

МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАНА  
ТАШКЕНТСКИЙ ХИМИКО ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

*На правах рукописи*

**АКБАРХОДЖАЕВА ЗИЁДА БАТИРОВНА**

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ И  
СОСТАВ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА КЛУБНЕОБРАЗОВАНИЯ  
КАРТОФЕЛЯ IN VITRO**

Специальность 5А522907 "Биотехнология пищевых продуктов и кормов "

На соискание академической степени

магистра "Биотехнология пищевых продуктов и кормов "

**ДИССЕРТАЦИЯ**

Работа рассмотрена на кафедре  
«Биотехнологии»  
и рекомендована к защите  
Заведующий кафедрой  
Проф. д.х.н. М.С.Тошмухамедов

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2011

Декан факультета «Технология  
пищевых продуктов»  
Доц. к.т.н. Ш.А.Муталов

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2011

Научный  
Руководитель доцент  
кафедры биотехнологии  
доц.к.б.н.  
Р.М.Артикова \_\_\_\_\_  
« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2011

Ташкент - 2011

## О Г Л А В Л Е Н И Е

Введение.....	3
1 Обзор литературы.....	6
2. Обоснование и актуальность темы.....	28
3. Условия и методы проведения эксперимента.....	30
3.1. Условия проведения эксперимента.....	30
3.2. Основные объекты проводимого эксперимента.....	34
3.3. Цель и задачи эксперимента.....	34
3.4. Методика проведения эксперимента.....	35
4. Результаты эксперимента и их обсуждение.....	51
4.1. Влияние NaCl на рост и развитие побегов картофеля.....	57
4.2. Влияние MgSO <sub>4</sub> на рост и развитие побегов картофеля.....	61
4.3. Влияние повышенных концентраций солей на процесс клубнеобразования регенератов in vitro.....	63
4.4. Влияние повышенной температуры на клубнеобразования регенератов in vitro.....	66
Выводы .....	68
Список используемой литературы.....	69

## ВВЕДЕНИЕ

Картофель в Узбекистане относится к числу тех культур, ценность которых определяется незаменимостью на потребительском рынке. В Республике картофель возделывается исключительно как продовольственная культура, пользующаяся первоочередным спросом у потребителя.

Рекомендуемая ВОЗ норма потребления картофеля составляет 64 кг в год на душу населения, что при численности населения Узбекистана около 25 млн. человек дает оценку уровня потребления товарного картофеля населением республики около 1.5 млн. тонн в год. Соответственно, для производства данного объема товарного картофеля необходимо ежегодно производить (или закупать) от 7 до 10 тыс. тонн картофеля класса «элита».

Необходимо отметить, что недостаточная эффективность производства товарного картофеля обусловлена низким качеством семенного картофеля, который в силу своих биологических особенностей, в большей степени, чем другие сельскохозяйственные культуры, подвергается вирусным заболеваниям, снижающим урожайность ежегодно на 30-40%.

В настоящее время весь семенной материал картофеля класса «элита» импортируется. Это связано с тем, что в республике фактически отсутствует первичное и элитное семеноводство картофеля, а существующие семеноводческие хозяйства занимаются репродукцией импортируемого элитного семенного материала.

Сохранение репродуктивных свойств картофеля основывается на системе безвирусного семеноводства, перед которой стоит задача получения первичного безвирусного материала и его размножения в условиях, исключающих возможность повторного заражения.

В настоящее время преобладающую часть культивируемых производителями товарного картофеля сортов составляют сорта, ввозимые в Узбекистан из стран дальнего и ближнего зарубежья. Но, следует учесть, что отечественные сорта, такие как «Акроб», «Умид», «Туйимли», «Кайроки» лучше адаптированы к условиям Узбекистана и отличаются, по сравнению с ввозимыми сортами, более высокой урожайностью в условиях повышенных температур и ограниченного числа поливов. Ограничение расширения посевных площадей местных сортов картофеля обуславливается недостаточностью производства качественного семенного материала, что, в принципе, связано с отсутствием налаженной базы первичного семеноводства. Нужно отметить, что именно по причине отсутствия семенного материала, из ассортимента сортов, возделываемых в Узбекистане, оказался исключен такой популярный сорт, как «Кайроки», пользующийся до настоящего времени большим спросом у производителей товарного картофеля. Спрос на этот сорт обуславливается не только высокими вкусовыми качествами, но и такими свойствами, как высокая жаростойкость, определяющая способность давать хорошие урожаи при высоких летних температурах, дефиците воды и засоленных почвах. Помимо этого, для «Кайроки» характерен такой важный для производителей картофеля признак, как хорошая лежкость. Такими же показателями отличаются сорта «Умид», «Акроб», «Туйимли». Получение оздоровленного семенного материала на основе методов культуры тканей растений давно и широко применяется в странах – поставщиках семенного картофеля на мировой рынок.

Если учесть, что в Узбекистане в период с 1990 по 2010-й год доля засоленных земель (при общей площади орошаемых площадей около 3,5 млн. га) выросла с 48,2 до 64,4%, соответственно, доля слабо засоленных земель выросла с 27 до 35,4%, средне засоленных земель – с 15,8 до 17,9% и сильно

засоленных земель – с 5,4 до 11,2%., то очевидно, что исследования в области воздействия повышенных концентраций солей и повышенной температуры на клубнеобразования картофеля *in vitro*, являются весьма своевременными и актуальными.

Целью настоящей работы являлось – влияние повышенной температуры и состав питательной среды на процесс клубнеобразования картофеля различных сортов и линий картофеля *in vitro*.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- Подготовка однородного исходного материала сортов и линий картофеля *in vitro*.
- Изучение влияния повышенных концентраций NaCl на клубнеобразования картофеля.
- Изучение влияния повышенной температуры на рост и развития, клубнеобразования картофеля.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В настоящее время развитие направлений в биотехнологии растений происходит по-разному. Многие из того, что входит в современную биотехнологию растений, развивалось на базе методов культивирования клеток и тканей растений свыше 50 лет. Трудности, возникающие при культивировании растений *in vitro*, постепенно устраняются. Но очевидна необходимость стратегических исследований по прикладным наукам, в данном случае биотехнологии растений. Для того чтобы новая технология могла реализовывать свой истинный потенциал, необходимы фундаментальные исследования.

В связи с высокой экономической и питательной ценностью картофеля (*Solanum tuberosum* L.) как сельскохозяйственной культуры, выращиваемой как в развитых, так и в развивающихся странах, картофель является объектом обширных исследований в самых различных областях интересов, включая устойчивость к вирусам, толерантность к абиотическим стрессам и улучшение питательных свойств, а также содержание крахмала. Как показывает обзор работ, связанных с вышеуказанной проблемой, исследования в данной области во всем мире являются чрезвычайно актуальными и востребованными.

В настоящее время картофель является основной овощной культурой, которая выращивается на площади более 56.000 га, или более ¼ площади под овощными культурами. Ежегодное производство картофеля составляет около 700 – 750 тысяч тонн (на общую сумму около 150 млн. долл. США), из которых около 80% составляет товарный картофель (из которого, в свою очередь, 1-2% используется на производство картофельных чипсов), а оставшиеся 20% - семенной картофель. Между тем, в соответствии со стандартами ФАО,

предполагаемый спрос в республике на картофель составляет около 1,2 млн. тонн и имеется острая необходимость в существенном увеличении производства картофеля.

Система производства картофеля в стране включает в себя следующие институты:

- Министерство сельского хозяйства и некоторые специализированные организации, отвечающие за поставку и распределение семенного картофеля (например, компания «Узкартошкканавуруглари»).

- Фермерские хозяйства, занимающиеся производством товарного и, частично, семенного картофеля.

Более 90% семенного картофеля (стоимостью около 3-4 млн. долл.) ежегодно импортируется в страну, в основном, из Голландии (7 сортов) – Кардинал (около 5% посевных площадей), Романо (около 30%), Пикассо (15%), Диамант (14%), Санте (25%), Кондор (2,1%), Курода (0,6%). Также в стране культивируются три местных сорта - Туйимли (5% посевных площадей), Умид и Акроб (3%) и российский сорт Невский (2,2%).

Основными причинами, тормозящими развитие производства как товарного, так и семенного картофеля, являются высокая чувствительность местных сортов картофеля к биотическим и абиотическим стресс-факторам. Например, в число основных вредителей растений картофеля входят колорадский жук (приводит к потерям урожая картофеля в размере более 20-30%, т.е. на сумму около 30 млн. долл. США ежегодно), ржавчинный клещ, проволочник, белокрылка. Основные патогены – вирус табачной мозаики (ВТМ), вирусы типа X и Y (пока еще не идентифицированы в связи с отсутствием средств и необходимого оборудования), вирус скручивания листьев. Есть также некоторые грибковые инфекции типа фузариоза.

При этом, оценка зараженности семенного картофеля проводится в соответствии с местными стандартами. Для предотвращения высоких потерь урожая проводится химическая обработка растений картофеля в процессе выращивания импортными инсектицидами (в основном, японского и немецкого производства). В связи с особенностями местного климата (высокие температуры) количество используемых химикатов существенно (на 30-50%) превышает аналогичный уровень в странах с более умеренным климатом. В связи с этим в стране постоянно увеличивается уровень загрязнения окружающей среды.

При хранении картофеля никакой дополнительной обработки для сохранения картофеля не проводится в связи с отсутствием средств. Биологические методы защиты не используются в связи с их отсутствием.

Среди основных абиотических стресс-факторов следует отметить дефицит водных ресурсов, повышенное содержание солей в воде и грунте, а также резкий перепад температур.

Таким образом, как отмечалось выше, совокупность биотических и абиотических факторов является очень серьезной проблемой, т.к. приводит к снижению урожайности картофеля, равно как и потерям его урожая при хранении, на 30-40% ежегодно.

В России ежегодные потери урожая картофеля только от колорадского жука составляют, оценочно, около 4 млрд.долл.США [6].

В самом Узбекистане, по общим оценкам, потери урожая, обусловленные абиотическими и биотическими стрессами, также весьма значительны и составляют 30-40% или около 60 млн.долл.США ежегодно.

Соответственно, в контексте исследования абиотических и биотических стрессов, наиболее важными представляются следующие основные аспекты:

- Морфологические, физиологические, биохимические и генетические характеристики и факторы, влияющие на способность растений выживать в условиях водного дефицита, высоких/низких температур и повышенных концентраций солей.

- Растительные и экологические факторы и модели, прямо влияющие на урожайность.

- Молекулярно-генетические подходы, обеспечивающие специфическую устойчивость к основным инсектам и болезням.

В связи с вышеуказанными аспектами интересные морфо-физиологические исследования были проведены на 15 сортах батата с целью их скрининга на толерантность к засухе [38]. Аналогичные работы были проведены на различных сельскохозяйственных культурах растений для сравнения некоторых специфических параметров роста и урожайности растений [19].

Заметными среди работ, проводимых в настоящее время, являются исследования группы, проводимой под руководством Dr. Dieter Becker и Dr. Wolfgang Rohde в Институте Макса Планка (Германия) по двум направлениям – устойчивость к вирусам и улучшение свойств (толерантность к абиотическим стрессам, состав крахмала).

Обширные и значимые исследования ряда сельскохозяйственных культур проводятся в настоящее время в США, в частности, под руководством Р. Аллена и П. Пайтона позволил выявить возможность использования нижеизложенного уникального и многоэтапного модельного подхода, который приносит успешные результаты:

- Сравнение различных групп растений (дикие растения, мутанты, коммерческие сорта и трансгенные растения) в связи с их способностью к ответу на стресс (водный дефицит, низкие температуры и т.д.).
- Фенотипическая оценка: визуальная оценка растений, оценка на выживаемость или сверхчувствительность, влияние на урожай/качество урожая.
- Физиологическая оценка: измерение метаболических параметров для оценки общего состояния/здоровья растения в условиях стресса/ фотосинтез, ферменты, метаболиты.
- Молекулярно-генетическая оценка: определение генетической основы растений, контроль экспрессии генов, идентификация генов, потенциально отвечающих за толерантность к стрессам/ картирование и клонирование генов, потенциально отвечающих за резистентность к стрессам/ характеристика трансгенных растений.

Ряд исследователей показали, что толерантность к стрессам включает механизмы, которые позволяют растениям поддерживать их метаболизм и ограничивать вредное воздействие стресс-факторов [21,23]. Эти механизмы могут включать различные пути внутри клетки, но конечным результатом является экспрессия генов отклика на стрессы. Эти гены разделяются на 5 категорий: осмо-протекторы, вывод ионов, экспорт ионов, модификация клеточной мембраны и ферменты антиоксидантной системы.

