляции метаболизма и морфогенетических процессов в ответ на факторы окружающей среды [18].

В химическом плане выделенные из растений цитокинины представляют собой только производные аденина (аминопурина) по N⁶ группе. Из высших растений выделены и изучаются такие цитокинины, как изопентиладенин (2-iP), зеатин (Z), дигидрозеатин (DZ) и их рибозидные формы [19]. Установлено, что гликозидирование имеет определенную роль при транспорте цитокининов, защите их от распада и обратимой и неререверсивной инактивации [20].

В силу относительно установленной специфичности биологической активности цитокининов они являются обязательным компонентом условий культивирования изолированных тканей растений. Практически ни один из существующих на данный момент способов регенерации растений не возможен без участия экзогенных цитокининов. В культуре *in vitro* нашли широкое применение не только естественные цитокинины высших растений – 2-iP и зеатин, но и фурфуроламинопуридин (кинетин) – вещество, выделенное из ДНК спермы лосося, показавшее большую активность в плане инициации клеточного деления, и 6-бензиламинопуридин (БА) – синтетический цитокинин. Причем в большинстве случаев в культуре тканей растений

именно кинетин и ВА находят наиболее широкое применение в силу большей активности по сравнению с зеатином и 2-іР [21].

Несмотря на то, что для большинства основных сельскохозяйственных культур разработаны способы как микроклонального размножения, так и получения генетически модифицированного материала, все существующие способы регенерации основаны на эмпирическом подходе. То есть, практически не только для каждой культуры, но, зачастую, и для каждого сорта подбираются индивидуальные условия культивирования на основе использования широкого спектра регуляторов роста в различных соотношениях.

Целенаправленная регуляция морфогенетических процессов при культивировании изолированных клеток, тканей и органов возможна только при определении конкретных механизмов, активирующих или ингибирующих тот или иной процесс. Именно поэтому в настоящее время все большее внимание уделяется изучению взаимосвязи между структурой цитокининов и их регуляторной активностью [22]. К сожалению, на данный момент в литературе не обсуждаются данные по влиянию различных экзогенных цитокининов на однородные экспланты, то есть экспланты определенной части растения одного генотипа.

В связи с этим целью данной части работы являлось определение влияния различных концентраций фурфуриламинопурина, 6-бензиламинопурина и 2-изопентиламинопурина на регенерационную активность латеральных почек растений картофеля *in vitro*.

Определение влияния экзогенных цитокининов различной структуры на индукцию морфофизиологических процессов при культивировании *in vitro* однородных эксплантов одного генотипа позволит ближе подойти к пониманию механизма действия цитокининов и, тем самым, создать реальную возможность целенаправленной регуляции процессов роста и развития растений.

С целью однозначного определения влияния именно структуры экзогенного цитокинина на экспланты использовали следующий подход: для максимального обеспечения одинакового физиологического состояния экспланта исходные растения для эксперимента были получены из микрочеренков средней части на среде без регуляторов роста. В качестве эксплантов использовали микрочеренки 28-дневных растений, находящиеся на равном удалении от апикальной и корневой части. Так как цитокинины имеют непосредственное влияние на меристематическую активность побега и корня [18], то определение активности экзогенных цитокининов в зависимости от их структуры проводили по таким параметрам, как развитие главного побега, развитие боковых побегов и развитие корневой системы. Особенно значимым параметром развития побега при микроклональном размножении, основанном на индукции к росту латеральных почек, является количество закладывающихся узлов – участков стебля с листовой пластинкой и латеральной почкой. Так как интенсивность размножения зависит от того, какое количество узлов образуется на побеге в процессе его развития, то влияние экзогенных цитокининов оценивали также и по этому параметру. Результаты по определению влияния различных концентраций экзогенных цитокининов на развитие побега на 28-й день культивирования эксплантов представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1

Влияние цитокининов различной структуры на рост и развитие побегов из эксплантов (латеральных почек)

Цито- кинин	Концен- трация (М)	Развитие основного побега				Развитие боковых побегов			
		Высота (см)	Разница по отно-шению к конт-ролю**	Кол-во узлов	Разница по отно-шению к конт -ролю	Высота (см)	Разница по отно-шению к конт -ролю	Кол -во	Разница по отно-шению к конт -ролю
Кине- тин	1×10^{-8}	9,8	+0,3	8,5	+0,4	3,1	+0,8	0,8	0,0
	1×10^{-6}	10,2	+0,7	9,1	+1,0	3,5	+1,2	1,8	+1,0
	1×10^{-4}	1,4	-8,1	2,5	-5,6	0,8	-1,5	0,1	-0,7
ВА	1×10^{-8}	9,4	-0,1	7,8	-0,3	1,6	-0,7	1,2	+0,4
	1×10^{-6}	8,7	-0,8	7,2	-0,9	3,1	+0,8	2,3	+1,5
	1×10^{-4}	некроз	некроз	Некроз	некроз	некроз	некроз	некроз	некроз
2-iP	1×10^{-8}	9,4	-0,1	8,1	0,0	1,9	-0,4	0,7	-0,1
	1×10^{-6}	9,6	+0,1	8,1	0,0	2,2	-0,1	1,1	+0,3
	1×10^{-4}	9,4	-0,1	8,3	+0,2	3,1	+0,8	1,7	+0,9
Конт- роль*		9,5		8,1		2,3		0,8	

*Контроль – среда без регуляторов роста

** - знак «+» обозначает насколько больше количественное выражение этого параметра по сравнению с тем же параметром в контроле, знак «-» обозначает насколько меньше количественное выражение этого параметра по сравнению с тем же параметром в контроле

Данные, представленные в таблице 3.1, показывают, что влияние экзогенных цитокининов на формирование побега зависит как от их структуры, так и от их молярной концентрации в среде для культивирования.

Так, при низкой концентрации кинетина – $1 \times 10^{-8} \text{M}$ высота основного побега у формирующихся растений на 0,3 см выше, количество узлов на 0,4 больше, высота боковых побегов выше на 0,8 см по сравнению с растениями в контроле, а количество боковых побегов то же, что и у контрольных растений.

Низкая концентрация ВА – $1 \times 10^{-8} \text{M}$ дает другой эффект: высота основного побега растений на 0,1 см меньше, количество узлов на 0,3 меньше, высота боковых побегов на 0,7 см меньше, а количество боковых побегов на 0,4 больше, чем у растений в контроле.

Низкая концентрация 2-іР – $1 \times 10^{-8} \text{M}$, также как и ВА, обуславливает более замедленное формирование побега. Так, высота основного побега у растений на 0,1 см меньше, количество узлов то же, что и в контроле, высота боковых побегов на 0,4 см меньше, количество боковых побегов на 0,1 меньше, чем у контрольных растений.

Кинетин в более высокой концентрации $1 \times 10^{-6} \text{M}$ обуславливает наиболее интенсивный рост и развитие побега. Так, в этом случае высота основного побега на 0,7 см выше, количество узлов на основном побеге больше на 1, высота боковых побегов больше на 1,2 см, количество боковых побегов больше на 1,0, чем в контроле.

ВА в концентрации $1 \times 10^{-6} \text{M}$ больше ингибирует рост основного побега. Так, высота основного побега меньше на 0,8 см, количество узлов на 0,9 меньше чем у растений в контроле, однако ВА в этой концентрации обуславливает более интенсивное развитие боковых побегов. Высота боковых побегов при этой концентрации ВА на 0,8 больше, количество боковых побегов на 1,5 больше, чем у контрольных растений.

