

УДК 582.926.2:576.3

UDC 582.926.2:576.3

03.00.00 Биологические науки

Biological sciences

**ВЛИЯНИЕ МЕХАНОХИМИЧЕСКОГО
ПРЕПАРАТА ПИХТЫ НА МОРФОГЕНЕЗ
КАРТОФЕЛЯ (*SOLANUM TUBEROSUM* L.)
ПРИ МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ *IN VITRO*¹**

**EFFECT OF MECHANICAL AND CHEMICAL
PREPARATION OF ABIES ON POTATO
(*SOLANUM TUBEROSUM* L.)
MORPHOGENESIS IN COURSE OF
MICROPROPAGATION *IN VITRO***

Дарханова Валентина Гаврильевна
инженер I категории, SPIN – код: 1643-9942
e-mail: darhana@mail.ru
ФГБУН Институт биологических проблем
криолитозоны СО РАН, Россия, 677980, Якутск,
пр. Ленина, 41

Darkhanova Valentina Gavriilyevna
1 category engineer, SPIN-code: 1643-9942
e-mail: darhana@mail.ru
Institute for Biological Problems of Cryolithozone SB
RAS, 41 Lenin ave., Yakutsk, 677980, Russia

Трофимова Ирина Григорьевна
начальник отдела, SPIN – код: 1726-1296
e-mail: ig.trofimova@s-vfu.ru
Ботанический сад СВФУ, Россия, 677000, Якутск,
ул. Белинского, 58

Trofimova Irina Grigoryevna
Head of department, SPIN-code: 1726-1296
e-mail: ig.trofimova@s-vfu.ru
Botanical Garden of M.R. Ammosov North-Eastern
Federal University, 58 Belinsky Str., 677000, Yakutsk,
Russia

Строева Наталья Семеновна
инженер I категории, SPIN – код: 8391-7960
e-mail: natali.stroeva.62@mail.ru
ФГБУН Институт биологических проблем
криолитозоны СО РАН, Россия, 677980, Якутск,
пр. Ленина, 41

Stroeва Natalia Semenovna
1 category engineer, SPIN-code: 8391-7960
e-mail: natali.stroeva.62@mail.ru
Institute for Biological Problems of Cryolithozone SB
RAS, 41 Lenin ave., Yakutsk, 677980, Russia

Филиппова Галина Валерьевна
к.б.н., с.н.с., SPIN – код: 8460-0822
e-mail: nureeva@yandex.ru
ФГБУН Институт биологических проблем
криолитозоны СО РАН, Россия, 677980, Якутск,
пр. Ленина, 41

Filippova Galina Valeryevna
Candidate of Biology, Senior researcher, SPIN-code:
8460-0822
e-mail: nureeva@yandex.ru
Institute for Biological Problems of Cryolithozone SB
RAS, 41 Lenin ave., Yakutsk, 677980, Russia

Воронов Иван Васильевич
к.б.н., с.н.с., SPIN – код: 3470-601
e-mail: viv_2002@mail.ru
ФГБУН Институт биологических проблем
криолитозоны СО РАН, Россия, 677980, Якутск,
пр. Ленина, 41

Voronov Ivan Vasilyevich
Candidate of Biology, Senior researcher,
SPIN-code: 3470-601
e-mail: viv_2002@mail.ru
Institute for Biological Problems of Cryolithozone SB
RAS, 41 Lenin, Yakutsk, 677980, Russia

Работа посвящена изучению влияния
механохимического порошка из древесной зелени
пихты (МПН) на морфогенез картофеля *in vitro*. В
исследовании использовались безгормональные
питательные среды (МС, ½ B5, ½ ЛС) на которые
помещали микрочеренки предварительно
полученных асептических растений. Наблюдение
за морфогенезом растений проводили на 15 и 30-
ый дни, оценивали частоту развития побегов,
высоту растений, число листьев, частоту
ризогенеза, число корней и их длину.

The article gives the results of the study of an effect of
mechanochemical powder of wood green of *Abies*
(MPA) on potato morphogenesis *in vitro*. The study
involved the hormone-free nutrient mediums (MS, ½
B5, ½ LS) for growing microcuttings from preliminary
obtained aseptic plants. Plant morphogenesis was
observed on the 15th and 30th days. At that, the number
of developed shoots, plant height, leaves number,
rhizogenesis rates, root number and length were
estimated. MPA appeared to have the regulatory effect
on morphogenesis of potato microcuttings. Based on

¹ Работа выполнена в рамках госзадания ИБПК СО РАН на 2017-2020 гг. № АААА-А17-117020110056-0

Использование препарата МПН выявило регуляторную активность по отношению к морфогенезу микрочеренков картофеля. В зависимости от минерального состава безгормональной агаризованной среды, на которой проводили культивирование микрочеренков картофеля, препарат МПН в концентрации 100 мг/л вызывал стимулирование роста корешков побегов (среда 1/2 B5), а также уменьшение высоты побега (среда MS), при этом, не оказывал влияние на число листовых пластинок

mineral composition of the nutrient agar medium for potato microcuttings growing, MPA at 100 mg/l concentration induced root development (1/2 B5 medium), reduced height of shoots (MS medium), while the number of leaf blades was not affected.