Осмотическое регулирование растений достигается, в основном, путем аккумуляции соединений с низкомолекулярной массой, называемых «осмолитами»[18]. Они включают в себя глицин, бетаин, пролин, а также такие сахара, как маннитол (который действует как сборщик гидроксильных радикалов *in vitro*), трехалозу (дисахарид глюкозы, который придает высокую толерантность к дегидрированию), фруктанты (молекулы полифруктозы) и Д-

ононитол, который поддерживает осмотический баланс ионов  $\text{Na}^+$ . Осмолиты имеют высокую растворимость и поэтому обеспечивают высокий осмотический потенциал в листьях.

Трансгенные технологии также успешно применяются и в отношении повышения толерантности растений к биотическим стрессам. Так, высокий уровень резистентности растений картофеля в поле к ВСКЛ был достигнут недавно ведущей группой исследователей USDA-ARS, Vegetable and Forage Crop Production в г. Проссере, штат Вашингтон.

Фундаментальные и прикладные исследования, связанные с биотехнологией растений, активно ведутся в настоящее время многими научными и коммерческими организациями. В странах СНГ, в первую очередь, подобные работы проводят в России, Украине и Белоруссии. Среди лидирующих в этих странах научных центров можно отметить Центр «Биоинженерия» РАН (РФ), Институт Физиологии Растений РАН (РФ), Всероссийский НИИ защиты растений (РФ), Киевский государственный университет (Украина). В странах дальнего зарубежья трансгенные технологии используются очень интенсивно. В настоящее время данные исследования проводятся как общественными институтами (такими как Орегонский и Техасский государственные университеты, Университет штата Айдахо, Вашингтонском и Мичиганском университетах, СІР в Перу, программе USDA-ARS), так и такими коммерчески ориентированными компаниями как Monsanto, JR Simplot, McCain Foods, Conagra Foods и др.

Вслед за недавним успешным созданием трансгенных растений картофеля, толерантных к ВСКЛ, открылись новые перспективы в промышленном мире. Так, совсем недавно российские ученые из Центра «Биоинженерия» совместно с компанией «Монсанто» провели презентацию успешно завершеного проекта по трансформации трех российских сортов картофеля генами устойчивости к

колорадскому жуку. Эти три сорта выращиваются на площади, составляющей около 52% от всех посевных площадей в России. Коммерческое производство данных новых трансгенных сортов позволит России экономить около 2,5 млрд. долл. США ежегодно.

Исследователи Техасского Технологического Университета достигли больших успехов с помощью своего протокола переноса генов APX и GR, приводящего к увеличению фотосинтетической активности некоторых трансформированных растений. В частности, было отмечено заметное повышение урожайности трансформированных сортов хлопчатника (по сравнению с нетрансформированными) после их охлаждения [37]. Аналогичный результат был получен на трансгенных растениях табака при увеличении активности SOD [39], APX [17] и GR [32], а также на трансгенном тополе – при увеличении активности GR. Некоторые трансгены были запатентованы и предложены для совместного использования для трансформации любых культур, представляющих агрономический интерес для зарубежных исследователей. Таким образом Техасский Технологический Университет является одним из первых общественно финансируемых институтов, предлагающих данную современную технологию для развития мира и имеющих контракт с партнерами стран третьего мира в Центральной и Юго-Восточной Азии.

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.

Повышение интереса к данной проблеме в настоящее время обусловлено привлечением методов молекулярной биологии и использованием в качестве моделей клеточных культур и трансгенных растений. В связи с этим особенно важно оценить сведения, полученные в физиологических экспериментах.

Цель данной работы состояла в том, чтобы на основе обобщения собственных и литературных данных попытаться представить общую картину процесса клубнеобразования.

Клубнеобразование — сложный процесс, включающий образование stolонов, индукцию и образование клубней, их дальнейший рост и созревание. Stolоны являются латеральными побегами, сформированными базальными почками под поверхностью почвы. Почки, формирующие stolоны, закладываются на втором этапе органогенеза монокарпического побега [10]. На этом этапе онтогенеза в результате реализации морфогенетической информации определяются два типа морфоструктур: специализированные побеги вегетативного размножения (stолоны) и дублирующие структуры (побеги надземной части).

Начало заложения почек не зависит от фотопериода. Однако изменение гормонального статуса на коротком дне (снижения активности гиббереллинов и увеличения активности абсцизовой кислоты) влияет на функционирование базальных почек, формирующих подземные побеги. В результате у большинства видов происходит уменьшение их количества.

Анатомически stolон подобен стеблю, его структура адаптирована к транспорту воды и ассимилятов. Stolон растет в длину верхушкой. Длина

столона у различных видов растений варьирует в пределах от нескольких см до нескольких десятков см.

Объемный (радиальный) рост в субапикальной части столона (клубнеобразование) начинается на шестом этапе органогенеза, когда в генеративной сфере любого травянистого растения идут процессы микро- и макроспорогенеза. Другими словами, у многолетних травянистых растений клубнеобразование и развитие генеративной сферы начинаются в одно и то же время .

Таблица 1

### Анатомическая характеристика столонов

Вид, показатель	Столон	
	клубнеобразующий	неклубнеобразующий
<i>Solanum tuberosum</i> , сорт Приекульский ранний: число сосудов ксилемы/кв. мм толщина вторичной ксилемы (мкм) диаметр крупного сосуда (мкм)	1683 ± 87 111.6 ± 2.8 49.3 ± 3.5	827 ± 69 вторичная ксилема не развита 18.5 ± 2.8
<i>Helianthus tuberosus</i> , сорт Белый ранний: количество проводящих пучков на поперечном разрезе величина радиального сечения проводящего пучка (мкм) величина тангентального сечения проводящего пучка (мкм)	19.0 ± 1.0 453.3 ± 8.1 284.6 ± 4.2	14.0 ± 0.1 381.9 ± 6.6 214.3 ± 6.5

Анатомо-морфологические исследования показали, что разрастается субапикальная зона тех столонов, которые имеют более развитую проводящую систему (табл. 1). Поскольку к разрастанию переходили постоянные ткани

столона, можно полагать, что этому предшествует дедифференцировка клеток и существует фактор, который приводит клетки постоянной ткани в состояние готовности к делению [8]. Существование такого фактора доказано в опытах с прививками. На подвой — абсолютно качественные по фотопериодической реакции клубнеобразования виды картофеля *S. demissum* или *S. acaule* — сначала прививали петунию (сем. *Solanaceae*). Через три недели от прививок петунии оставляли отрезки стеблей без листьев, на которые прививали побеги *S. cardenasii*. Этот вид картофеля относится к нейтральной по фотопериодической реакции клубнеобразования группе и образует клубни независимо от продолжительности фотопериода. В условиях длинного дня подвой сформировали клубни. В другом опыте в качестве привоя на петунию использовали *S. demissum*. В условиях длинного дня подвой не образовал клубни, а на коротком дне у подвоя наблюдали переход столонов к клубнеобразованию. Следовательно, в индуцирующих условиях короткого дня в листьях привоя образовался фактор, который поступал в столоны подвоя, транспортируясь через стебли петунии.

У нейтральной группы видов, форм и сортов процесс формирования клубней канализирован и проявляется неизбежно, так как образование листового фактора не зависит от продолжительности фотопериода. У промежуточных (количественных по фотопериодической реакции клубнеобразования) растений образование листового фактора, по-видимому, происходит и в условиях длинного дня, но с низкой интенсивностью. Короткий фотопериод усиливает этот процесс, поэтому для исследования индукции клубнеобразования необходимо в качестве модельного объекта использовать виды с четко выраженным абсолютным фотопериодическим контролем. У таких видов листовая фактор образуется после продолжительного (более 40 дней) действия короткого (12 ч и менее) фотопериода.

Природа фактора клубнеобразования окончательно не установлена. До недавнего времени эту функцию отводили гормонам [12]. Сейчас в литературе на ключевую роль активно выдвигают тубероновую и жасмоновую кислоты [13], которые по физиологическому эффекту сходны с АБК. Однако в условиях длинного дня известные гормоны (ауксины, гиббереллины, цитокинины и абсцизовая кислота) не способны индуцировать переход столона в клубень у видов с абсолютным фотопериодическим контролем, т.е. у видов с короткодневной реакцией клубнеобразования. Данное заключение следует из многочисленных опытов с обработкой модельных растений и/или их столонов экзогенными гормонами (табл. 2).

Таблица 2

Влияние гормонов на клубнеобразование некоторых видов *Solanum*, *Ullucus tuberosus* и *Helianthus rigidus* в различных фотопериодических условиях

Вид, сорт	Фотопериодическая реакция клубнеобразования	Длинный день	Короткий день
<i>S. demissum</i>	качественная (абсолютная)	–	+
<i>S. acaule</i>	качественная (абсолютная)	–	+
<i>S. andigenum</i>	количественная	+	+
<i>S. ciezae</i>	нейтральная	+	+
<i>S. tuberosum</i> , сорт Детскосельский	нейтральная	+	+
<i>U. tuberosus</i>	качественная	–	+
<i>H. rigidus</i>	качественная	–	+

Разрастание тканей столона является комплексным процессом. Листовой фактор определяет готовность клеток к делению. Гормоны ИУК, ЦТК, ГК, АБК реализуют это состояние и соответственно морфофизиологический процесс (клубнеобразование). Они регулируют деление и рост клеток, способствуют созданию аттрагирующей силы, которая обеспечивает интенсивный приток ассимилятов и воды.

Формирование клубня включает два взаимосвязанных процесса: 1) последовательное деление и растяжение клеток внутренней и наружной паренхимы, 2) отложение запасных веществ — крахмала или других полисахаридов. Сухая биомасса клубней картофеля на 60% состоит из крахмала, клубни топинамбура накапливают инулин, а стахиса Зибольди — стахиозу. Основным продуктом, транспортируемым по флоэме в клетки паренхимы клубней, является сахароза. На ранних этапах формирования клубни характеризуются высоким содержанием растворимых сахаров, но довольно рано в них появляются полисахариды.

Рост клубня осуществляется за счет поступающих из листьев продуктов текущего фотосинтеза, а также ассимилятов, ранее депонированных в стеблях или других частях растения. Молодой клубень — мощный акцептирующий орган. С переходом растений к клубнеобразованию поток ассимилятов из большинства листьев надземных побегов ориентирован преимущественно в клубни.

Заметную роль в создании аттрагирующей силы играет дыхание [1]. Оно выступает как метаболический акцептор углерода и обеспечивает ростовые процессы энергией. Если путем полной дефолиации лишить формирующиеся клубни субстрата, то их дыхание снижается почти вдвое. Клубни представляют собой видоизмененные побеги, но по сравнению с надземными побегами их

дыхательная активность существенно (в четыре-шесть раз) ниже [7]. Причина столь большой разницы в дыхании обусловлена общим уровнем и направленностью метаболизма. Формирование специализированных органов, аттрагирующих ассимиляты и запасующих их в форме неструктурных углеводов, требует значительно меньших затрат энергии, чем формирование и поддержание побегов, несущих фотосинтетический аппарат. По нашим подсчетам, у картофеля, например, окислительным превращениям подвергается около 10% поступающего в клубни восстановленного углерода .

Клетки запасующей паренхимы клубней картофеля связаны с флоэмой множеством плазмодесм, по которым сахара диффундируют из ситовидных элементов в цитоплазму запасующих клеток [14]. Диффузия осуществляется по градиенту концентрации. В клетках паренхимы не вся сахара превращается в крахмал, часть ее входит в вакуоль. Синтез крахмала осуществляется с участием нескольких ферментов, активность которых изменяется в ходе радиального разрастания субапикальной зоны столона. Ключевым ферментом является АДФГ-пирофосфорилаза, катализирующая синтез аденозиндифосфат глюкозы, которая затем превращается в крахмал с участием крахмалсинтетазы. Эти процессы протекают в амилопластах. Активность АДФГ-пирофосфорилазы контролируется соотношением гормонов ГК:АБК. Крахмалсинтезирующая активность клубней возрастает с повышением эндогенного уровня АБК. В наших опытах [11] обработка растений хлорхолинхлоридом, ингибирующим синтез гиббереллинов на этапе превращения геранил-геранилпирофосфат, способствовала накоплению биомассы клубней и увеличению содержания в них высокополимерных углеводов (табл. 3). Такой же эффект оказывало воздействие на растения коротким днем, причем масса клубней возрастала в основном за счет

сокращения ранее депонированных ассимилятов. Только у отдельных видов наблюдали активацию фотосинтеза.