2-іР в концентрации $1 \times 10^{-6} \text{M}$ обуславливает высоту основного побега на 0,1 см выше, чем в контроле, количество узлов остается то же, что и в

контроле, высота боковых побегов на 0,1 см ниже, количество боковых побегов на 0,9 больше, чем в контроле.

Высокая концентрация кинетина – 1×10^{-4} М сильно ингибирует развитие основного побега. Так, в этом случае высота основного побега ниже на 8,1 см, количество узлов меньше на 5,6, высота боковых побегов меньше на 1,5 см, количество боковых побегов на 0,7 меньше, чем у растений в контроле.

Высокая концентрация ВА - 1×10^{-4} М к концу периода культивирования вызывает некроз экспланта.

2-іР в концентрации 1×10^{-4} М практически не оказывает сильного влияния на рост основного побега - он на 0,1 см ниже, количество узлов на 0,2 больше, чем в контроле. Эта концентрация 2-іР активизирует развитие боковых побегов, количество которых на 0,9 больше, а высота боковых побегов на 0,8 см выше, чем у растений в контроле.

Данные экспериментов по определению влияния различных концентраций экзогенных цитокининов на развитие корневой системы представлены в таблице 3.2.

Так, по данным, представленным в таблице 3.2, можно сказать, что все изучаемые цитокинины во всех указанных концентрациях оказывают более или менее выраженное негативное влияние на развитие корневой системы.

Даже низкая концентрация кинетина – 1×10^{-8} М заметно ингибирует развитие корневой системы. При этой концентрации кинетина длина корней на 0,8 см меньше, количество корней на 0.9 меньше, чем у растений в контроле.

Влияние цитокининов различной структуры на развитие корневой системы

Цитокинин	Концентрация (М)	Развитие корневой системы			
		Кол-во корней	Разница по отношению к контролю**	Длина корней (см)	Разница по отношению к контролю
Кинетин	1×10^{-8}	3,9	-0,9	3,5	-0,2
	1×10^{-6}	2,8	-2,0	2,4	-1,9
	1×10^{-4}	1,4	-3,4	1,2	-3,1
ВА	1×10^{-8}	3,2	-1,6	2,2	-2,1
	1×10^{-6}	2,3	-2,5	1,8	-2,5
	1×10^{-4}	некроз		некроз	
2-іРa	1×10^{-8}	4,2	-0,6	3,7	-0,6
	1×10^{-6}	3,1	-1,7	2,8	-1,5
	1×10^{-4}	2,1	-2,7	2,3	-2,0
Контроль*		4,8		4,3	

*Контроль – среда без регуляторов роста

** - знак «+» обозначает насколько больше количественное выражение этого параметра по сравнению с тем же параметром в контроле, знак «-» обозначает насколько меньше количественное выражение этого параметра по сравнению с тем же параметром в контроле

Низкая концентрация ВА – 1×10^{-8} М в большей степени, чем кинетин, ингибирует развитие корней. В этом случае длина корней на 2,1 см меньше, а количество корней на 1,6 меньше по сравнению с контрольными растениями.

Наименьший ингибирующий эффект оказывает 2-іР в концентрации 1×10^{-8} М. В этом случае длина корней лишь на 0,6 см меньше, а количество корней на 0,6 меньше, чем у растений в контроле.

Увеличение концентрации цитокининов в среде для культивирования обуславливает увеличение их ингибирующего эффекта на развитие корневой системы. Так, в присутствии кинетина в концентрации 1×10^{-6} М длина корней на 1,9 см меньше, количество корней на 2,0 меньше, чем у растений в контроле. В присутствии ВА в концентрации 1×10^{-6} М длина корней на 2,1 см

меньше, количество корней на 2,5 меньше, чем в контроле. В присутствии 2-*iP* в концентрации 1×10^{-6} М длина корней на 1,5 см меньше, количество корней на 1,7 меньше, чем в контроле.

Наиболее высокая концентрация кинетина – 1×10^{-4} М оказывает наиболее ярко выраженный ингибирующий эффект на развитие корневой системы. В этом случае длина корней на 3,1 см меньше, количество корней на 3,4 меньше, чем в контроле.

ВА в концентрации 1×10^{-4} М (как указывалось выше) обуславливает некроз экспланта, признаки развития корневой системы полностью отсутствуют.

2-*iP* в концентрации 1×10^{-4} М также ингибирует образование корневой системы, но в меньшей степени, чем кинетин в этой концентрации. Так, длина корней при этой концентрации *iP* на 2,0 см меньше, количество корней на 2,7 меньше, чем в контроле.

Анализ полученных результатов четко показывает и структурную, и концентрационную зависимость действия экзогенных цитокининов на развитие растений при культивировании адвентивных почек. Именно то, что были использованы экспланты, находящиеся в одинаковом физиологическом состоянии (как указано выше) дает возможность четко обозначить различие в параметрах роста и развития в зависимости от структуры экзогенных кинетина, ВА и 2-*iP*. Используемые в экспериментах цитокинины являются N^6 -производными аденина, т. е. разница в их действии может быть обусловлена конкретным замещением по $-NH_2$ -группе в аденине.

Так, кинетин по сравнению с другими изученными цитокининами, в концентрации 1×10^{-6} М оказывает стимулирующий эффект на развитие побега по всем параметрам, обуславливая максимальные количественные показатели. ВА в этой концентрации заметно ингибирует развитие основного побега, но значительно стимулирует образование боковых побегов. По сравнению с кинетином эта концентрация ВА инициирует к развитию намного большее количество боковых побегов. 2-*iP* в этой концентрации

оказывает незначительное стимулирующее влияние на количество боковых побегов по сравнению с контрольным вариантом. Более высокая концентрация кинетина обуславливает сильное утолщение экспланта и подавляет развитие как основного побега, так и боковых побегов. Причем, на протяжении 18-23 дней культивирования эксплант развивается как клубень, после чего инициируется к росту апекс формирующегося побега. Высокая концентрация ВА оказывает четко выраженное негативное действие на экспланты, которые сильно утолщаются, признаки развития побега при этом отсутствуют, более 80%-в эксплантов некротируют к концу периода культивирования. В этой же концентрации 2-іР практически не оказывает влияния на развитие основного побега, но активнее стимулирует образование боковых побегов, уступая по этому параметру и кинетину и ВА.

По отношению к влиянию экзогенных цитокининов на развитие корневой системы можно сказать, что все изученные цитокинины даже в незначительных концентрациях оказывают ингибирующий эффект по таким параметрам, как длина корней и их количество. Чем выше концентрация экзогенного цитокинина, тем сильнее угнетается образование корней. Причем, следует отметить, что даже 2-іР, низкие концентрации которого практически не оказывали влияния на развитие побега, в этих же концентрациях подавлял образование корней. Среди изученных цитокининов наибольшим ингибирующим эффектом на развитие коневой системы проявил ВА, как в концентрации 1×10^{-6} М, так и в концентрации 1×10^{-8} М.

Сопоставляя эффекты высоких концентраций кинетина, ВА, и 2-іР, можно предположить, что наиболее мягкое воздействие 2-іР, возможно связано с тем, что 2-іР является эндогенным цитокинином и в растениях уже существует механизм регуляции его действия (нейтрализации избытка).