Ключевые слова: КАРТОФЕЛЬ, КУЛЬТУРА *IN VITRO*, МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ, МОРФОГЕНЕЗ, МЕХАНОХИМИЯ, ПИХТА

Keywords: POTATO, *IN VITRO* CULTURE, MICROPROPAGATION, MORPHOGENESIS, MECHANOCHEMISTRY, *ABIES*

Doi: 10.21515/1990-4665-130-046

Введение

Микроклональное размножение растений *in vitro* используется для достижения различных задач, требующих получения большого количества «новых» растений идентичных материнскому. Преимуществом данного метода в отличие от классических приемов является высокий коэффициент размножения, возможность проводить размножение вне зависимости от времени года [1].

В современных условиях метод микроклонального размножения также является одним из основных, входящих в комплекс подходов и методов осуществляемых с целью оздоровления растительного материала. Широкое использование он получил в картофелеводстве, где его применение, играет определяющую роль, в оздоровлении различных сортов картофеля (*Solanum tuberosum L.*) имеющих ухудшенные семенные качества клубней в силу зараженности вирусной инфекцией, в том числе в латентной форме, а также в сохранении и размножении посадочного материала [2, 3].

Успех культивирования *in vitro* различных сортов и видов растений во многом обусловлен оптимальным подбором среды (микро-, макроэлементы, витамины, органические соединения, гормоны) и условиями культивирования. Известно, что для стимуляции роста

культуры ткани на питательной среде, в качестве дополнительных, к основному источнику органических веществ (сахароза), применялись кокосовое молоко, экстракт незрелых семян различных растений (кукуруза, сосна и др.), экстракт дрожжей [4]. Использование порошкового механохимического препарата пихты, содержащего водорастворимые соли тритерпеновых кислот, также показало высокую эффективность его регуляторной активности в отношении морфогенеза *in vivo* и *in vitro* пшеницы, эспарцета, люцерны, рапса [5, 6].

Целью данного исследования являлось изучение влияния механохимического порошка пихты на морфогенез картофеля при микрклональном размножении *in vitro* на различных питательных средах.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования были использованы клубни, предоставленные частным фермерским хозяйством, которое использует для выращивания и реализации, популярный среди населения Якутии, картофель «Синский». Клубни имели овально-округлую форму, с глазками средней глубины, гладкой красной кожурой и белой мякотью.

Методы, применяемые в исследовании, основывались на общепринятых приемах работы с культурами клеток и тканей согласно рекомендациям [3,7]. Перед проращиванием клубни тщательно промывались с применением моющего средства. Побеги длиной не менее 2 см отделяли от клубней и в асептических условиях последовательно стерилизовали 3,0 % перекисью водорода в течение 1 мин, 5,0% перманганатом калия 10 мин, 1,0 % хлорамином 5 мин, 70 % этиловый спиртом 1 мин. Затем трижды отмывали автоклавированной дистиллированной водой.

В качестве исходных эксплантов для введения в культуру *in vitro* использовали апикальные меристемы побегов, которые помещали на агаризованную безгормональную питательную среду с минеральной

основой Мурасиге-Скуга (МС). Пробирки с изолированными апикальными меристемами на питательных средах инкубировали при температуре 24-25⁰С, освещенности 3000 люкс, 16-ти часовом фотопериоде и 70 % относительной влажности воздуха. Полученные асептические растения – регенеранты черенковали и высаживали на безгормональные питательные среды МС, Гамборга (½ В5), Линсмайера-Скуга (½ ЛС), а также на среды МС, ½ В5 дополненные наноккомпозитом на основе механоактивированной хвои пихты (МПН) из расчета 100 мг/л среды. МПН был получен в Институте химии твердого тела и механохимии СО РАН.

Наблюдение за морфогенезом растений проводили на 15 и 30-ый дни, оценивали частоту развития побегов, высоту растений, число листьев, частоту ризогенеза, число корней и их длину.

Полученные результаты представлены в виде средней арифметической величины и ее стандартной ошибки ($M \pm SEM$). Сравнение средних значений выборок проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), значимость отличий определяли с помощью критерия Даннета для множественных сравнений, при уровне $p \leq 0.05$. Расчет проводили с помощью пакета AnalystSoft, StatPlus – программа статистического анализа, v.2007.