Таблица 3

Влияние короткого дня (КД) и хлорхолинхлорида (ССС) на накопление сухой массы клубней *Stachys sieboldii* и *Solanum andigenum*

Вид	Сухая масса, г/растение		
	Контроль	КД	ССС
<i>S. sieboldii</i>	1.3 ± 0.3	2.9 ± 0.7	2.9 ± 0.6
<i>S. andigenum</i>	5.6 ± 0.4	14.7 ± 0.8	14.5 ± 1.0

Возникшая в эволюции способность к клубнеобразованию играет важную роль в сохранении, выживании и распространении травянистых многолетников. Являясь органом побеговой природы, клубень обеспечивает вегетативное размножение даже в условиях, неблагоприятных для жизнедеятельности растений. Если для семенного воспроизведения необходим целый ряд специфических экологических факторов, то вегетативное осуществляется в широком диапазоне условий и является важнейшим резервом существования клубнеобразующих видов. С этих позиций радиальное разрастание метамеров подземного побега (с отложением в запас ассимилятов) можно рассматривать как процесс формирования вегетативной диаспоры, роль которой состоит в депонировании материнской генетической информации в ценозе.

Таким образом, клубнеобразование — это генетически детерминированный морфофизиологический процесс, возникший в ходе приспособительной эволюции. У большинства видов и форм

клубнеобразующих растений в геноме закрепились короткодневная реакция клубнеобразования, поэтому для индукции процесса необходим короткий день. Селекционные сорта клубнеобразующих растений, как правило, имеют нейтральную реакцию. Существует также множество переходных (промежуточных) видов и форм, у которых клубнеобразование усиливается под действием короткого дня. У этих растений сформирован автономный, не зависящий от длины дня, генетически закрепленный механизм, который запускает процесс клубнеобразования. В оптимальных условиях начало клубнеобразования и генеративного развития совпадают во времени.

Понимание морфофизиологии клубнеобразования как процесса радиального разрастания субапикальной зоны столона с депонированием ассимилятов помимо теоретического имеет большое практическое значение. Эти знания необходимы для разработки методов направленного воздействия и управления данной функцией в целях получения полезной продукции.

Для такой культуры, как картофель, биотехнологические методы в настоящее время находят все большее применение, что и определяет постоянное их совершенствование. Это обуславливается тем, что, во-первых, в странах с развитым аграрным сектором производство семенного картофеля полностью ориентируется на биотехнологических методах производства; во-вторых, получение новых сортов также все больше базируется на методах культивирования изолированных клеток, тканей и органов. Нужно отметить, что картофель, 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 поек), 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.

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. На данный момент растительный материал картофеля различной степени организации также используется для создания методами культуры тканей новых генотипов и для селекции требуемых сельскохозяйственных признаков.[34]

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 [5]. 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.

Как правило, на сегодняшний день в экспериментах по культивированию изолированных клеток и тканей растений *in vitro* основное внимание уделяется попыткам воздействия на морфофизиологические процессы на уровне трофической (соли, углеводы) или гормональной регуляции.

Как уже говорилось, картофель как объект исследования, находит очень широкое применение в биотехнологических работах. По отношению к картофелю разработаны не только методы микрклонального размножения и оздоровления, но и методы клеточной селекции, генетической трансформации. Так, очень интересными являются исследования [28] 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 [36],[21]. Осмотическое регулирование растений достигается, в основном, путем аккумуляции соединений с низкомолекулярной массой, называемых «осмолитами» [28].

Метод культуры изолированных тканей растений используется уже много лет, как для исследования процессов морфогенеза [3], 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, из изолированных тканей.

Первая коллекция живых растений картофеля, которая сохранилась до настоящего времени, была создана в 1927 г. в Ленинграде Вавиловым, Буксовым и Юзепчуком. В настоящее время существует несколько больших коллекций картофеля: национальная коллекция картофеля (СРС) Шотландского научно-исследовательского института по сельскому хозяйству в Пентландфилде, коллекция Межрегионального проекта по картофелю Стёрджен Бей, Висконсин, США, всемирная коллекция зародышевой плазмы Международного центра по картофелю [25], аргентинская коллекция картофеля Национального института технологии сельского хозяйства [26], Чилийский генобанк картофеля в Вальдивии ([24] и Голландско-немецкое отделение генобанка картофеля в Брауншвейге, ФРГ [44] и Международном центре картофеля в Лиме [40].

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 ([42], а также, размножать стеблевым черенкованием тщательно отгестированные 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 (за 6-7 лет исходный материал можно увеличить в 1000000 раз).

Методом микроклонирования этот срок можно сократить до одного – двух лет и в течение полугода из десяти исходных стерильных растений получить свыше полумиллиона растений.

Именно в связи с этим стерильное размножение в условиях *in vitro* имеет следующие большие преимущества: несравнимо с традиционным способом быстрое размножение и независимость от сезонных условий, а также, что является немаловажным, 2-3 – летняя защита от полевых патогенов. Применение технологий микроразмножения считается обязательным во всех странах - производителях семенного материала картофеля.

Размножение картофеля традиционными способами не представляет трудностей, но эта культура в большой степени подвержена вирусным

заболеваниям. Обычно для производства элитных семян необходимо шесть лет размножения в полевых условиях начиная от черенков, проверенных на инфицированность. За это время неизбежно происходит повторное заражение, даже в условиях с малочисленной популяцией тлей. При культивировании *in vitro*, во-первых, исключается возможность повторного заражения, во-вторых, за несколько месяцев можно получить то же число отводков, которое в поле получают по крайней мере за 5-6 лет [43].

Метод культивирования апикальных меристем вот уже много лет успешно применяется для получения свободных от вирусных инфекций растений картофеля и быстрого их размножения [11,29] Проводятся исследования по получению здорового растительного материала из изначально инфицированных растений [23]. Известно, что в США ведутся следующие исследования: в университете штата Орегон – “Production of Pre-nuclear potato seed. From Meristem to Mini-tubers”, аналогичная программа разрабатывается в университетах штатов Огайо, Миннесота, Техас, а также некоторыми крупными компаниями типа “American Ag-Tec International, Ltd.

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 определенные 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 [7].

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 др. полисахаридов [12]. 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 [7],[14]. Также было показано, что на процессы роста и развития растений картофеля *in vitro* оказывает положительное влияние совокупное и стадийное электровоздействие [15]. Однако, не смотря на многочисленные

исследования, возможность эффективной регуляции процесса клубнеобразования остается до конца не разработанной.

Исходя из всего вышесказанного, разработка биотехнологических способов оценки физиологического состояния растений, в том числе их потенциальной толерантности к тому или иному стресс-фактору, для такой незаменимой на потребительском рынке культуры, как картофель, является в настоящее время весьма актуальным.

## 2. ОБОСНОВАНИЕ И АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ

В настоящее время одной из основных экологических проблем Центрально-Азиатского региона является увеличивающееся год от года засоление почвы и повышенная температура. Именно эти факторы определяет большие потери урожаев многих сельскохозяйственных культур. К числу наиболее важных продовольственных культур, незаменимых на потребительском рынке, относится картофель. В Узбекистане картофель возделывается как в условиях предгорий, так и в условиях равнин. Именно в последнем случае актуальным является наличие в производстве сортов, отличающихся устойчивостью к засолению. В настоящее время работы многих исследователей посвящены изучению влияния стресс-факторов на рост и продуктивность сельскохозяйственных растений, а также на получение сортов, способных давать высокие урожаи в неблагоприятных условиях. К сожалению, в Узбекистане подобные работы по отношению к картофелю не проводились.

Полевые испытания сельскохозяйственных культур на устойчивость к тому или иному стресс-фактору по продолжительности занимают тот период времени, в течение которого проходит хотя бы одна вегетация – начиная с посадки семенного материала в почву, заканчивая получением урожая. Как правило, этот период длится не менее полугода. Также для проведения подобных работ требуются определенные земельные площади, затраты на агротехнику. В искусственных условиях возможно этот срок сократить в несколько раз и все эксперименты выполнить в лабораторных условиях.

Методы культивирования *in vitro* позволяют искусственно любые контролируемые условия, в том числе и условия стресса. Культивирование изолированных тканей и органов растений на искусственных питательных средах, содержащих различные концентрации солей, позволит определить

реакцию растений на эти соли и отобрать те генотипы, которые отличаются наибольшей устойчивостью к высоким концентрациям солей

Для получения качественного семенного картофеля достаточно использовать, как исходный материал, несколько клубней каждого из сортов. Первоначально в культуру *in vitro* вводятся изолированные верхушечные точки роста побегов и из них получают растения – регенеранты. Среди регенерантов отбираются здоровые растения и размножаются методом микроклонирования. Все эти этапы работы проводятся в лабораторных условиях, культивирование, сначала изолированных тканей (меристема), затем органов (микрочеренки) растений, проводятся в контролируемых искусственных условиях в присутствии различных компонентов, обеспечивающих рост и формирование растений. Поскольку продуктом картофелеводства являются клубни, а процесс клубнеобразования является основным, интересующим нас показателем в данное исследование так же ходит индукция процесса клубнеобразования и сравнительный анализ данного процесса в зависимости от от состава питательной среда и условий культивирования.

### **3. УСЛОВИЯ И МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА**

#### **3.1 Условия проведения экспериментов.**

Данная работа выполняется на базе Научно-исследовательского центра Биотехнологии. Химического факультета Ташкентского Национального Университета

Основой помещения для работы с культурой ткани является специализированный блок, состоящий из комнаты для приготовления питательных сред, асептического помещения, термостатированного помещения, моечной комнаты, помещения для стерилизации сред, инструментов и материалов, помещения для изолированных культур.

Моечная комната при большом объеме работы должна быть свободной по площади и комплектована мойками, снабженными холодной и горячей водой, дистиллятором и бидистиллятором. В моечной комнате установлены стеллажи для сушки посуды и сушильные шкафы.

Помещение для стерилизации сред, инструментов и материалов оборудовано автоклавами, сушильными шкафами для стерилизации сухим жаром, дистиллятором и бидистиллятором, столами для размещения тсерилизуемых сред и материалов, шкафами для их хранения. Это помещение должно быть хорошо проветриваемым. Совмещение этого помещения с моечной комнатой нежелательно, так как возможно попадание кислот, щелочей и детергентов в питательные среды.

Стерильное помещение для изоляции и пересадки культур наиболее важное в специализированном блоке. Это помещение оборудовано ламинар-боксами (камерами ламинарного потока стерильного воздуха), снабженными газовыми горелками. В стерильном боксе не должно быть лишних предметов во избежание заражения изолируемых тканей. Желательно использовать рабочие столы, покрытые гладким легко стерилизующимся материалом. Пол,

потолок, стены и другие поверхности материалами, на которые мало садится пыль, и их можно легко мыть и дезинфицировать. В бокс поступает стерильный кондиционированный воздух. Для этой цели используют специальные очистительные фильтры. Стерильность воздуха достигается также с помощью бактерицидных ламп.

В термостатированном помещении (культуральная) с кондиционированным воздухом, строго регулируемой температурой (для большинства культур 25-27°C) и относительной влажностью воздуха (70%) на стеллажах и полках размещают изолированные культуры. Необходимо искусственное освещение с регулируемой интенсивностью и спектральным составом света. Недопустимо поступление в культуральную комнату различных летучих веществ, типа фенола.

Комната для приготовления питательных сред оборудована лабораторными столами, шкафами для хранения чистой посуды и реактивов, холодильниками для хранения некоторых реактивов, растворов и готовых питательных сред. Также в ней установлены аналитические и торсионные весы для взвешивания минеральных солей, углеводов, агар-агара и других компонентов питательных сред.

Лабораторное помещение содержит оборудование, необходимое для биохимических, гисто- и цитогенетических и других исследований, сопряженных с основными работами по выращиванию растительных клеток, тканей и органов.

Посуда, инструменты и материалы.

Для работы методом культуры изолированных тканей необходимо иметь определенный набор посуды, разнообразие и количество которой зависят от направления и характера решаемых вопросов, а также масштаба проводимых работ. В зависимости от этапов работы используется различная посуда: колбы

мерные на 25, 50, 100, 200, 250, 300, 500, 1000 мл., стаканы химические на 50, 100, 200, 250, 500, 1000, 2000 мл., цилиндры мерные на 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 мл., пробирки градуированные на 5 и 10 мл., пипетки градуированные на 0,5, 1, 2, 5, 10 мл., микропипетки градуированные на 0,1, 0,2 мл., фильтры Зейтца, стеклянные и мембранные фильтры.