Структура кинетина, возможно, также может быть нейтрализована, так как известно, что кинетин и 2-іР обнаружены в составе РНК, следовательно эти структуры могут быть рибозидированы, а рибозидирование является формой нейтрализации в виде перевода в запасную неактивную форму [22-

23]. Рибозидирование, далее фосфорибозидирование (образование АМФ, АДФ и АТФ), возможно, включает экзогенный цитокинин в другие метаболические пути [22]. В этом случае активность экзогенного цитокинина будет проявляться до тех пор, пока он не вовлечется в другой метаболический путь.

ВА с этой точки зрения, скорее всего, меньше включается в механизм нейтрализации, растения не имеют системы нейтрализации ВА, что, очевидно, обуславливается наличием бензильной группы в замещении NH₂-группы аденина, хотя ВА, исходя из его действия в меньших концентрациях, можно назвать наиболее активным экзогенным цитокинином среди рассматриваемых.

Таким образом, становится очевидной функциональная роль N⁶-группы в структуре аденина в проявлении цитокининовых свойств молекулы аденина, а N⁹ - группа используется для инактивации цитокининов, скорее всего, путем рибозидирования или гликозидирования в общем [19-20, 23-25]. Действие экзогенных цитокининов зависит от того, что насколько их структура может быть включена в общую систему регуляции процессов роста и развития.

Действие экзогенных цитокининов находится в прямой зависимости от их структуры, а конкретно от замещения N⁶-группы в структуре аденина. Концентрационная зависимость действия экзогенных цитокининов показывает то, насколько в системе растения имеется возможность восприятия или нейтрализации этих структур. Все изученные цитокинины проявили разную активность по отношению к формированию основного и боковых побегов.

3.3. Определение влияния физиологического состояния латеральной почки и цитокининов на процессы регенерации.

Для определения влияния физиологического состояния исходного экспланта на процессы регенерации использовали следующий подход:

оттестированные на отсутствие вирусов растения картофеля *in vitro*, основной побег которых состоит из нескольких ярусов (ярус – участок стебля с боковым листом и пазушной, или латеральной почкой, верхушка побега – апекс побега с плотно прилегающими двумя или тремя листьями, далее именуется верхушечным ярусом) черенкуются и микрочеренки высаживаются на среды следующего состава: макро- и микросоли по Мурасиге и Скугу, витамины В5 по Гамборгу, инозитол – 100 мг/л, гидрализат казеина – 100 мг/л, сахароза – 80 г/л, кинетин – 0,01 мг/л, аденин – 40 мг/л (среда А, табл. 1), из расчета 4 мл среды на один эксплант. Условия культивирования стандартные: температура – 22⁰С, освещенность – 3000 Лк, фотопериод – 16:8 (день: ночь).

Следует отметить, что для размножения растений картофеля на среде предлагаемого состава не имеют значения условия предшествующего культивирования, растение, предназначенное для размножения, должно иметь несколько ярусов, которые можно отделить друг от друга.

При размножении растений картофеля микрочеренкованием на среде А, наблюдалась разница в темпах развития растений из микрочеренков в зависимости от того, на каком ярусе исходного растения находился микрочеренок (Табл. 3.3).

Далее изучалась интенсивность процессов роста и развития растений картофеля в зависимости от яруса расположения исходного микрочеренка.

Так, микрочеренки прикорневого яруса и верхушечного отличались замедленными темпами роста и развития основного побега и корневой системы (табл. 3.3). Микрочеренки прикорневых ярусов образовывали на 21-й день культивирования основной побег, состоящий из 6-8 ярусов, включая прикорневой и верхушечный, высота побега в среднем составляла 6,5 – 7,2 см в зависимости от генотипа. Микрочеренки верхушечных ярусов образовывали на 21-й день культивирования основной побег, состоящий из 3-5 ярусов, включая прикорневой и верхушечный, высота побега в среднем составляла 3,2 – 4,1 см. Разница наблюдалась и по формированию корневой

системы. Микрочеренки прикорневых ярусов образовывали на 21-й день культивирования по 3-5 корней длиной 2,2-3,4 см. Микрочеренки верхушечных ярусов образовывали на 21-й день культивирования по 2-4 корня длиной 1,4-2,1 см.

Микрочеренки средних ярусов, начиная от второго от корневой системы до верхушечного, отличались наиболее интенсивными, а главное синхронными темпами роста и развития как основного побега, так и корневой системы. Микрочеренки средних ярусов образовывали на 21-й день культивирования основной побег, состоящий из 7-9 ярусов, включая прикорневой и верхушечный, высота побега в среднем составляла 7,6 – 8,5 см. Микрочеренки средних ярусов образовывали на 21-й день культивирования по 6-9 корней длиной 4,5-7,2 см.

3.4 Интенсивность процесса клубнеобразования в зависимости от яруса расположения латеральной почки и экзогенных цитокининов.

В следующей части эксперимента изучалась интенсивность процесса клубнеобразования в зависимости от яруса расположения микрочеренка.

Для индукции процесса клубнеобразования использовали среду А и среду В, культивирование проводили в стандартных условиях. Пазушные - латеральные почки прикорневых ярусов на среде А культивировали двумя способами: в виде микрочеренка – то есть участка стебля непосредственно над корневой системой с почкой, или в среде для культивирования оставляли прикорневой ярус вместе с почкой (не вынимая из посуды для культивирования) после того, как срезали верхнюю и средние части растения. Для индукции процесса клубнеобразования меняли фотопериод – экспланта в течение 10 дней культивировались в стандартных условиях, через 10 дней убирались в темноту и культивировались в темноте до полного созревания микроклубней.

Также как и при размножении растений картофеля микрочеренкованием способность к клубнеобразованию сильно отличалась в

зависимости от яруса расположения микрочеренка. Так, на среде А микрочеренки средних ярусов, в отличие от прикорневого, начинали все образовывать по одному микроклубню после того, как микрочеренки убирались в темноту только на 30-40-й день от начала культивирования микрочеренка, тогда как все микрочеренки прикорневых ярусов начинали образовывать по одному микроклубню на 20-30-й день от начала культивирования микрочеренка (табл. 3.4). Верхушечные ярусы в подобных условиях начинали образовывать клубни в единичных случаях не раньше 60-ти дней культивирования от начала культивирования экспланта. В случае продолжения культивирования прикорневого яруса с корневой системой после того, как были срезаны верхние и средние ярусы растений, прикорневые ярусы начинали образовывать по 2 микроклубня на эксплант уже на 7-10-й день после того, как были убраны в темноту. Следует отметить, что все микроклубни, не зависимо от яруса расположения микрочеренка, в подобных условиях культивирования образовывались над поверхностью среды, что обуславливало у них полное отсутствие признаков остекленения. Таким образом, на среде А формирование созревших микроклубней происходило у микрочеренков прикорневых ярусов в течение 60-75 дней, у микрочеренков средних ярусов – в течение 70-85 дней, у верхушечных ярусов – в течение, как минимум 90 дней. Средний выход микроклубней в случае микрочеренков прикорневых ярусов составлял 1, 2 - 1.5 микроклубня на эксплант, в случае микрочеренков средних ярусов - 1,1 - 1,3 микроклубня на эксплант, в случае верхушечных ярусов – 0,3-0,5 микроклубня на эксплант. В случае культивирования прикорневого яруса с корневой системой на среде А формирование созревших микроклубней происходило в течение 45-60 дней от того момента, как они были убраны в темноту и средний выход микроклубней составил 2,1-2,4 микроклубня на эксплант.