Результаты и их обсуждение

В исследовании использовались безгормональные питательные среды (МС, ½ В5, ½ ЛС) на которые помещали микрочеренки, предварительно полученных *in vitro* растений из апикальных меристем побегов клубней картофеля. Показано, что на 15-е сутки культивирования во всех вариантах частота развития побегов составляла 100 % (табл. 1). Наибольшая высота сформированных побегов была отмечена у растений культивируемых на агаризованной среде с минеральной основой МС. Высота растений культивируемых на этой среде превышала в 1,1 и 1,7 раза растения развивающихся на средах ½ ЛС и ½ В5 соответственно. Анализ

данных по количеству листьев на эксплант выявил, что среда 1/2 B5 способствует увеличению их числа в 1,2 и 1,3 раза относительно вариантов со средами MC и 1/2 LC. Все исследуемые варианты характеризовались 100 % частотой ризогенеза. Вместе с тем, отмечено увеличение на 24 и 30 % числа корней в варианте с питательной средой MC по сравнению с 1/2 B5 и 1/2 LC соответственно. Длина корней статистически достоверно не отличалась в вариантах MC и 1/2 LC, за исключением снижения в 1,2 - 1,3 раза этого показателя у растений культивируемых на среде 1/2 B5.

Таблица 1.

Морфогенез микрочеренков побегов картофеля на безгормональных агаризованных средах с различным минеральным составом

Показатель морфогенеза	MC		1/2 B5		1/2 LC	
	15 сутки	30 сутки	15 сутки	30 сутки	15 сутки	30 сутки
Частота развития побегов, %	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Высота, см	11,0±0,4	12,9±0,4	6,6±1,7*	11,0±0,6*	9,7±0,5	14,0±0,5
Число листьев на эксплант, шт.	13,8±0,6	18,5±0,7	16,5±1,5	20,0±1,8	12,8±0,7	17,9±0,7
Частота ризогенеза, %	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Число корней на эксплант, шт.	7,6±0,4*	8,0±0,4*	5,8±1,0	5,8±1,0	5,0±0,3	5,4±0,3
Длина корней, см	4,3±0,1	6,2±0,2	3,5±0,3*	6,5±0,4	4,6±0,2	5,5±0,2*

* – различия статистически значимы по сравнению с другими вариантами ($p < 0.05$, ANOVA, критерий Даннета).

На 30-е сутки культивирования наблюдался значительный рост растений сформировавшихся на среде 1/2 B5 и 1/2 LC, высота растений увеличилась в среднем на 4,0 см., тогда как в варианте со средой MC, прирост побегов растений составил около 2,0 см., относительно 15-го дня культивирования. Тем не менее, растения, культивируемые на среде 1/2 B5, были самыми низкорослыми по сравнению с другими вариантами.

Количество листьев и корней на эксплантах статистически достоверно не отличалось во всех исследуемых вариантах. Прирост числа листьев к 30-му дню составил в среднем 4-5 листьев, а число корней не изменялось по отношению к 15-му дню наблюдения. Наиболее интенсивный рост корней был отмечен в варианте $\frac{1}{2}$ В5, их длина увеличилась на 3,0 см. относительно 15-го дня культивирования. Прирост корней в варианте МС и $\frac{1}{2}$ ЛС составлял 2,0 и 1,0 см., соответственно. В целом, длина корней растений сформированных в условиях питательных сред МС и $\frac{1}{2}$ В5 к 30-му дню статистически достоверно не отличалась.

Таким образом, использование трех агаризованных питательных сред с различным микро- и макроэлементным составом показало наиболее интенсивный морфогенез микрочеренков картофеля на среде МС, что согласуется с литературными данными [3]. Вместе с тем, несмотря на более низкую начальную регенерацию клеточной ткани и интенсивность морфогенеза микрочеренков, которые были отмечены в первые две недели культивации на среде $\frac{1}{2}$ В5, следует отметить, что дальнейшая культивация на этой среде способствовала активному росту и развитию побегов картофеля.

Известно, что регуляторы роста способствуют поступлению элементов минерального питания в корневую систему. Технологический цикл получения таких веществ сопровождается использованием дорогостоящих химических реагентов, многоступенчатыми этапами производства и т.д. В настоящее время, применение механохимических технологий позволяет получать не только высокоэффективные биологические активные препараты применяемые, в том числе в растениеводстве, а также перерабатывать разного рода отходы [8, 9]. Например, кору и зелень хвойных деревьев, шелуху риса, кору облепихи, что способствует получению сравнительно низкочастотных по себестоимости целевых биодоступных органических веществ [10,11].

Ранее проведенные исследования по изучению влияния в качестве регулятора роста препарата МПН показали высокую эффективность в отношении морфогенеза пшеницы, стеблевых узлов эспарцета и люцерны. В концентрации 100 мг/л он стимулировал развитие каллусной ткани и вторичную регенерацию в базальной части эксплантов эспарцета, ускорял стеблевой морфогенез и укоренение побегов люцерны *in vitro* [5, 6].