Посуда для хранения растворов, питательных сред и бидистиллированной воды: колбы плоскодонные на 200, 250, 300, 500, 1000, 2000 мл., бутылки из темного стекла на 1, 2, 3, 5, 10, 20 л с нижним тубусом и без него., флаконы на 25, 50, 100, 250, 500 мл.

Посуда для пересадки и выращивания изолированных тканей: Чашки Петри, колбы плоскодонные на 50, 100, 200 мл., флаконы или банки на 100, 200, 250, 500 мл., пробирки биологические круглодонные.

Инструменты для изолирования и посадки тканей на питательные среды: ланцеты анатомические, брюшистые, глазные средние и малые, остроконечные, ножницы медицинские общехирургические, пинцеты анатомические размером 15, 20, 25 см, хирургические – 15, 20 см, изогнутые – 9, 15 см, глазные, бритвенные лезвия и держатели для них, иглы металлические и стеклянные, шпатели разных размеров.

Для выращивания культур тканей требуется ряд материалов. Необходимо иметь в большом количестве негигроскопическую вату и марлю, используемых для стерилизации рабочих столов. Для предохранения сред от высыхания и попадания инфекции удобнее всего использовать алюминиевую фольгу. Для заворачивания посуды при стерилизации в автоклаве необходима плотная оберточная, пергаментная, целлофановая бумаги, толстые нитки или шпагат. Для предохранения сред в чашках Петри от высыхания и попадания инфекций используют парафильм. Пробирки с культивируемыми тканями помещают в штативы разных типов и размеров.

### Качество и мойка посуды.

Посуда для работы с культурой ткани изготавливается из жаростойкого и кислотоустойчивого боросиликатного стекла и характеризуется высокой устойчивостью к высоким температурам и механическим повреждениям. Для специальных целей можно использовать пластиковые, предварительно стерилизованные предметы разового пользования (чашки Петри, колбы, пипетки).

Вся посуда, предназначенная для приготовления, хранения питательных сред и выращивания растительного материала, подвергается тщательной мойке.

Самым распространенным и надежным методом очистки стеклянной посуды является обработка ее концентрированной серной кислотой с бихроматом калия в течение 4-6 часов с последующей промывкой в проточной воде и двукратным ополаскиванием дистиллированной водой и однократным – бидистиллятом. Обработку посуды можно проводить эмалированных или полиэтиленовых кюветах, широких толстостенных стеклянных цилиндрах. Для приготовления раствором смеси серной и хромовой кислот используют двуххромовокислый калий или натрий. Так как смесь серной и хромовой кислот обладает высокими коррозионными свойствами, ее можно заменить различными детергентами. При этом следует применять такой детергент, который бы хорошо и быстро отмывался водой и не оказывал токсического действия на рост тканей.

Если после приготовления сред, пересадки тканей, посуда не может быть вымыта сразу, ее необходимо замочить в теплой воде, чтобы избежать высыхания частиц агара на стенках. После мытья посуду высушивают в сушильном шкафу при 100-130°C и хранят в шкафах, защищенных от попадания в них пыли. Если длительное время чистую посуду не используют,

то перед употреблением ее следует ополоснуть бидистиллированной водой. Недостаточно очищенная и вымытая посуда может быть причиной плохого или неравномерного роста содержащихся в ней тканей.

### **3.2. Основные объекты проводимого эксперимента.**

Материалом для исследования служили растения картофеля *in vitro* следующих сортов: Умид, Акроб, (местные сорта) Либератор, Boulder (США, Мичиган).

В экспериментах использовались стерильные растения, полученные методом культивирования изолированных меристем и размноженных микрочеренкованием.

### **3.3. Цель и задачи эксперимента.**

**Цель данной работы** – изучение влияния повышенных концентраций солей и температуры на рост, развития и процесс клубнеобразования у различных сортов картофеля *in vitro*.

Для реализации данной цели были поставлены следующие задачи:

- Получение стерильных растений из апикальной меристемы картофеля.
- Определение влияния различных концентраций NaCl на рост и развития побегов.
- Определение влияния различных концентраций MgSO<sub>4</sub> на рост и развития побегов
- Определение влияния различных концентраций NaCl на процесс клубнеобразования.
- Определение влияния различных концентраций MgSO<sub>4</sub> на процесс клубнеобразования.

- Определение влияния повышенной температуры на процесс клубнеобразования картофеля.

### **3.4. Методика проведения эксперимента.**

#### **Методы работы.**

Любой биотехнологический процесс связан с культивированием изолированных клеток, тканей и органов растений на искусственных питательных средах. Питательные среды имеют в своем составе все компоненты, необходимые для роста и развития живых клеток. Этот состав может быть основой питания и для клеток микроорганизмов, которые находятся в окружающей нас среде. Попадая на искусственные среды, микроорганизмы начинают размножаться, а так как клеточный цикл клеток микроорганизмов, как правило, на порядок короче, чем клеточный цикл растительной клетки (например, клеточный цикл бактерии *E.coli* составляет 20 минут, а самый короткий клеточный цикл растений – 18 часов), то микроорганизмы размножаются в искусственных условиях гораздо быстрее, подавляя рост растительных клеток и тканей. Поэтому обязательным условием при работе с растениями *in vitro* является сохранение условий стерильности, при помощи которых в начале работы необходимо максимально очистить растительный материал от находящихся на нем микроорганизмов, и, дальше, в процессе работе максимально предотвратить доступ микроорганизмов извне к культивируемым объектам и питательным средам.

Итак, любой биотехнологический процесс включает в себя, как обязательные составляющие, исходный растительный материал; питательную среду, на которой растительный материал будет культивироваться; посуду, в

которой этот материал будет культивироваться; инструменты, при помощи которых будут проводиться манипуляции с растительным материалом; помещение, в котором будет проводиться работа; помещение, в котором растительный материал будет культивироваться. Все перечисленные составляющие должны быть обработаны таким образом, чтобы по максимуму обеспечить отсутствие микроорганизмов. Это достигается с помощью методов стерилизации. Методы стерилизации можно подразделить на физические – обработка высокими температурами и различного вида излучениями, и химические – обработка различными химическими стерилизующими агентами.

### **Способы стерилизации.**

Тот или иной способ стерилизации выбирается в зависимости от того что является объектом стерилизации.

#### **1. Стерилизация посуды.**

Вся посуда перед стерилизацией должна быть тщательно вымыта и высушена. Стерилизацию посуды проводят, чаще всего, в сушильном шкафу. Продолжительность стерилизации: при температуре  $150^{\circ}\text{C}$  – 2,5 ч, при  $160^{\circ}\text{C}$  – 2 ч, при  $170^{\circ}\text{C}$  – 1 ч.

#### **2. Стерилизация питательной среды.**

Готовые питательные среды разливают в колбы так, чтобы объем стерилизуемого раствора не превышал  $1/3$  объема посуды, и колбы со средой помещают в автоклав. Так как влажный жар более эффективно убивает микроорганизмы и их споры, то стерилизацию питательных сред проводят в автоклаве под давлением 2 атм. при температуре  $133^{\circ}\text{C}$  в течение 25-30 мин.

#### **3. Стерилизация инструмента.**

Инструменты для биотехнологической работы могут стерилизоваться или в сушильном шкафу, как посуда, или в автоклаве, как питательная среда. При

работе, после каждой манипуляции, инструмент окунается в 96° спирт и обжигается над пламенем газовой горелки или спиртовки.

#### 4. Стерилизация исходного растительного материала.

Основным условием успешного культивирования изолированных клеток, тканей и органов растений в искусственных условиях является стерилизация растительных объектов, которая заключается в убивании грибных и бактериальных спор на внешней поверхности растений без повреждения внутренних тканей. Поверхностные покровы всех органов растений обычно загрязнены спорами различных микроорганизмов. Внутренние ткани здоровых растений считаются стерильными, но в них могут находиться непатогенные бактерии, которые не всегда обнаруживаются. Так как живые ткани растений не могут выдержать стерилизации высокими температурами, то в этих случаях применяют химические стерилизующие агенты. Вид стерилизующего вещества, его концентрация и длительность применения зависят от структуры и чувствительности ткани, которая должна быть простерилизована. Стерилизующее вещество должно максимально очистить ткань от микроорганизмов, при этом минимально повреждая ее. Также важным является соблюдение следующего условия: стерилизующее вещество должно легко удаляться из ткани промыванием дистиллированной водой или быстро разлагаться. Иначе происходит отравление ткани, что сказывается на эффективности ее культивирования.

Прежде чем приступить к стерилизации ткани, ее тщательно промывают. Эффективность действия стерилизующего вещества повышает добавление в раствор незначительного количества поверхностно активных веществ (детергентов). Особенно это заметно при стерилизации плохо смачиваемых опушенных или покрытых воском тканей. В качестве

детергента можно использовать Твин 80 (несколько капель на 1 л) или обычные моющие средства нейтрального характера.

Для поверхностной стерилизации растительных тканей используют большой набор химических веществ. Наиболее часто употребляют соединения, содержащие активный хлор, ртутьсодержащие соединения, перекись водорода, этиловый спирт, реже используют бром, серную кислоту, антибиотики, хлорсодержащие соединения.

Гипохлорит натрия ( $\text{NaClO}$ ) применяется для стерилизации семян и других растительных тканей в виде 0,5-5%-ных растворов в течение 1-20 мин. Гипохлорит натрия является клеточным ядом. Для полного его удаления из тканей сначала материал промывается 0,01 н  $\text{HCl}$ , затем несколькими порциями дистиллированной воды.

Гипохлорит кальция ( $\text{Ca(ClO)}_2$ ) менее токсичен для тканей растений, чем гипохлорит натрия. Широко применяется для стерилизации поверхностей самых различных органов растений в виде 5-70%-ных растворов. После обработки тканей гипохлоритом кальция достаточно промывания в дистиллированной воде.

Хлорамин действует на растительную ткань слабее, чем гипохлориты кальция и натрия. Чаще используется для стерилизации тех органов, которые повреждаются другими стерилизующими агентами. Например, тонкие корни стерилизуются в 0,2%-ном растворе хлорамина. Используемые концентрации – 0,2-10%. Объекты после стерилизации хлорамином нуждаются только в промывке дистиллированной водой.

Все растворы, содержащие активный хлор – гипохлориты натрия, кальция, хлорамин – применяются только для одноразового использования.

### **Ртутьсодержащие стерилизующие вещества.**

Двухлористая ртуть – сулема ( $\text{HgCl}_2$ ) хорошее стерилизующее средство для разнообразных растительных объектов. Это соединение очень токсично и поэтому необходимо правильно подбирать его концентрацию и продолжительность стерилизации. В основном используют 0,01-0,1%-ные растворы. Продолжительность стерилизации в 0,1%-ном растворе сулемы – от 1 до 20 мин в зависимости от структуры поверхностных тканей стерилизуемого объекта.

Используются также этилмеркуритиосалицилат натрия («мертиолат») и этанолмеркурихлорид («диацид»).

После стерилизации в растворах ртутных препаратов ткани необходимо промыть 4-5 раз в дистиллированной воде по 10-15 мин в каждой порции. Растворы ртутных соединений можно использовать 3-4 раза.

Перекись водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) используется в основном для стерилизации семян. Используемые концентрации – 3-30%. Длительность обработки – от 20 мин до 24 ч. После стерилизации перекисью водорода не требуется длительного промывания водой, так как оставшийся в тканях пергидроль не токсичен и быстро разлагается.

Этиловый спирт ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) применяется в концентрации 90-95% для стерилизации плодов и семян, а также для улучшения действия других стерилизующих средств. Растительный материал погружают на несколько секунд в спирт, затем обжигают в пламени горелки или спиртовки (этот прием повторяется несколько раз в зависимости от плотности покровных тканей). В некоторых случаях этиловый спирт используется при обработке хорошо очищенных корнеплодов – 5 мин в 95%-ном растворе – без отмывки в воде.

Бром (Br) в основном используется в виде 1%-го раствора для стерилизации семян. Этот раствор очень токсичен и поэтому его следует применять очень осторожно, причем только на сухих семенах. После стерилизации бромной водой требуется тщательная отмывка объектов дистиллированной водой.

Концентрированная серная кислота ( $H_2SO_4$ ) применяется для стерилизации семян с плотной оболочкой или имеющих опушение. Время обработки – 5-10 мин. Обработка семян кислотой, кроме стерилизующего эффекта, способствует более быстрому их прорастанию в результате улучшения водо- и воздухопроницаемости семенной оболочки.