При культивировании микрочеренков на среде В использовали 2 типа условий культивирования: стандартные и с измененным фотопериодом (табл. 3.5).

При культивировании микрочеренков на среде В также прослеживалась разница в интенсивности процесса клубнеобразования в зависимости от яруса расположения экспланта. В отличие от среды А среда В обуславливала наиболее интенсивное клубнеобразование у верхушечных ярусов, как по темпам образования микроклубней, так и по количеству микроклубней на эксплант (табл. 3.5). Так, в случае культивирования на среде В микрочеренков прикорневых ярусов, микроклубни начинали образовываться на 25-40-й день от начала культивирования экспланта, среднее количество клубней на эксплант составляло 0,2-0,5, в случае культивирования на среде В микрочеренков средних ярусов, микроклубни начинали образовываться на 15-30-й день от начала культивирования экспланта, среднее количество клубней на эксплант составляло 0,6-0,9 в случае культивирования на среде В микрочеренков верхушечных ярусов, микроклубни начинали образовываться уже на 7-10-й день от начала культивирования экспланта, среднее количество клубней на эксплант составляло 1,3-1,8. При культивировании микрочеренков на среде В интенсивность процесса клубнеобразования не зависела от изменения фотопериода (Рис. 1, 2).

Таким образом, были определены наиболее оптимальные условия микроразмножения картофеля, которые заключаются в следующем.

Микрочеренки безвирусных растений картофеля, полученных *in vitro*, высаживаются на среду А и культивируются в стандартных условиях. Через 21 день культивирования высаженные на состав А микрочеренки образуют растения, побег которых состоит из 7-9 ярусов, растения имеют хорошо развитую корневую систему. Через 21 день культивирования, образовавшиеся растения размножаются по следующей схеме:

Верхушечная часть растения срезается и высаживаются на среду В для получения микроклубней в стандартных условиях. Часть растения между верхушечным и первым прикорневым ярусом черенкуется и черенки высаживаются на среду А для микроразмножения, культивируются в

стандартных условиях. Первые прикорневые ярусы вместе с корневой системой оставляются в сосуде для культивирования (не вынимаются) в течение 10 дней культивируются в стандартных условиях, после чего убираются в темноту для получения микроклубней.

**Рост и развитие растений картофеля на среде А в зависимости от яруса расположения латеральной почки
(через три недели культивирования после посадки экспланта)**

Сорта и линии	Развитие побега										Развитие корневой системы									
	1-й ярус (прикорневой)		2-й ярус (средний)		3-й ярус (средний)		4-й ярус (средний)		5-й ярус (верхушечный)		1-й ярус (прикорневой)		2-й ярус (средний)		3-й ярус (средний)		4-й ярус (средний)		5-й ярус (верхушечный)	
	Высота побега (см)	Кол-во узлов	Высота побега (см)	Кол-во узлов	Высота побега (см)	Кол-во узлов	Высота побега (см)	Кол-во узлов	Высота побега (см)	Кол-во узлов	Длина корней (см)	Кол-во корней	Длина корней (см)	Кол-во корней	Длина корней (см)	Кол-во корней	Длина корней (см)	Кол-во корней	Длина корней (см)	Кол-во корней
Сорт Невский	6,5	7,3	7,2	7,1	7,3	7,0	7,2	7,1	3,8	4,7	2,7	4,9	6,3	8,3	6,2	8,3	6,1	8,1	1,9	3,5
Сорт Акроб	6,3	5,9	7,6	7,2	7,7	7,3	7,5	7,3	3,2	3,1	2,2	3,0	4,6	6,1	4,5	6,2	4,5	5,9	1,5	2,1
Линия С-2	6,5	6,9	8,4	8,3	8,5	8,2	8,3	8,2	3,9	4,5	2,6	4,3	5,9	5,8	6,0	5,7	5,9	5,7	1,8	3,6
Линия С-5	6,7	7,1	8,3	8,2	9,4	8,7	8,3	8,5	4,0	4,3	2,9	4,7	6,5	8,6	6,5	8,3	6,3	7,9	1,8	3,7
Линия С-10	6,9	7,8	8,5	8,2	8,4	8,2	8,3	8,4	3,9	4,7	3,1	4,8	6,9	8,7	6,9	8,5	6,7	8,3	1,8	3,4
Линия С-16	6,8	7,9	8,8	9,1	9,0	8,9	8,8	8,9	3,8	4,3	2,8	4,7	6,8	8,5	6,5	8,5	6,4	8,3	1,9	3,2
Линия С-17	7,2	8,1	9,1	9,4	9,3	9,3	9,1	8,9	4,1	5,1	3,4	5,2	7,2	9,2	7,2	9,1	7,1	8,9	2,1	4,1

В эксперименте использовали по 100,0 эксплантов каждого генотипа, данные обобщали в результате 3-х кратной повторности эксперимента.

Таблица 3.4

**Интенсивность процесса клубнеобразования в зависимости от яруса расположения микрочеренка на среде А
(через 45 дней культивирования после посадки экспланта)**

Сорта и линии	Количество микроклубней на один эксплант											
	Фотопериод 16:8 (день:ночь)						10 дней культивирования при фотопериоде 16:8, затем перевод эксплантов в темноту					
	1-й ярус с корневой системой	1-й ярус (прикорне вой)	2-й ярус (средний)	3-й ярус (средний)	4-й ярус (средний)	5-й ярус (верхуше чный)	1-й ярус с корневой системой	1-й ярус (прикорн евой)	2-й ярус (средний)	3-й ярус (средний)	4-й ярус (средний)	5-й ярус (верхуше чный)
Сорт Невский	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,4	0,7	0,9	0,8	0,6	0,0
Сорт Акроб	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,1	0,5	0,3	0,3	0,2	0,0
Линия С-2	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	0,9	0,9	0,7	0,7	0,0
Линия С-5	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2	0,8	0,8	0,8	0,7	0,0
Линия С-10	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	0,9	0,9	0,8	0,8	0,0
Линия С-16	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,4	1,1	0,8	0,7	0,7	0,0
Линия С-17	1,2	0,3	0,1	0,1	0,0	0,0	2,7	1,4	1,2	1,1	1,3	0,0

**Интенсивность процесса клубнеобразования в зависимости от яруса расположения микрочеренка на среде В
(через 45 дней культивирования после посадки экспланта)**

Сорта и линии	Количество микроклубней на один эксплант											
	Фотопериод 16:8 (день:ночь)						10 дней культивирования при фотопериоде 16:8, затем перевод эксплантов в темноту					
	1-й ярус с корнев ой систем ой	1-й ярус (прикорн евой)	2-й ярус (средни й)	3-й ярус (средний)	4-й ярус (средни й)	5-й ярус (верхуше чный)	1-й ярус с корневой системой	1-й ярус (прикорн евой)	2-й ярус (средний)	3-й ярус (средний)	4-й ярус (средний)	5-й ярус (верхуше чный)
Сорт Невский	0,2	0,2	0,7	0,7	0,8	2,2	0,2	0,2	0,7	0,7	0,8	2,2
Сорт Акроб	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1,6	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1,6
Линия С-2	0,2	0,2	0,6	0,6	0,7	2,3	0,2	0,2	0,6	0,6	0,7	2,3
Линия С-5	0,3	0,3	0,7	0,7	0,7	2,3	0,3	0,3	0,7	0,7	0,7	2,3
Линия С-10	0,3	0,3	0,7	0,7	0,8	2,2	0,3	0,3	0,7	0,7	0,8	2,2
Линия С-16	0,2	0,2	0,5	0,6	0,8	2,1	0,2	0,2	0,5	0,6	0,8	2,1
Линия С-17	0,5	0,6	0,9	0,9	1,2	2,4	0,5	0,6	0,9	0,9	1,2	2,4

Очевидны преимущества данного способа, которые заключаются в том, что практически, размножение растений и индукция процесса клубнеобразования проходят в стандартных условиях. При культивировании по предлагаемому способу прикорневой ярус с корневой системой образует как минимум два клубня, только на основе изменения фотопериода. Клубни формируются над поверхностью среды, что исключает появление стекловидности и обуславливает нормальное созревание и тем самым улучшает способность к длительному хранению и адаптацию к грунту. Микрочеренки средних ярусов образуют растения, отличающиеся синхронностью процессов развития и быстрыми темпами роста, интенсивностью образования корневой системы, что позволяет растениям эффективно адаптироваться к грунту или, при дальнейшем микроразмножении прикорневая часть повторно используется для получения микроклубней. Верхушечные ярусы, отличающиеся наиболее медленными темпами развития как побега, так и корневой системы, используются для получения микроклубней на основе изменения гормонального состава. Данный способ основан на наиболее рациональном использовании потенциала различных частей растения.

В следующей части эксперимента изучалась способность к адаптации к грунту и продуктивность у растений и микроклубней картофеля.

Полученные данным способом растения, а также микроклубни, после прохождения периода покоя, высаживались в грунт в условиях теплицы-изолятора для получения миниклубней (табл. 3.6).

Таблица 3.6

Адаптация к грунту и продуктивность растений и микроклубней

Сорта и линии	% адаптированных растений	% адаптированных микроклубней	Среднее количество клубней с 1-го растения	Среднее количество клубней с 1-го микроклубня
Сорт Невский	100	100	7,1	7,2
Сорт Акроб	100	100	5,8	6,1
Линия С-2	100	100	7,3	7,4
Линия С-5	100	100	6,8	6,8
Линия С-10	100	100	10,2	10,5
Линия С-16	100	100	11,1	11,5
Линия С-17	100	100	12,6	12,7

Было показано, что растения и микроклубни, полученные данным способом, не зависимо от генотипа в 100 %-х случаев адаптируются к грунту.

Продуктивность растений в грунте составляет 7-12 клубней на одно растение в зависимости от сорта. Продуктивность микроклубней идентична продуктивности растений.

3.5. Стандартизация процессов микроразмножения и получения микроклубней

Любая продукция биотехнологии растений, за исключением клеточных линий – продуцентов определенных веществ, должна репродуцироваться в условиях грунта. Это касается продуктов клеточной селекции, генетической трансформации, оздоровленного материала или просто материала, требующего быстрого размножения. Так как биотехнологический продукт формируется в искусственных условиях, он зачастую оказывается непригодным для адаптации к грунту, не смотря на визуально нормальные морфологические признаки. Эта проблема и обусловила возникновение и быстрое развитие *ex vitro* технологий, которые направлены на репродуцирование в естественных условиях той продукции, которая производится на основе *in vitro* технологий. Основные задачи *ex vitro* технологий: обеспечение стабильного проявления в естественных условиях тех признаков, которые были заданы растению методами клеточных технологий; обеспечение такого физиологического состояния биотехнологического продукта, которое обеспечивает максимальную адаптацию к грунту и высокую продуктивность [13,15]. Ключевым моментом в производстве семенного картофеля высоких элитных классов является получение исходного оздоровленного материала и его быстрое размножение на основе методов клеточных технологий. Биотехнологический продукт в этом случае может быть представлен двумя видами продукции: безвирусными растениями или микроклубнями. Микроклубни имеют следующее преимущество – они могут переносить длительный период покоя,

вследствие чего могут быть накоплены в достаточном количестве для посадки в грунт. Основное требование к микроклубням – способность адаптироваться к грунту и быть высокопродуктивными в грунте. В связи с этим цель настоящей работы – оптимизация условий микроразмножения, обеспечивающих максимальную адаптационную способность микроклубней к грунту.

Материалом для исследований служили сорта картофеля Сарнав и Пском, полученные на основе отбора *in vitro* генетического материала из коллекции Международного центра картофеля (Лима, Перу) [11].

Способы микроразмножения и получения микроклубней были разработаны на базе Национального Университета Узбекистана им. Мирзо Улугбека и ИБОХ АН РУз [14].

Так как наибольшей регуляторной активностью при культивировании *in vitro* обладают экзогенные цитокинины [16] в первой части эксперимента изучалось влияние кинетина (фурфуроламинопурина) и аденина на процесс клубнеобразования в зависимости от экспланта (табл. 3.7).

Таблица 3.7

Интенсивность процесса клубнеобразования в зависимости от экспланта и экзогенных цитокининов (на 45-й день культивирования)

Состав регуляторов роста	Сорта	Количество микроклубней на один эксплант в зависимости от экспланта			
		Эксплант прикорневой части растения с корневой системой	Эксплант прикорневой части растения без корневой системы	Эксплант средней части растения	Эксплант апикальной части растения
Кинетин – 0,1 мг/л, аденин – 40 мг/л	Сарнав	2,7	1,4	1,1	0,0
	Пском	1,0	0,2	0,1	0,0
Кинетин – 20 мг/л	Сарнав	0,5	0,5	0,9	2,3
	Пском	0,1	0,2	0,4	1,3

Было показано, что процесс клубнеобразования сильно зависит от природы экспланта. Так, каждая используемая часть растения в идентичных

условиях отличается индивидуальной способностью к клубнеобразованию. Но, не смотря на сорт, наиболее эффективными способами индукции процесса клубнеобразования оказались: индукция процесса клубнеобразования у прикорневой части растения с корневой системой в присутствии 0,1 мг/л кинетина и 40 мг/л аденина и индукция процесса клубнеобразования у апикальной части растения в присутствии 20 мг/л кинетина.

В следующей части эксперимента изучалась адаптационная способность микроклубней к грунту (табл. 3.8).

Таблица 3.8

Адаптация к грунту и продуктивность микроклубней картофеля

Количественные показатели адаптационной способности и продуктивности (на 100 микроклубней)	Сорта картофеля	
	Сарнав	Пском
% адаптированных микроклубней, полученных в результате культивирования прикорневого яруса с корневой системой	100	100
% адаптированных микроклубней, полученных в результате культивирования апикальной части	100	100
Среднее количество клубней с 1-го микроклубня, полученного в результате культивирования прикорневого яруса с корневой системой (шт.)	12,7	10,3
Среднее количество клубней с 1-го микроклубня, полученного в результате культивирования апикальной части (шт.)	12,9	11,6

В результате было показано, что микроклубни картофеля, полученные на основе индукции процесса клубнеобразования из прикорневой части растения с корневой системой и апикальной части растения, не смотря на то, что эти процессы проходили в присутствии различных концентраций кинетина и аденина, обладают высокой адаптационной способностью к грунту и отличаются высокой продуктивностью. Полученные результаты

будут использованы при составлении технических условий и технологических инструкций по производству микроклубней картофеля.