Антибиотики сравнительно нетоксичны для растительных тканей, но применяются для стерилизации сравнительно редко, так как границы их бактериологической активности очень ограничены. Добавление антибиотиков в питательные среды может использоваться в тех случаях, когда ткани невозможно простерилизовать обычными средствами из-за инфицированности спорами микроорганизмов их внутренних областей. При использовании антибиотиков руководствуются тем правилом, что используют либо несколько антибиотиков, действующие на разные микроорганизмы, либо один, но с широким спектром микробного действия.

### **Стерилизация рабочего помещения.**

Работа с растениями *in vitro* должна проводиться в условиях, исключающих попадание микроорганизмов на растительный материал и питательные среды. В настоящее время стерильность условий работы обеспечивается ламинар-боксами, в которых и проводятся все манипуляции с питательными средами и растительным материалом. Ламинар-бокс представляет собой камеру, закрытую с трех сторон, снабженную устройством для подачи воздуха и двумя типами фильтров. Сначала воздух проходит через фильтры грубой

очистки, где оседают все частицы пыли и другой грязи, находящейся в воздухе. После фильтров грубой очистки воздух попадает на фильтры мелкой очистки, которые задерживают все микроорганизмы, находящиеся в воздухе. Очищенный поток воздуха подается в камеру, где в этом потоке и проводятся все манипуляции с питательными средами и растительными объектами. Дополнительным условием, обеспечивающим стерильность, является то, что вся работа проводится за пламенем газовой горелки или спиртовки. Когда в ламинар-боксе не проводится работа, его внутренняя поверхность подвергается воздействию ультрафиолетового облучения в течение 20-30 мин, непосредственно перед началом работы, после отключения ультрафиолетового облучения, внутренняя поверхность ламинар-бокса обрабатывается спиртом, после чего туда помещаются стерильные посуда и инструменты. Помещение, в котором находится ламинар-бокс, также периодически должно обрабатываться стерилизующими агентами. Периодически необходима обработка ультрафиолетовым облучением. Стены, полы, поверхность лабораторного оборудования и мебели должны обрабатываться растворами хлорамина, иногда, при сильном загрязнении можно использовать раствор формалина. При использовании ультрафиолетового облучения следует учитывать его вредное воздействие на человека. В результате ультрафиолетового облучения в воздухе образуется озон, который является источником свободного кислорода. Поэтому обработку помещения следует проводить только в тот момент, когда в помещении отсутствуют люди. В ламинар-боксах ультрафиолет должен быть отключен за 20 мин до начала работы в нем.

Стерилизация помещения для культивирования растений *in vitro*.

Помещение, в котором культивируются изолированные клетки, ткани и органы растений, представляет собой изолированную комнату с

регулируемой температурой, влажностью и освещенностью – так называемая факторостатная комната. Для предотвращения инфицирования растительного материала, находящегося в этой комнате, ее также следует периодически обрабатывать ультрафиолетовым облучением. Пол, стены, поверхность стеллажей, на которых находится посуда с культивируемыми объектами, должны обрабатываться растворами хлорамина или формалина.

### **Приготовление питательных сред.**

Органы растений, ткани и клетки в большинстве случаев способны расти на среде, содержащей лишь основные питательные вещества, поставляемые сосудистой системой, такие как соли азота и другие необходимые элементы, сахарозу, некоторые аминокислоты, витамины и факторы роста [6]. Однако точный состав питательной среды должен быть подобран в зависимости от потребностей разных групп растений, а некоторые виды и культуры требуют дополнительных добавок для обеспечения достаточно хорошего роста.

Основой всех питательных сред для культивирования изолированных клеток, тканей и органов растений является минеральных солей (макро- и микроэлементов) и, так как питание культивируемых тканей является гетеротрофным, источник углеводов вводится в состав сред в виде сахарозы, глюкозы или других сахаров.

Кроме углерода, кислорода и водорода для роста тканей необходим азот в виде нитратной или аммонийной соли, фосфор – в виде фосфата, сера - в виде сульфата и ионы  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ . Наиболее оптимальный состав макро- и микроэлементов для культивирования изолированных тканей растений содержат среды, разработанные Мурасиге и Скугом, Ничем, Гамборгом и Шенком.

В составе большинства сред азот представлен в виде нитрата и солей аммония. Нитраты как основной источник азота вводятся в среды в концентрациях 2 – 25 мМ. В некоторых случаях концентрацию нитрата и аммиака можно увеличить до 60 мМ [27].

Для роста изолированных тканей необходимым компонентом является фосфор, который используется в основном в виде ортофосфата. Ионы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  и  $\text{SO}_4^{2-}$  нужны для культивирования тканей в меньших концентрациях и привносятся в состав сред с элементами минерального питания. Серу вводят в состав сред чаще всего в виде сульфата или сульфита. Железо чаще всего вводится в виде неорганических солей ( $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ). Так как на усвояемость железа влияют метаболиты, выделяемые культурами тканей и pH среды целесообразно одновременно вводить хелатобразующие соединения, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА). Наличие этого соединения в средах улучшает доступность железа в широких пределах pH [6].

Кроме основных макроэлементов в составе сред должны присутствовать микроэлементы, представляющие собой группу незаменимых минеральных элементов, выполняющих важные функции в жизнедеятельности растительных организмов. Микроэлементы, такие как Mn, Mo, Co, Cu, Zn, принимают участие в окислительно-восстановительных процессах, азотном и углеводном обмене, входят в состав активных центров ферментов и витаминов. Наиболее оптимальное содержание микроэлементов в смеси, рекомендуемой Мурасиге и Скугом.

Источником углерода и энергии в большинстве сред, используемых для культур растительных тканей, являются сахароза и глюкоза обычно в концентрациях 20-40 г/л.

Для роста и дифференцировки любых растительных клеток необходимы гормоны – ауксины и цитокинины. Поскольку различные клетки и ткани в культуре резко отличаются по способности к автономному синтезу и метаболизму отдельных групп фитогормонов, то в связи с этим их рост в различной степени зависит от снабжения экзогенными регуляторами роста. Для роста большинства тканей в условиях *in vitro* в среде необходимы цитокинины и ауксины. В качестве ауксинов чаще всего используются индолилуксусная кислота (ИУК) в концентрациях 1 – 30 мг/л, нафтилуксусная кислота (НУК) – 0,1 – 2 мг/л, 2,4-дихлорфеноксисукусная кислота (2,4-Д) в концентрациях менее 1 мг/л. К числу наиболее используемых цитокининов относится кинетин (6-фурфуроиламинопурин). Установлено, что он не только активизирует клеточные деления, но и является обязательным компонентом сред при индуцировании органогенеза [17]. Кинетин вводится в состав сред в дозах 0,001 – 10 мг/л. Некоторые другие адениновые производные могут быть более активны. 6-Бензиламинопурин (БАП), зеатин – 6-(4-окси-3-метилбут-2-енил)-аминопурин проявляют более высокую активность в поддержании роста тканей и индуцировании органогенеза. 6-( $\beta$ -диметилаллиламино)-пурин в 100 раз более активен, чем кинетин, а кроме того может быть использован в более широких пределах концентраций [19]. Гибберелловая кислота также может использоваться для стимуляции роста тканей [18].

В состав большинства сред для культивирования клеток и тканей входят витамины. Для многих культур тканей в состав сред вводятся такие витамины, как тиамин, никотиновая кислота, пиридоксин, мезо-инозит. Реже для этой цели применяют Са-пантотенат и холинхлорид. Подавляющее большинство вводимых в состав питательной среды витаминов, как известно, входят в состав ферментов, катализирующих различные важные реакции.

Для приготовления твердых питательных сред в качестве уплотняющего вещества чаще всего используют агар-агар. Это полисахарид, получаемый из морских водорослей и изготовляемый в виде пластин, зерен или желтовато-белого порошка. Агар-агар образует с водой гель, плавящийся при 100° и затвердевающий при 45°. Он теряет способность образовывать гель в кислой среде, в частности при использовании длительно хранившейся бидистиллированной воды, адсорбировавшей из воздуха CO<sub>2</sub>.

Известно, что в нативных условиях растительная клетка функционирует в узких пределах колебаний концентрации ионов водорода. Относительная стабильность величины рН во внутриклеточной и окружающей клетку среде поддерживается буферными системами, в которых важнейшую роль выполняют белковые молекулы как амфолиты. Эти особенности следует учитывать и при выращивании клеток тканей *in vitro*, так как в состав питательных сред входят ряд сложных или активных компонентов, метаболизация и функционирование которых зависит от степени протонизации внутри клетки и в окружающей среде. Поэтому относительную стабилизацию рН среды необходимо поддерживать введением в нее хелатированных соединений или соответствующих буферов. От величины рН зависит структура и активность биологических макромолекул, прежде всего белков, особенно белков-ферментов. Устойчивость и усвояемость целого ряда компонентов питательной среды зависит от величины рН. Наиболее чувствительны к рН такие компоненты среды, как ИУК, гиббереллин, витамины. При низких величинах рН не происходит полимеризации агар-агара. От рН среды зависит доступность для тканей различных соединений железа. Большинство культур изолированных тканей растет на средах с рН 5,5 – 5,8 [2]. Обычно рН готовой среды устанавливают с помощью 10%-го

или 1н раствора КОН или NaOH или 1н HCl перед стерилизацией. Однако следует учитывать, что во время автоклавирования рН среды может меняться.

При приготовлении питательных сред и выращивании на них тех или иных объектов необходимо учитывать влияние некоторых физических факторов. Так, при культивировании суспензии клеток или культуры корней важное значение имеют условия аэрации.

Известно, что в нативных условиях большое значение имеет осмотическое давление в клетке. При этом на определенном этапе развития отдельные клетки и ткани характеризуются определенным градиентом осмотического давления. Это условие и требование сохраняется и при культивировании в искусственных условиях. Однако следует учитывать, за счет каких веществ поддерживается осмотическое давление, так как оно может поддерживаться за счет элементов питания и других соединений.

Значительное влияние на рост тканей в условиях *in vitro* оказывает температурный фактор. Это объясняется тем, что клетки или ткани изолированы от материнского организма. Поэтому температурный фактор оказывает непосредственное влияние на ряд процессов и особенно на активность ферментов, некоторые из которых необходимы для метаболизации источников питания. Для большинства культивируемых тканей температурный оптимум составляет 24-28°C.

Условия освещения не являются безразличными и оказывают влияние на рост изолированных клеток, тканей и органов, хотя они и не обладают автотрофным типом питания. Это объясняется, по-видимому, тем, что в данном случае действие света обусловлено не изменением процесса фотосинтеза, а присутствием низкоэнергетической и высокоэнергетической фитохромных систем, которые воспринимают энергию квантов этих длин

волн и изменяют считывание и реализацию генетической информации и оказывают влияние на митотическую активность и рост клеток.

Успех в культивировании культур клеток, тканей и органов растений определяется в значительной степени составом питательной среды. К настоящему времени разработано множество составов питательных сред, большинство из них являются модификациями основных сред (Уайта, Эллера, Мурасиге и Скуга и др.), приспособленными к частным случаям культивирования тканей и органов.

Для культивирования изолированных меристем картофеля существуют разработанные среды. Практически во всех рекомендуемых для этой цели средах основу составляют макро- и микроэлементы по Мурасиге и Скугу. Рекомендуемые составы различаются по соотношению регуляторов роста. Рекомендуемая нами среда для культивирования апикальных меристем с целью их регенерации отличается также соотношением физиологически активных веществ, по нашим данным рекомендуемый состав позволяет повысить частоту регенерации растений из апикальных меристем картофеля

### **Подготовка клубней к вычленению меристем.**

Важнейшим условием получения высоких урожаев картофеля является отбор семенных клубней по величине, форме и другим признакам. Крупные клубни с большим запасом питательных веществ дают дружные и более полные всходы, чем клубни меньшего размера. Из крупных клубней вырастают более мощные, многостебельные и высокоурожайные растения, менее подверженные заболеваниям и вырождению [3]. Большое влияние на семенные качества и урожайность картофеля оказывает отбор семенных клубней по форме, окраске и толщине ростков. Использование для посадки удлиненных, уродливых, бледно окрашенных или трещиноватых, а также с выпуклыми глазками и прорастающих тонкими нитевидными ростками

клубней приводит к увеличению числа растений с признаками вырождения, положительной реакцией на вирусы и резкому снижению урожайности. Прослежена зависимость между формой клубней и наличием вирусных инфекций. Одним из признаков вырождения картофеля служит побледнение окраски красно- и розово окрашенных сортов, которое происходит в результате влияния высоких температур в период клубнеобразования. Резко снижает урожайность картофеля трещиноватость клубней. Сильно падает урожайность при посадке клубней, прорастающими тонкими нитевидными ростками. Тщательным отбором посадочных клубней можно также улучшать и оздоравливать вырожденный картофель.

Таким образом, отбор семенных клубней по внешним признакам имеет большое значение.

#### **Термообработка клубней и получение этиолированных проростков.**

Известно, что повышенные температуры подавляют некоторые вирусы различных культур. При действии высоких температур (выше 40°C) достигается полное оздоровление семенного картофеля, больного скручиванием листьев [4]. Ингибирующее действие на некоторые вирусы могут оказывать соли некоторых металлов и органические кислоты [5], а также пурины и пуриновые основания [39]. Однако следует учитывать, что многие вещества, инактивирующие вирусы, токсичны также и для растительных клеток.

Поэтому для снижения инфицированности материнские клубни без признаков формирования проростков перед изоляцией верхушечной меристематической ткани подвергают тепловой температурной обработке – от 6 до 12 недель при температуре 35-42°C. Перед помещением в термостат клубни должны быть тщательно вымыты и, желательно, обработаны стерилизующими средствами типа раствора диацета или тимеросала в

течение 20-30 мин для предотвращения роста поверхностных инфекций бактериального и грибного характера.

Обработку следует проводить в термостатируемом шкафу, причем обрабатываемые клубни необходимо все время проветривать.

После термообработки клубни помещают в темное помещение с влажным воздухом и температурой не ниже 22° для проращивания. В этот период клубни следует тщательно проветривать для предотвращения развития инфекций. Начало прорастания клубней зависит от скороспелости сорта. Скороспелые сорта обычно прорастают в течение 20-25 дней, а среднеспелые – 35-40 дней [4]. Ростки должны быть длиной не менее 10-15 см.

### **Стерилизация исходного материала.**

Перед вычленением меристем, верхушки побегов стерилизуют для удаления грибных и бактериальных инфекций, находящихся на поверхности тканей. Рекомендуемый способ можно разделить на следующие этапы.

1. Обработка проростков 0,01% раствором темирисала в течение 30-40 мин.

2. Отмывка от темирисала в 50% растворе этилового спирта в течение 3-5 мин.

3. Отмывка от спирта в стерильной воде, воду менять 5-8 раз.

4. Подсушивание прошедших стерилизацию проростков на стерильной фильтровальной бумаге.

Для вычленения меристемы используется бинокулярный микроскоп с увеличением 20-40 раз. Вычленение меристем следует проводить в условиях ламинар-бокса. Инструменты для вычленения меристем: препаровальные иглы, скальпели, пинцеты стерилизуются обжигом в спирте. Микроскоп тщательно протирается спиртом. Придерживая верхушку побега пинцетом га

столике микроскопа, другой рукой берут иглу и легким надавливанием отделяют прилегающие к меристеме листья и листовые примордии. Собственно меристему или меристему с одним или двумя листовыми примордиями отделяют скальпелем и переносят в пробирку или чашку Петри на среду для регенерации меристем.

Для регенерации меристем использовали питательные среды следующего состава: агар-агар – 0,7%, соли по Мурасиге и Скугу, сахароза – 4%, витамины В5 по Гамборгу, регуляторы роста – кинетин – 0,1 мг/л, аденин – 40 мг/л, гиббереллин – 50 мг/л.

Для культивирования микрочеренков использовали среды того же состава, что и для регенерации меристем, но без гиббереллина.

Для определения влияния на рост и развитие побегов солей в среды для культивирования микрочеренков добавляли различные концентрации NaCl и NaSO<sub>4</sub>.

Культивирование эксплантов проводили в условиях факторостатной комнаты, при 16-часовом фотопериоде, освещенности 4000 Лк.

#### 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для успешного проведения фундаментально-прикладных исследований и селекционных работ в области растениеводства необходимо иметь исходный материал, который может быть сосредоточен в виде коллекций. В настоящее время существует несколько больших коллекций картофеля: национальная коллекция картофеля (СРС) Шотландского научно-исследовательского института по сельскому хозяйству в Пентландфилде, коллекция Межрегионального проекта по картофелю Висконсин, США, всемирная коллекция зародышевой плазмы Международного центра по картофелю (СІР) в Лиме Перу, аргентинская коллекция картофеля Национального института технологии сельского хозяйства, Чилийский генобанк картофеля в Вальдивии и Голландско - немецкое отделение генобанка картофеля в Брауншвейге, ФРГ,

Некоторые генобанки 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.

В настоящее время наиболее экономически оправданным является получение семенного материала картофеля на основе метода культивирования изолированных апикальных меристем. Размножение

картофеля традиционными способами не представляет трудностей, но эта культура в большой степени подвержена вирусным заболеваниям. Обычно для производства элитных семян необходимо шесть лет размножения в полевых условиях начиная от черенков, проверенных на инфицированность. За это время неизбежно происходит повторное заражение, даже в условиях с малочисленной популяцией тлей. При культивировании *in vitro*, во-первых, исключается возможность повторного заражения, во-вторых, в течение несколько месяцев можно получить то же число отводков, которое в поле получают, по крайней мере, за 5-6 лет.

Биотехнологические коллекции, содержащие большое количество генотипов растений, имеют большое практическое значение как источник материала для фундаментальных исследований и для первичного семеноводства. Подобные коллекции позволяют быстро осуществлять сортосмену сельскохозяйственных растений в зависимости от потребностей производства. Растительный материал в подобных коллекциях содержится на протяжении многих лет. Как известно, в течение длительного культивирования *in vitro* под влиянием экзогенных факторов растения могут не только претерпевать физиологические изменения, но и менять свой генотип. Поэтому актуальным является разработка таких условий содержания растительного материала в биотехнологических коллекциях, которые позволят содержать растения в них без изменения специфических, присущих данному генотипу, признаков.

Растительный материал может быть введен в коллекцию *in vitro* различными с помощью различных методов [13]. Первыми сортами картофеля, положившими начало созданию коллекции *in vitro* стали сорта Невский, Диамант, Акроб, Умид, Туйимли.

Одним из способов, позволяющих вводить растительный материал в коллекцию, является культивирование изолированных меристем.

Несмотря на то, что метод культивирования изолированных апикальных меристем картофеля уже давно находит широкое применение в сельскохозяйственном производстве, по отношению к определенным генотипам необходима оптимизация условий культивирования с целью сделать наиболее эффективным процесс регенерации.

Первым этапом работы при получении культуры изолированных меристем является отбор клубней и подготовка их к прорастанию и вычленению меристем.

Важнейшим условием для получения здоровых проростков является отбор семенных клубней по величине, форме и другим признакам. Крупные клубни с большим запасом питательных веществ дают дружные и более полные всходы, чем клубни меньшего размера. Из крупных клубней вырастают более мощные, многостебельные и высокоурожайные растения, менее подверженные заболеваниям и вырождению. Большое влияние на семенные качества и урожайность картофеля оказывает отбор семенных клубней по форме, окраске и толщине ростков. Использование для посадки удлинённых, уродливых, бледно окрашенных или трещиноватых, а также с выпуклыми глазками и прорастающих тонкими нитевидными ростками клубней приводит к увеличению числа растений с признаками вырождения, положительной реакцией на вирусы и резкому снижению урожайности. Прослежена зависимость между формой клубней и наличием вирусных инфекций. Одним из признаков вырождения картофеля служит побледнение окраски красно- и розово окрашенных сортов, которое происходит в результате влияния высоких температур в период клубнеобразования. Резко снижает урожайность картофеля трещиноватость клубней. Сильно падает

урожайность при посадке клубней, прорастающими тонкими нитевидными ростками. Тщательным отбором посадочных клубней можно также улучшать и оздоравливать вырожденный картофель.

Для работы были отобраны клубни сортов Умид, Акроб, Невский, Диамант, отличающиеся отсутствием повреждений, имеющие характерную сортовую окраску.

Так как в нашу задачу входило получение как можно более свободного от вирусных инфекций исходного материала, то клубни подвергли термотерапии.

Известно, что повышенные температуры подавляют некоторые вирусы различных культур. При действии высоких температур (выше 40°C) достигается полное оздоровление семенного картофеля, больного скручиванием листьев. Поэтому для снижения инфицированности материнские клубни без признаков формирования проростков перед изоляцией верхушечной меристематической ткани подвергали тепловой температурной обработке – от 6 до 12 недель при температуре 35-42°C. Перед помещением в термостат клубни должны были тщательно вымыты и обработаны стерилизующими средствами типа раствора диацида или тимеросала в течение 20-30 мин для предотвращения роста поверхностных инфекций бактериального и грибного характера.

Обработку проводили в термостатируемом шкафу, причем обрабатываемые клубни все время проветривали.

После термообработки клубни помещали в темное помещение с влажным воздухом и температурой не ниже 22° для проращивания. В этот период клубни тщательно проветривали для предотвращения развития инфекций. Начало прорастания клубней зависило от скороспелости сорта. Так, сорта Умид, Либератор прорастали в течение 20-25 дней, а Акроб и

Болдер – 35-40 дней. Ростки длиной не менее 10-15 см использовали для вычленения меристем

Перед вычленением меристем, верхушки побегов стерилизовали для удаления грибных и бактериальных инфекций, находящихся на поверхности тканей. Стерилизацию проводили поэтапно.

- 1.Обрабатывали проростки 0,01% раствором темирисала в течение 30-40 мин.
- 2.Отмывали от темирисала в 50% растворе этилового спирта в течение 3-5 мин.
- 3.Отмывали от спирта в стерильной воде, воду меняли 5-8 раз.
- 4.Подсушивали прошедших стерилизацию проростки на стерильной фильтровальной бумаге.

Для вычленения меристемы использовали бинокулярный микроскоп с увеличением 20-40 раз. Вычленение меристем проводили в условиях ламинар-бокса. Собственно меристему или меристему с одним или двумя листовыми примордиями отделяли скальпелем и переносили в чашку Петри на среду для регенерации меристем.

Полученные растения – регенеранты тестировали на отсутствие вирусных инфекций. Для диагностики вирусов в процессе семеноводства используют различные методы: визуальную оценку индексированных растений в зимнее время; инокуляцию соком растений – индикаторов; широкое применение находили микроскопический анализ ситовидных трубок на наличие избытка каллозы (зараженность ВСЛК) и стандартные серологические тесты (зараженность всеми вирусами, кроме ВСЛК и вириода веретеновидности клубней, ВВКК). Анализ проводили с помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA).

Для определения наличия вирусов на полистирольные плиты с мелкими лунками наслаивают вирусспецифические антитела. После чего антитела

взаимодействовали с вирусными частицами из осветленного сока растений, образуя фиксированный комплекс, на который наносили раствор меченных ферментом антител, которые реагировали с антигенами. Фермент вступал в реакцию с добавляемым субстратом, при этом выделялось красящее вещество. По интенсивности окраски определяли содержание вирусов картофеля А, М, S, X, Y, ВПТ и ВСЛК в регенерированных растениях.

Отобранные растения, без признаков вирусных инфекций, размножали методом микрочеренкования.

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.

Как уже говорилось, наиболее экономически оправданным является получение семенного материала картофеля на основе метода культивирования изолированных апикальных меристем и микроклонального размножения. Обычно для производства элитных семян необходимо шесть лет размножения в полевых условиях начиная от черенков, проверенных на инфицированность. За это время неизбежно происходит повторное заражение, даже в условиях с малочисленной популяцией тлей. При размножении *in vitro*, во-первых, исключается возможность повторного заражения, во-вторых, за несколько месяцев можно получить то же число отводков, которое в поле получают по крайней мере за 5-6 лет.

В основе размножения растений микрочеренкованием *in vitro* лежит способность латеральных почек к образованию побегов. Этот способ размножения *in vitro* считается наименее генотипзависимым.

#### 4.1. Влияние NaCl на рост и развитие побегов картофеля

Именно благодаря тому, что биотехнология картофеля достаточно хорошо разработана, нам представляется актуальной разработка на основе методов культивирования изолированных тканей способа оценки различных генотипов картофеля на устойчивость к такому абиотическому стресс-фактору, как засоление почвы и повышенной температуры.