В случае производства элитного семенного картофеля, базовым моментом, определяющим интенсивность производства в целом и себестоимость производимой продукции, является интенсивность получения и качество исходного безвирусного материала. Исходный безвирусный материал может быть произведен либо в виде безвирусных растений, либо в виде безвирусных микроклубней картофеля [11-15]. И тот и другой вид продукции производится методами клеточных технологий. Ввиду того, что в отличие от растений, микроклубни могут быть накоплены в достаточном количестве для высадки в грунт, не требуя наличия больших площадей энергоемких факторостатных комнат и того, что налаженное производство микроклубней высвобождает рабочее время высококвалифицированных специалистов, производство микроклубней обуславливает снижение себестоимости не только биотехнологической продукции, но и семенного картофеля элитных классов, производимого на основе репродуцирования биотехнологической продукции.

Ключевым моментов в производстве микроклубней является наличие способов, позволяющих индуцировать этот процесс за короткие сроки, синхронизировать процессы образования микроклубней и накопление ими биомассы не зависимо от сорта. Основными требованиями к микроклубням являются – полное отсутствие любого вида патогенов, физиологическая зрелость, обуславливающая нормальное прохождение периода покоя, 100%-ю адаптацию к условиям грунта и высокую продуктивность в грунте.

Нормально сформированный микроклубень картофеля, получаемый *in vitro*, абсолютно равноценен клубню, формирующемуся в грунте, то есть он обладает в полном объеме тем потенциалом, который обуславливает его прорастание, формирование надземной вегетативной массы и, в конечном итоге, формирование урожая. Причем урожайность микроклубня выше, чем

урожайность клубня, полученного в грунте, так как микроклубень, как указано, абсолютно свободен от любых видов патогенов.

Микроклубни могут быть получены тремя способами: индукцией процесса клубнеобразования у прикорневой части растения, индукцией процесса клубнеобразования у средней части растения и индукцией процесса клубнеобразования у верхушечной части растения *in vitro* [12-13]. Индукция процесса клубнеобразования у различных частей растения базируется на структура- и концентрационной зависимости активности экзогенных цитокининов [12]. Микроклубни, получаемые разными способами, отличаются по срокам формирования и созревания. Одной из основных задач при производстве микроклубней является стандартизация процесса созревания микроклубней по таким параметрам, как яровизация и инициация к росту проростков. В связи с этим цель настоящей работы – стандартизация процесса яровизации микроклубней, полученных различными способами.

В первой части эксперимента определялась зависимость сроков созревания микроклубней от способа их получения (табл. 1). Сроки индукции процесса клубнеобразования и созревания микроклубней определялись начиная от микрочеренкования и посадки эксплантов до полного созревания микроклубня.

**Срок созревания микроклубней в зависимости от способа
получения**

Часть растения	Сорт Сарнав		Сорт Пском	
	Срок индукции процесса клубнеобразования	Срок созревания микроклубней	Срок индукции процесса клубнеобразования	Срок созревания микроклубней
Прикорневая часть	14 – 21 день	75 – 80 дней	28 – 35 дней	85 – 90 дней
Средняя часть	28 – 40 день	90 – 100 дней	45 – 50 дней	100 – 120 дней
Верхушечная часть	7-14 день	40 – 45 дней	20 – 25 дней	90 – 100 дней

В результате было показано, что сроки индукции процесса клубнеобразования и сроки созревания микроклубней зависят от способа их получения. Два сорта образуют микроклубни в разные сроки, но с одинаковой закономерностью: наиболее быстро процесс клубнеобразования проходит у верхушечной части растения, наиболее медленно – у средней.

В следующей части эксперимента определялось влияние различных факторов на процессы яровизации и прорастания микроклубней. После окончательного накопления микроклубнями биомассы в течение 20 – 30 дней культивировали их на свету или в темноте. Было определено, что докультивирование на свету позволяет лучше сформироваться покровным тканям и вследствие этого пройти более длительный период покоя. После сбора микроклубней меняли температурный и световой режимы хранения. В результате было показано, что хранение микроклубней при температуре 5⁰С в темноте позволяет хранить их до 12 месяцев. Начиная с третьего месяца хранения, повышение температуры до 20 - 25⁰С без изменения освещения позволяет инициировать их к прорастанию. Перевод пророщенных микроклубней в освещенные условия замедляет рост проростка, но делает его более жизнеспособным.

Таким образом, было определено, что процесс яровизации микроклубней регулируется на уровне изменения температурного и световых режимов при их докультивировании и хранении. Полученные результаты

будут использованы при составлении технических условий и технологических инструкций по производству микроклубней картофеля.

ВЫВОДЫ

В результате проведенной работы можно сделать следующие выводы:

1. Адвентивные почки, находящиеся на разном удалении от апекса побега и корневой системы обладают различной регенерационной активностью. Наибольшими темпами роста отличаются почки, находящиеся в средней части растения.
2. Анализ действия на рост и развитие растений картофеля цитокининов различной структуры выявил, что среди бензиламинопурина (БАП), фурфуроаминопурина (кинетин) и изопентиламинопурина (2-ипа) наиболее активным является бензиламинопурин, но наиболее эффективным для размножения картофеля является фурфуроламинопурин.
3. Было определено, что для микроразмножения растений наиболее эффективным является культивирование микрочеренков средних ярусов в присутствии фурфуроламинопурина в концентрации $1 \times 10^{-8} \text{M}$.
4. Для индукции процесса клубнеобразования у прикорневой части растения также наиболее эффективным является фурфуроламинопурин в концентрации $1 \times 10^{-8} \text{M}$, а для индукции процесса клубнеобразования у апикальной части растения требуется повышение концентрации фурфуроламинопурина до $1 \times 10^{-4} \text{M}$.

Полученные в ходе выполнения данной работы результаты будут использованы при составлении технических условий и технологических инструкций по производству микроклубней картофеля.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каримов И.А. По пути безопасности и стабильного развития. Ташкент: «Узбекистан», 1998. – 413с.
2. Каримов И.А. За процветание Родины каждый из нас в ответе Т.9. Ташкент: «Узбекистан», 2001. – 399с.
3. Каримов И.А. Узбекистан на пороге XXI века: угроза безопасности, условия и гарантия прогресса. Ташкент. Узбекистан, 1997. с241-242.
4. Thorpe T. A. Somatic embryogenesis: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology // J.: Korean J. Plant Tiss. Cult., 2000. - № 27. - P. 245–258
5. Werner T., Motyka V., Strnad M., and Schmülling T. Regulation of plant growth by cytokinin // J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001. - № 98. - P. 10487–10492.
6. Shen X., Kane M.E., Chen J., Philips G.C. (2008) Effects of genotype, explant source, and plant growth regulators on indirect shoot organogenesis in *Dieffenbachia* cultivars // J.: In Vitro Cell. and Dev. Biol. – Plant, 2008. - № 44. - P. 282-288.
7. Werner T. and Schmülling T. Cytokinin action in plant development // J.: Curr. Opin. Plant Biol., 2009. - № 12. - P. 527–538.
8. Skoog F. and Miller C. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro // Symp Soc Exp Biol, 1957. - № 11. - P. 118–131.
9. Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., and Schmülling, T. (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 10487–10492
10. Холмуратов Э.Г., Насырова Г.Б. Структура-зависимое действие цитокининов в практическом применении биотехнологической коллекции картофеля // Вестник НУУз, Ташкент, 2009. - №3. - С. 175 – 177.