В связи с этим, целью настоящей работы являлось определение влияния различных концентраций NaCl на темпы роста побегов различных сортов картофеля, их развитие и укоренение в условиях *in vitro*.

Материалом для экспериментов служили сорта картофеля Liberator (Л) Bolder (Б), Умид (Т), Акроб (А).

Для получения исходного материала для экспериментов сначала были получены регенеранты из изолированных апикальных меристем указанных сортов картофеля.



Рисунок 1. Получения стерильных растений картофеля

Культура изолированных меристем получила широкое распространение для решения таких практических вопросов, как освобождение растений от вирусов и для размножения растений. В обобщающих работах по культивированию изолированных меристем основное внимание уделяется вопросу освобождения растений от вирусных инфекций [34],[37]. Метод получения свободных от вирусов растений из меристем основывается на наблюдении Корнуэ [32] того явления, что содержание вирусов в больном растении снижается по направлению к верхушке растения, а собственно меристема может быть совершенно свободна от вирусной инфекции. Метод культуры меристем *in vitro* разрабатывался применительно к этой задаче.

Меристемой обычно называют ткань верхушки побега размером от 0,1 мм до 1 см. Собственно апикальную меристему – конус активно делящихся клеток высотой 0,1 мм и шириной 0,25 мм трудно отделить без повреждения и индуцировать к росту. В связи с этим часто отделяют собственно меристему и один или два листовых примордия.

Растения из меристем были получены на средах, содержащих аденин и кинетин в течение 2-х месяцев. Полученные регенеранты были затем размножены методом микрочеренкования. (рис.1)

В контрольном варианте для регенерации побегов из микрочеренков использовали среды с минеральной основой по Мурасиге и Скугу, витаминами В5 по Гамборгу, 4-х % сахарозой, регуляторами роста – аденин 10 мг/л, кинетин – 0,1 мг/л, экспланты культивировались в условиях факторостатной комнаты(5). Для определения влияния соли использовали следующие концентрации Na Cl – 50, 100, 150, 200 мМ (6). Всего использовали по 50 эксплантов на каждый вариант эксперимента в трех повторах.

Результаты эксперимента представлены в таблице 1 и 2.

Таблица 1.

## Влияние NaCl на рост и развитие побегов

NaCl (мМ)	Сорт	Сроки культивирования (дн)											
		5		10		15		20		25		30	
		Высота побега (мм)	Кол-во	Высота побега (мм)	Кол-во междоузлий								
К	Л	5,0	0	14,0	2	32,0	2,5	63,0	4,0	80,0	5,0	100,0	5,0
	Б	4,6	0	13,0	2	29,0	2,5	61,0	4,0	75,0	5,0	95,0	5,0
	У	4,0	0	13,0	2	30,0	2,5	54,0	4,0	76,0	5,0	81,0	5,0
	А	4,4	0	11,0	1	20,0	2,0	48,0	3,0	58,0	4,0	75,0	4,0
50	Л	5,0	0	6,0	0	24,0	2,0	43,0	3,0	62,0	3,0	70,0	4,0
	Б	0	0	2,2	0	14,0	1,5	21,0	2,0	33,0	2,0	35,0	2,0
	У	0	0	5,0	0	23,0	1,8	42,0	3,0	60,0	3,0	61,5	3,0
	А	0	0	2,0	0	9,0	1,4	14,0	2,0	25,0	2,0	27,0	2,0
100	Л	2,0	0	4,0	0	14,0	1,0	23,0	2,0	35,0	2,5	32,0	3,0
	Б	0	0	2,0	0	10,0	1,0	10,0	1,0	11,0	1,0	11,0	1,0
	У	1	0	1,8	0	11,0	1,0	14,0	2,0	15,0	2,0	15,0	2,0
	А	0	0	0	0	0,4	1,0	1,8	1,0	4,5	1,0	4,7	1,0
150	Л	0	0	1,0	0	1,0	1,0	1,20	1,0	1,20	1,0	1,20	1,0
	Б	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	У	0	0	0	0	0,6	2,0	2,0	2,0	2,5	3,0	2,0	3,0
	А	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	Л	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Б	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	У	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	А	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

К – контроль, Л- Liberator, Б- Bolder, У-Умид, А-Акроб

Как показано в таблице, NaCl оказывает сильное влияние на рост и развитие побега при культивировании микрочеренков. По сравнению с контролем уже при 50 мМ-й концентрации соли начинается торможение роста. Увеличение концентрации до 100 мМ приводит к сильному угнетению роста побегов. Причем, на примере четырех двух сортов было показано, что при культивировании *in vitro* проявляется четкая генотипическая зависимость

устойчивости к соли. Так, концентрация в 100 мМ для сорта Волдер и Акроб оказалась неприемлимой, тогда как у сорта Либератор и Умид продолжался рост побегов и образование междоузлий (Рис.1).



Рисунок 2. Культивирования растений картофеля в фитотроне

Также было показано, что сорта по-разному реагируют на концентрации солей по признаку корнеобразования. Так, если в контроле, уже на 10-й день культивирования растения имели хорошо развитую корневую систему, то при 50 мМ концентрации соли процесс корнеобразования подавлялся. К концу культивирования интенсивность корнеобразования у контрольных растений и растений на 50мМ соли почти не отличалась для сорта Либератор и Умид, а у сорта Болдер и Акроб корневая система была развита значительно хуже. При концентрации соли 100 мМ у сорта Либератор корнеобразование шло, но отличалось замедленными темпами, у сорта Болдер, Умид и Акроб корнеобразование практически отсутствовало.

#### 4.2. Влияние MgSO<sub>4</sub> на рост и развитие побегов картофеля.

В следующей части эксперимента изучалось влияние на рост и развитие побегов картофеля повышенных концентраций MgSO<sub>4</sub>. Результаты данного эксперимента представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Влияние MgSO<sub>4</sub> на рост и развитие побегов картофеля

MgSO <sub>4</sub> (мМ)	Сорт	Сроки культивирования (дн)											
		5		10		15		20		25		30	
		Высота побега (мм)	Кол-во междоузлий	Высота побега (мм)	Кол-во	Высота побега (мм)	Кол-во междоузлий						
К	Л	4,7	0	13,0	2	31,0	2,5	62,0	4,0	78,0	5,0	96,0	5,0
	Б	4,65	0	12,0	2	28,0	2,5	60,0	4,0	73,0	5,0	93,0	5,0
	У	3,8	0	12,0	2	28,0	2,5	53,0	4,0	75,0	5,0	80,0	5,0
	А	4,3	0	10,0	1	19,0	2,0	47,0	3,0	58,0	4,0	74,0	4,0
50	Л	4,9	0	6,8	0	24,0	2,0	42,0	3,0	61,0	3,0	70,0	4,0
	Б	0	0	2,1	0	13,0	1,5	20,0	2,0	33,0	2,0	35,0	2,0
	У	0	0	5,0	0	22,0	1,8	41,0	3,0	58,0	3,0	61,0	3,0
	А	0	0	2,0	0	8,0	1,4	3,0	2,0	25,0	2,0	25,0	2,0
100	Л	2,0	0	2,8	0	13,0	1,0	22,0	2,0	31,0	2,5	32,0	3,0
	Б	0	0	2,0	0	10,0	1,0	10,0	1,0	11,0	1,0	10,0	1,0
	У	1	0	1,8	0	11,0	1,0	13,0	2,0	15,0	2,0	14,0	2,0
	А	0	0	0	0	7,5	1,0	3,0	1,0	4,5	1,0	4,7	1,0
150	Л	0	0	1,0	0	1,0	1,0	11,0	1,0	12,0	1,0	12,0	1,0
	Б	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	У	0	0	0	0	0,6	2,0	1,0	2,0	2,5	3,0	2,5	3,0
	А	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	Л	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Б	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	У	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	А	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

К – контроль, Л-Либератор, Б- Волдер, У-Умид, А-Акроб

Как показано в таблице,  $Mg_2O_4$  оказывает сильное влияние на рост и развитие побега при культивировании микрочеренков (рис.3). По сравнению с контролем уже при 50 мМ-й концентрации соли начинается торможение роста. Увеличение концентрации до 100 мМ приводит к сильному угнетению роста побегов. Причем, на примере двух сортов было показано, что, как и в эксперименте с NaCl при культивировании *in vitro* проявляется четкая генотипическая зависимость устойчивости к соли. Так, концентрация в 100 мМ для сорта Волдер и Акроб оказалась неприемлимой, тогда как у сорта Либератор и Умид продолжался рост побегов и образование междоузлий.

Также было показано, что сорта по-разному реагируют на концентрации солей по признаку корнеобразования. Так, если в контроле, уже на 10-й день культивирования растения имели хорошо развитую корневую систему, то при 50 мМ концентрации соли процесс корнеобразования подавлялся. К концу культивирования интенсивность корнеобразования у контрольных растений и растений на 50мМ соли почти не отличалась для сорта Либератор и Умид, а у сорта Болдер и Акроб корневая система была развита значительно хуже. При концентрации соли 100 мМ у сорта Либератор и Умид корнеобразование шло, но отличалось замедленными темпами, у сорта Болдер и Акроб корнеобразование практически отсутствовало.

Особо следует отметить, что формирование побегов в присутствии  $MgSO_4$  сопровождалось изменением окраски листьев и стебля у некоторых растений. Приблизительно 50% формирующихся побегов приобретали ярко выраженную антоциановую окраску (Рис.4). Также следует подчеркнуть, что для обоих сортов присутствие в среде даже минимальной концентрации  $MgSO_4$  оказалось более неблагоприятным для роста и развития побегов.



Рис. 3. Формирование побегов картофеля сорта Умид в присутствии  $MgSO_4$ .

1. Контроль,
2. рост микрочеренков в присутствии 50 мМ  $MgSO_4$ .
3. рост микрочеренков в присутствии 100 мМ  $MgSO_4$
4. рост микрочеренков в присутствии 150 мМ  $MgSO_4$

Для определения реакции различных эксплантов на повышенное содержание солей, было показано, что как латеральные почки, так и апикальные одинаково реагируют на высокие концентрации хлорида и сульфата.

#### **4.3. Влияние повышенных концентраций солей на процесс клубнеобразования регенератов *in vitro***

Для определения влияния повышенных концентраций солей на процесс клубнеобразования, растения черенковали, микрочеренки высаживали на среды, содержащие различные концентрации солей. Микрочеренки в течение

10 дней культивировали на свету, после чего ставили в темноту для индукции процесса клубнеобразования.

В результате данного эксперимента было показано, что у растений, способных к росту в присутствии высоких концентраций солей, процесс клубнеобразования проходит практически также, как и в контроле. Начало процесса клубнеобразования, его интенсивность, количество образующихся клубней на растение, практически, не отличаются от контроля.

Данные по влиянию повышенной концентрации NaCl клубнеобразования картофеля таблице 3.

Таблица 3

Влияние NaCl на клубнеобразования картофеля

NaCl (мМ)	Сорта	Количество клубней на 10 растений				
		Продолжительность культивирования в днях				
		10 дней	20 дней	30 дней	40 дней	50 дней
К	Либератор	-	6	12	13	14
	Болдер	-	4	8	10	11
	Умид	-	1	4	8	10
	Акроб	-	-	3	5	7
50	Либератор	-	4	7	9	10
	Болдер	-	2	5	7	8
	Умид	-	-	2	4	5
	Акроб	-	-	-	-	-
100	Либератор	-	-	-	-	-
	Болдер	-	-	-	-	-
	Умид	-	-	-	-	-
	Акроб	-	-	-	-	-

В результате данного эксперимента было показано, что регенеранты, полученные из сегментов листовой пластинки практически не отличаются по таким признакам, как начало процесса клубнеобразования, его интенсивность,

количество клубней на одно растение, от растений, полученных методом микрочеренкования.

Влияние  $MgSO_4$  на клубнеобразования картофеля

Таблица 4

$MgSO_4$ (мМ)	Сорта	Количество клубней на 10 растений				
		Продолжительность культивирования в днях				
		10 дней	20 дней	30 дней	40 дней	50 дней
К	Либератор					
	Болдер	-	4	8	10	11
	Умид	-	1	4	8	10
	Акроб	-	-	3	5	7
50	Либератор	-	3	6	8	9
	Болдер	-	1	4	7	7
	Умид	-	-	1	3	5
	Акроб	-	-	-	-	-
100	Либератор	-	-	-	-	-
	Болдер	-	-	-	-	-
	Умид	-	-	-	-	-
	Акроб	-	-	-	-	-



Рис.5 in vitro клубнеобразование микрочеренков  
1.Либератор, 2. Умид, 3. Болдер. 4.Акроб

#### 4.4. Влияние повышенной температуры на клубнеобразования регенератов

Клубнеобразование — сложный процесс, включающий образование столонов, индукцию и образование клубней, их дальнейший рост и созревание. Столоны являются латеральными побегами, сформированными базальными почками под поверхностью почвы. Почки, формирующие столоны, закладываются на втором этапе органогенеза монокарпического побега [10]. На этом этапе онтогенеза в результате реализации морфогенетической информации определяются два типа морфоструктур: специализированные побеги вегетативного размножения (столоны) и дублирующие структуры (побеги надземной части).

Влияние повышенной температуры на клубнеобразования картофеля

Таблица 5

Температура	Сорт	Количество клубней на 10 растений				
		Продолжительность культивирования в днях				
		10 дней	20 дней	30 дней	40 дней	50 дней
К-28 <sup>0</sup> С	Либератор	-	6	12	13	14
	Болдер	-	4	8	10	11
	Умид	-	1	4	8	10
	Акроб	-	-	3	5	7
30 <sup>0</sup> С	Либератор	-	4	7	9	10
	Болдер	-	2	5	7	8
	Умид	-	-	2	4	5
	Акроб	-	-	-	-	-
32 <sup>0</sup> С	Либератор	-	-	-	-	-
	Болдер	-	-	-	-	-
	Умид	-	-	-	-	-
	Акроб	-	-	-	-	-

Таким образом, в результате работы было показано, что при *in vitro* культивировании микрочеренков картофеля Либратор, Болдер и Умид при 30С температуры в сравнении с контролем происходит уменьшение клубнеобразований. У сорта Акроб происходит резкое торможение процесса клубнеобразования.

Также, следует особо подчеркнуть, что генотипы по-разному реагируют на содержание соли в среде. Поэтому, очевидна возможность создания тест-системы на толерантность различных генотипов картофеля к засолению на основе культивирования эксплантов *in vitro*.

В настоящее время в биотехнологической коллекции картофеля лаборатории «Биотехнологии рамтений УзМУ» наличии эффективную тест-систему на устойчивость к абиотическим стресс-факторам возможно из числа генотипов коллекции отобрать сорта и линии, которые будут урожайны в условиях засоления почвы.

## ВЫВОДЫ И РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Наличие в средах для культивирования минимальных концентраций NaCl и MgSO<sub>4</sub> приводит к замедлению роста и развития побегов.
2. Предельно допустимой концентрацией NaCl, при которой происходит торможение роста, но экспланты не некротируют, является 150мМ.
3. Предельно допустимой концентрацией MgSO<sub>4</sub>, при которой происходит торможение роста, но экспланты не некротируют, является 100мМ.
4. При культивировании микрочеренков картофеля в присутствии различных концентраций солей проявляется четкая генотипспецифическая реакция. Так, у сортов Либратор и Умид рост и развитие побегов продолжались и при концентрации NaCl 150 мМ, тогда как для сортов Болдер и Акроб эта концентрация оказалась летальной.
5. В сравнении с контролем при 30С температуры у сортов Либратор, Болдер и Умид интенсивность клубнеобразования резко уменьшилась, у сорта Акроб клубни вообще необразовались.
6. Интенсивность процесса клубнеобразования в присутствии высоких концентраций солей имеет генотипическую зависимость, так, чем устойчивее генотип к солям, тем интенсивнее клубнеобразование

В результате проведенных экспериментов, можно сделать следующую рекомендацию. Для отбора растений картофеля, проявляющих в условиях *in vitro* устойчивость по отношению к высоким концентрациям солей, достаточно использовать соли в концентрациях не превышающих 100 мМ.

### Список используемой литературы:

1. Артикова Р.М. Муродова С.С. Қишлоқ хўжалик биотехнологияси – Тошкент “Фан ва технология”-2010й
2. Бутенко Р.Г. Рост и дифференциация в культуре клеток растений // Рост растений и природные регуляторы – М.: Наука, 1977.
3. Бутенко Р.Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений. М., Наука, 1975, 50 с.
4. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учеб. пособие – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999.
5. Гамбург К.З., Рекославская Н.И., Швецов С.Г. Ауксины в культурах тка-ней и клеток растений – Новосибирск: Наука, 1990.
6. Картофелеводство Узбекистана, издание ТашГАУ, Министерство Сельского и Водного Хозяйства Республики Узбекистан, Ташкент –2004г.
- 7.Т.Н. Константинова, Н.П.Аксенова и др. Действие ауксина (ИУК) и цитокинина (кинетина) на клубнеобразование картофеля в культуре *in vitro*. ДАН РАН, 1999, т.369, N5, с. 708-711.,
- 8.ООН: Узбекистан - Общая оценка страны, 2003 г.
- 9.Состояние орошаемых земель в Узбекистане, а также предложения и рекомендации по их эффективному использованию.// Государственный комитет РУз по землепользованию, Ташкент – 2001г.
- 10.4. Строгонов Б. П. Физиологические основы солеустойчивости растений. М.: Наука, 2009 г.
- 11.Трофимец Л.Н. Современные методы получения безвирусного картофеля. Вест. с.-х. науки, 1976, 3., С. 150-153

12. Чайлахян М.Х. Фотопериодическая и гормональная регуляция клубнеобразования у растений. М.: Наука, 1984 г.

13. Холмуратов Э.Г., Насырова Г.Б., Хакимов Р.А., Буриев Х.Ч. О возможных подходах к созданию биотехнологической коллекции картофеля. Материалы научно-практической конференции «Состояние, проблемы и перспективы овощеводства, бахчеводства и картофелеводства в Республике Узбекистан», Ташкент 2003, с. 177-180)

14. Холмуратов Э.Г., Мухаммадиев А.М., Насырова Г.Б., Арипов А., Буриев Х.Ч. Применение совокупного и стадийного электровоздействия при культивировании растений картофеля *in vitro*. Материалы научно-практической конференции «Состояние, проблемы и перспективы овощеводства, бахчеводства и картофелеводства в Республике Узбекистан», Ташкент 2003, с. 175-177.)

15. Холмуратов и др. О возможных подходах к созданию биотехнологической коллекции картофеля. 2003. Материалы научно – практической конференции «Состояние, проблемы и перспективы овощеводства, бахчеводства и картофелеводства в Республике Узбекистан» Ташкент. С. 177 - 180)

16. Arora A, Sairam RK, Srivastava GC 2002 Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.* 82: 1227-1238.

17. Allen RD, Webb RP, Schake SA (1997). Use of transgenic plants to study anti-oxidant defenses. *Free Radicals in Biology and Medicine* 23, 473-479.

18. Audy, P., P. Palukaitis, S.S. Slack, and M. Zaitlin. 1994. Replicase – mediated resistance to potato virus Y in transgenic tobacco plants. *Molecular Plant – Microbe Interaction* 7 (1): 15 – 22.

19. Anselmo BA, Ganga ZN, Badol EO, Heimer YM, Nejdat A (1998). Screening sweet potato for drought tolerance in the Philippine highlands and

20. Arora A, Sairam RK, Srivastava GC 2002 Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.* 82: 1227-1238.

21. A Van der Mescht,<sup>1</sup> J.A. De Ronde<sup>1</sup> and F.T. Rossouw (1998). Chlorophyll fluorescence and chlorophyll content as a measure of drought tolerance in potato. *South African Journal of Science*, 94, No.10.

22. Bajaj S, Targolli J, Liu LF, Ho THD, Wu R 1999 Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants. *Mol. Breed.* 5: 493-503.

23. Cassels, A.C. 1987. In vitro induction of virus-free potatoes by chemotherapy. In: "Biotechnology in agriculture and forestry. Vol.3: Potato." (Eds.) Y.P.S. Bajaj. Springer-Verlag Berlin pp 40-50T.

24. Contreras, A., J. Banse, J. Fuentealba, C. Aruta, N. Manquian & F. Asenjo, 1980. Chilean potato germplasm (*Solanum sp.*), Final Rep., Instituto de Produccion Vegetal, Univers. Austral de Chile, Valdivia pp. 33

25. CIP. Margie Petlak, et al. Beyond Discovery: The Path from Research to Human Benefit. Washington, D.C.: Office on Public Understanding of Science, National Academy of Science, October 2002.

26. INTA. Okada, K. A., 1976. Exploration, conservation and evolution of potato germplasm in Argentina. *Pot. Res.* 19, 263-269

27. Internet–Bulletin: Картофель в России , v. 95, 05.06.2002.  
<http://www.yarmarka.net/news/>

28. Internet–Bulletin: Molecular breeding. Max Plank Institute.  
<http://www.mpiz-koeln.mpg.de/~rohde/molbreed.html>

29. Kassins, B. 1957. The use of tissue culture to produce virus-free clones from infected potato varieties. *Ann.appl.Biol.* 45:422-427.,

30. Kirnak H, Kaya C, Tas I, Higgs D (2001). The influence of water deficit on vegetative growth, physiology, fruit yield and quality in eggplants. *Bulgarian Journal Plant Physiology* 27(3-4), 34-46.
31. Koda Y., Takahashi K., Kikuta Y., (1993) Induction of tuberization in various plants by jasmonic acid and related compounds. In Abstr. 15th Int. Bot. Congr. Yokogama, p.127
32. Kornyejev D., Logan B., Payton P., Allen R., Holaday S. (2003). Elevated chloroplastic glutathione reductase activities decrease chilling-induced photoinhibition by increasing rates of photochemistry, but not thermal energy dissipation, in transgenic cotton. *Functional Plant Biology*, 30, 101-110.
33. Logan B., Monteiro G., Kornyejev D., Payton P., Allen R., Holaday S. (2003), *American Journal of Botany*, 90(9), 1400-1403.
34. Morel, 1964; Hunneus W. 1977a. Virusbekämpfung im Kartoffellbau. *Z. Pflanzenkrankh.-u.-schutz* 84, 615 – 637
35. Morel, 1964; Hunneus W. 2006. Virusbekämpfung im Kartoffellbau. *Z. Pflanzenkrankh.-u.-schutz* 84, 615 – 637
36. Odjakova M., Hadjiivanova C. The complexity of pathogen defense in plants (Review). *Bulg. J. Plant Physiol.*: 27 (1-2), pp.101-109, 2001.
37. Payton P., Webb R., Kornyejev D., Allen R., Holaday A. (2001), Protecting cotton photosynthesis during moderate chilling at high light intensity by increasing chloroplastic antioxidant enzyme activity. *J. Experimental Biology*. V. 52, N365, pp.2345-2354.
38. P. Saraswati, M. Johnston, R. Coventry, J. Holtum. Identification of drought tolerant sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) cultivars. 4<sup>th</sup> International Crop Science Congress, 26 September-1 October 2004.

39. Sen Gupta A., Webb RP, Holaday AS, Allen RD (1993b). Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. *Plant Physiology* 103, 1067-1073.
40. Schilde-Rentchler, Liselotte, N. Espinoza & R. Estrada, 1984. Induction of tubers in vitro and their utilization for storage and distribution of potato germplasm. 9th Triennial Conf. Eur. Ass. Pot. Res., Interlaken, 46
41. Shamina Z., Dolgih Ju., Larina S., Zabrodina M., Havkin E., Jdanova N., Pustovoitova T. Studies of genetic features of corn cultured cells. Cell engineering production of economically valuable lines. *Molecular genetics, microbiology and virology(Rus.)* 1994, N 4.p. 24
42. Hunneus W. 2009. Virusbekämpfung im Kartoffellbau. Z. Pflanzenkrankh.-u.-schutz 84, 615 – 637). Jacobsen, B., 1973. Seed potato production in Europe – system, techniques and quality standards. Proc. 5<sup>th</sup> Triennial Conf. Eur. Ass. Pot. Res., Norwich, 28 -37
43. Hussey, G. & Stacey, N. J. In vitro proration of potato (*Solanum tuberosum* L). 1981. *Annals of Botany*, 48, 787-79
44. Van Soest, L. J. V., 2008. Evaluation and distribution of important properties in the German-Netherland potato collection. *Pot. Res.* 26, 109-121, Mix, Gunda. 1981. Kartoffelsorten aus dem Reagenzglas – Bedingungen zur Laqngzeitlagerung. *Kartoffelbau* 32, 198-199
40. Wu, G., B.J. Shortt, E.B. Lawrence, E.B. Levine, K.C. Fitzsimmons, and D.M. Shah. 1995. Disease reistance conferred by expression of a gene encoding H2O2-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* 7:1357 – 1368.