11. Joseph J. Kieber and G. Eric Schaller. (2010). The Perception of Cytokinin: A Story 50 Years in the Making. *Plant Physiology* 154:487-492.
12. Ioio RD, Nakamura K, Moubayidin L, Perilli S, Taniguchi M, Morita MT, Aoyama T, Costantino P and Sabatini S (2008) A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* 322: 1380–1384.
13. Gordon SP, Chickarmane VS, Ohno C and Meyerowitz EM (2009) Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 16529–16534.
14. Gan, S., and Amasino, R.M. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* (1995). 270, 1986–1988.
15. Nishimura C, Ohashi Y, Sato S, Kato T, Tabata S and Ueguchi C (2004) Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 1365–1377.
16. Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., and Schmülling, T. (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10487–10492.
17. Matsumoto-Kitano M, Kusumoto T, Tarkowski P, Kinoshita-Tsujimura K, Václavíková K, Miyawaki K and Kakimoto T (2008) Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 20027–20031
18. N. Hirose, K. Takei, T. Kuroha, T. Kamada-Nobusada, H. Hayashi, and H. Sakakibara (2008). Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J. Exp. Bot.* 59(1): 75 - 83.
19. Mok DW and Mok MC (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 89: 89–118
20. Brenner WG, Romanov GA, Köllmer I, Bürkle L, Schmülling T. Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified

- by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades // J.: The Plant Journal, 2005. № 44 – P. 314–333.
21. Phillips, G. C. In vitro morphogenesis in plants—recent advances (2004). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 40:342–345.
 22. Keiko Yonekura-Sakakibara, Mikiko Kojima, Tomoyuki Yamaya and Hitoshi Sakakibara. (2004). Molecular Characterization of Cytokinin-Responsive Histidine Kinases in Maize. Differential Ligand Preferences and Response to cis-Zeatin. *Plant Physiology* 134:1654-1661.
 23. Холмуратов Э.Г. Увеличение активности экзогенных цитокининов. Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы молекулярной биологии растений», Ташкент, 11-12 декабря 2008 г., с. 35-37.
 24. Холмуратов Э.Г., Ибрагимов А.П. Роль аденина в регуляции действия экзогенных цитокининов. Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы молекулярной биологии растений», Ташкент, 11-12 декабря 2008 г., с. 54-56.
 25. Э.Г. Холмуратов, Структурная и концентрационная зависимость действия экзогенных цитокининов при культивировании картофеля *in vitro*. //Вестник НУУз, 2010 г., №4, с 208 - 213.
 26. Э.Г. Холмуратов, Ш.И. Салихов, Г.Б. Насырова и др. Патент РУз «Способ микрклонального размножения картофеля для производства миниклубней». 2010 г., № IAP 20100388.
 27. Э.Г. Холмуратов, Г.Б. Насырова, акад. Ш.И. Салихов. Зависимость эффективности *ex vitro* технологии картофеля от *in vitro* технологии. //Вестник аграрной науки. 2010г. № 3-4 (41-42) с. 92-97.

28. Anna Cedzich, Harald Stransky, Burkhard Schulz and Wolf B. Frommer (2008). Characterization of Cytokinin and Adenine Transport in Arabidopsis Cell Cultures. *Plant Physiology* 148:1857-1867.
29. Холмуратов Э.Г., Ибрагимов А.П. Роль аденина в регуляции действия экзогенных цитокининов // Материалы Международной научно-практической конференции “Актуальные проблемы молекулярной биологии растений”, Ташкент, 2008. - С. 54-55.
30. Холмуратов Э.Г., Насырова Г.Б. Увеличение срока защиты оздоровленного семенного картофеля от проникновения патогенов с помощью производства микроклубней *in vitro* // Материалы Международной научно-практической конференции «Современное состояние картофелеводства и овощеводства и их научное обеспечение», Алматы, 2006. - С. 489-492.
31. Холмуратов Э.Г., Насырова Г.Б., Давронов К.Д., Буриев Х.Ч. Сохранение селекционных признаков клонами картофеля, полученными *in vitro*, при адаптации к открытому грунту// Материалы Международной научно-практической конференции «Теоретические и практические основы и перспективы развития селекции и семеноводства», Ташкент, 2002. - С. 124-127.
32. Cedzich A., Stransky H., Schulz B. and Frommer W.B. Characterization of Cytokinin and Adenine Transport in Arabidopsis Cell Cultures // *J.: Plant Physiology*, 2008. - № 148. - P. 1857-1867.
33. Coenen, C., and Lomax, T.L. Auxin-cytokinin interactions in higher plants: Old problems and new tools// *J.: Trends Plant Sci.*, 1997 - № 2. - P.351–356.
34. Collier R., Fuchs B., Walter N., Lutke W.K. and Taylor C.G. Ex vitro composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology // *J.: The Plant Journal*, 2005. - № 43. - P. 449–457.

35. Fernie A.R. and Willmitzer L. Molecular and Biochemical Triggers of Potato Tuber Development // J.: Plant Physiol, 2001. - V. 127. - P. 1459-1465.
36. Haberer G. and Joseph J. Kieber J.J. Cytokinins. New Insights into a Classic Phytohormone // J.: Plant Physiol, 2002. - V. 128. - P. 354-362.
37. Kieber J.J. and Schaller G. E. The Perception of Cytokinin: A Story 50 Years in the Making // J.: Plant Physiology, 2010. - V. 154. - P. 487-492.
38. Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H. and Kyojuka J. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme // J.: Nature, 2007. - № 445. - P. 652–655.
39. Leibfried A., To J.P.C., Stehling S.K.A., Busch W., Demar M., Kieber J.J. and Lohmann J.U. WUSCHEL controls meristem size by direct transcriptional regulation of cytokinin inducible response regulators // J.: Nature, 2005. - № 438. - P. 1172–1175.
40. Mok D.W. and Mok M.C. Cytokinin metabolism and action // Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 2001. - № 89. - P. 89–118.
41. Phillips G. C. (2004). In vitro morphogenesis in plants—recent advances // J.: In Vitro Cell. and Dev. Biol. - Plant, 2004. - № 40. - P. 342–345.
42. Ruzicka K., Simaskova M., Duclerq J., Petrasek J., Zazimalova E., Simon S., Friml J., Van Montagu M.C.E. and Benkova E. Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport // J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009. - № 106(11). - P. 4284 – 4289.
43. Sakakibara H. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation // Annu Rev. Plant Biol., 2006. - № 57. - P. 431–449.
44. Baskin, T.I., Cork, A., Williamson, R.E., and Gorst, J.R. (1995). *STUNTED PLANT 1*, a gene required for expansion in rapidly elongating but not in dividing cells and mediating root growth responses to applied cytokinin. Plant Physiol. 107, 233–243.

45. Coenen, C., and Lomax, T.L. (1997). Auxin-cytokinin interactions in higher plants: Old problems and new tools. *Trends Plant Sci.* 2, 351–356.
46. Mizukami, Y., and Fischer, R.L. (2000). Plant organ size control: *AINTEGUMENTA* regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 942–947.
47. Benková, E., Witters, E., Van Dongen, W., Kolář, J., Motyka, V., Brzobohatý, B., Van Onckelen, H., and Macháček, I. (1999). Cytokinins in tobacco and wheat chloroplasts: Occurrence and changes due to light/dark treatment. *Plant Physiol.* 121, 245–251.
48. Bhalerao, R.P., Eklöf, J., Ljung, K., Marchant, A., Bennett, M., and Sandberg, G. (2002). Shoot derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* 29, 325–332.
49. Beemster, G.T.S., and Baskin, T.I. (2000). *STUNTED PLANT 1* mediates effects of cytokinin, but not of auxin, on cell division and expansion in the root of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124, 1718–1727.
50. D'Agostino, I.B., Deruère, J., and Kieber, J.J. (2000). Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol.* 124, 1706–1717.
51. Clark, S.E., Jacobsen, S.E., Levin, J.Z., and Meyerowitz, E.M. (1996). The *CLAVATA* and *SHOOT MERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* 122, 1567–1575.
52. Gan, S., and Amasino, R.M. (1995). Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270, 1986–1988.
53. Mok, M.C. (1994). Cytokinins and plant development: An overview. In *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function*, D.W.S. Mok and M.C. Mok, eds (Boca Raton, FL: CRC Press), pp. 155–166.

54. Mok, D.W.S., and Mok, M.C. (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 89–118.
55. Motyka, V., Vařková, R., Āapková, V., Petrářek, J., Kamínek, M., and Schmülling, T. (2003). Cytokinin-induced upregulation of cytokinin oxidase activity in tobacco includes changes in enzyme glycosylation and secretion. *Physiol. Plant.* 117, 11–21.
56. В.В. Полевой, Т.С. Саламатова. Физиология роста и развития растений. Ленинград.Изд=во Лнинградского университета. 1001 г., с. 42-88.
57. Дж. Уотсон. Молекулярная биология гена. «Мир», Москва, 1978, с. 237-288.
58. Д. Мецлер. Биохимия.Т.1. «Мир», Москва, 1980, с. 134-138.
59. Skoog, F., and Miller, C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11, 118–131.
60. Anna Cedzich, Harald Stransky, Burkhard Schulz and Wolf B. Frommer. (2008) Characterization of Cytokinin and Adenine Transport in Arabidopsis Cell Cultures. *Plant Physiology* 148:1857-1867.

Список опубликованных статей

1.«Стандартизация процесса яровизации микроклубней картофеля, полученных в условиях *in vitro*», Абдурахмонова М.Ю., Ташмухамедов М.С., Ниезов Х.А., Насырова Г.Б., Рахимова В.С., Юсупова Г.М., Холмуратов Э.Г. ТКТИ, НУУз, Институт биоорганической химии им. акад. А.С. Садыкова АН РУз.

«Актуальные вопросы в области технических и социально – экономических наук» Республика межвузовский сборник. 101-103стр.

2.«Задачи *ex vitro* технологии при производстве семенного картофеля высоких элитных классов», Абдурахмонова М.Ю., Ташмухамедов М.С., Ниезов Х.А., Насырова Г.Б., Собирова М.Ш., Сагдуллаев Б.Е., Холмуратов Э.Г. ТКТИ, НУУз, Институт биоорганической химии им. акад. А.С. Садыкова АН РУз.

«Актуальные вопросы в области технических и социально – экономических наук» Республика межвузовский сборник. 103-105стр.

ИЛЛЮСТРАТИВНЫЙ МАТЕРИАЛ

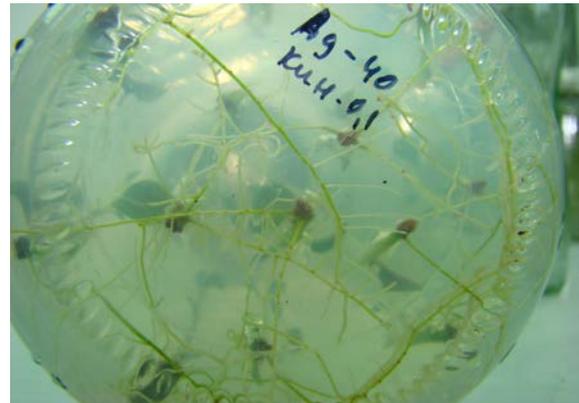


Рис. 1 Развитие побега и корневой системы у растений картофеля из средних ярусов

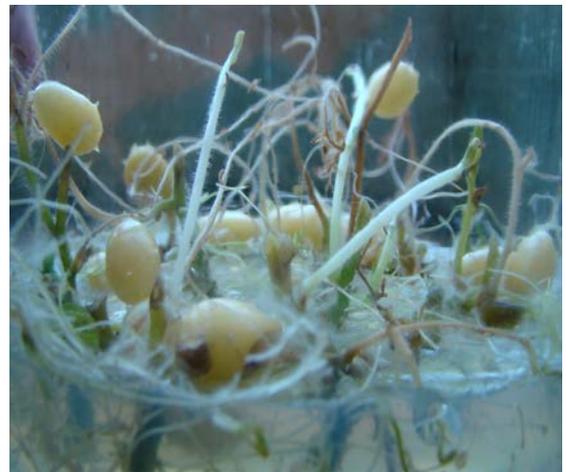


Рис.2 Получение микроклубней при повторном использовании прикорневой части с корневой системой



Рис.3 Apex побега на 21-й день культивирования



Рис. 4. Apex побега на 45 – й день культивирования



Рис. 5. Синхронизация процесса клубнеобразования у апикальной части растения



Рис. 6. Синхронизация процесса клубнеобразования у прикорневой части растений

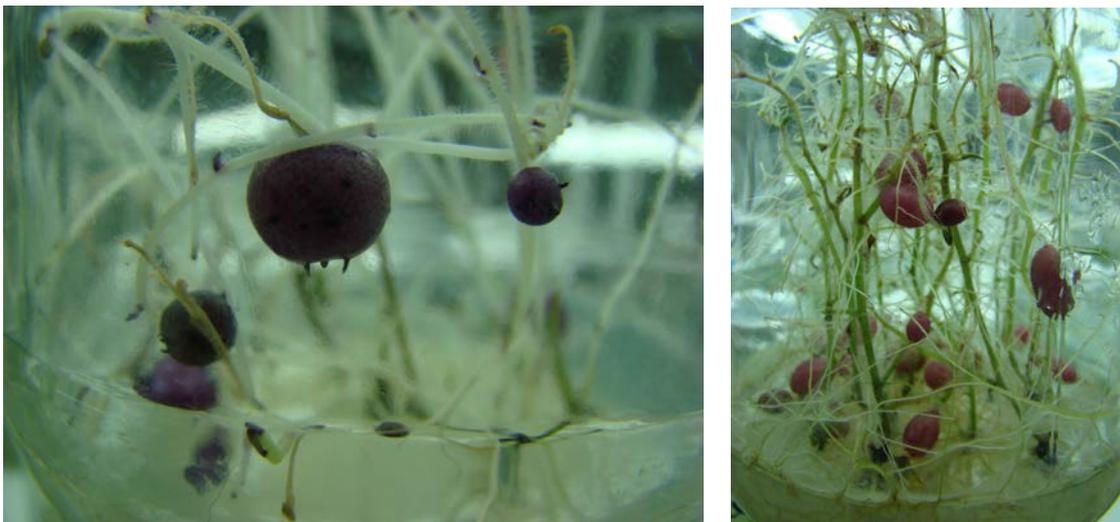


Рис. 7. Индукция процесса клубнеобразования у средней части растения



Рис. 8. Микроклубни картофеля сорта Сарнав, полученные *in vitro*



Рис. 9. Адаптация к грунту микроклубней картофеля, полученных
in vitro



Рис. 10. Клубнеобразование у растений картофеля в изоляторе