Для изучения действия МПН на морфогенез микрочеренков побегов картофеля нами были выбраны среды МС и ½ В5, результаты исследования представлены в табл. 2.

Таблица 2.

Морфогенез микрочеренков побегов картофеля на безгормональных агаризованных средах МС и ½ В5 дополненных МПН

Показатель морфогенеза	МС+МПН (100 мг/л)		½ В5+МПН (100 мг/л)	
	15 сутки	30 сутки	15 сутки	30 сутки
Частота развития побегов, %	100,0	100,0	100,0	100,0
Высота, см.	8,3±0,3*	10,5±0,3	6,5±0,7	10,5±0,7
Число листьев на эксплант, шт.	13,3±0,6	17,1±0,6	11,9±0,8	19,2±1,7
Частота ризогенеза, %	100,0	100,0	100,0	100,0
число корней на эксплант, шт.	6,5±0,4*	7,4±0,6	4,8±0,3	6,5±0,3
длина корней, см	4,1±0,2	5,7±0,3	4,4±0,3	7,5±0,4*

* – различия статистически значимы по сравнению с другим вариантом ($p < 0.05$, ANOVA, критерий Даннета).

Показано, что на 15-е сутки культивирования на питательных средах дополненных МПН частота развития побегов и ризогенеза составляли 100%. Наибольшие высота сформированных побегов и число корней на эксплант было отмечено у растений, культивируемых на агаризованной среде с минеральной основой МС дополненной МПН. Высота растений и число корней у побегов, культивируемых на этой среде, превышали в 1,3 и

1,4 раза, соответственно, растения, которые развивались на среде ½ В5 дополненной МПН. Анализ данных по количеству листьев на эксплант и длины корней не выявил статистически значимых отличий.

На 30-е сутки культивирования морфогенетические показатели побегов культивируемых на двух средах дополненных МПН отличались только по показателю длины корней. Так, среда ½ В5 дополненная МПН привела к активации роста корешков побегов картофеля в 1,3 раза по сравнению с вариантами: МС, МС дополненный МПН и ½ В5. Также следует отметить, что добавка механохимического порошка древесной зелени пихты в агаризованную среду МС приводит к достоверному снижению роста (высоты) побега картофеля (табл. 1 и 2).

Заключение

Использование препарата МПН из хвои пихты выявило его регуляторную активность по отношению к морфогенезу микрочеренков картофеля *in vitro*. В зависимости от минерального состава безгормональной агаризованной среды, на которой культивировались микрочеренки картофеля, добавление препарата в концентрации 100 мг/л вызывало стимулирование роста корешков побегов (среда ½ В5), уменьшение высоты побега (среда МС), обусловленное снижением длины междоузлий и не оказывало влияние на число листовых пластинок.

Список литературы

1. Лутова Л.А. Биотехнология высших растений / Л.А. Лутова – Изд. 2-е. СПб.: Изд-во С.-Петербур. Ун-та, 2010. – 240 с.
2. Зыкин А.Г. Вирусные болезни картофеля / А.Г. Зыкин – Л.: Колос, 1976. – 152 с.
3. Трофимцом Л.Н. Оздоровление и ускоренное размножение семенного картофеля / Л.Н. Трофимцом, Д.П. Остапенко, В.В. Бойко, и др. / Методические рекомендации; М., 1985. – 35 с.
4. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко – М: Наука, 1964. – 272 с.
5. Рожанская О.А. Особенности морфогенеза эсварцета и люцерны *in vitro*. / О.А. Рожанская, В.Г. Дарханова, Н.С. Строева, и др. // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. - 2008. - № 5. - С. 58–65.

6. Рожанская О.А. Влияние регуляторов роста растительного происхождения на морфогенез рапса *in vitro*. / О.А. Рожанская, Н.В. Юдина, О.И. Ломовский, К.Г. Королев // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. - 2003. - № 2. - С. 108–112.
7. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л.Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е.Полищук – Киев: Наукова думка. 1980. – 320 с.
8. Oleg Lomovsky, Kirill Korolyov, Young Soon Kwon // Proceedings of the 7-th Russian-Korean International Symposium on Science and Technology "KORUS-2003", Ulsan, Republic of Korea, 2003. Vol. 1.
9. Королев К.Г., Ломовский О.И., Рожанская О.А., Васильев В.Г. // Химия природных соединений [K.G. Korolev, O.I. Lomovskii, O.A. Rozhanskaya, V.G. Vasil'ev //Chem. Natural compounds], 2003. 39:4.
10. Шевцов С.А. Тритерпеноиды из видов *Abies*. V: Строение и спектральные свойства основных 9β-ланостановых кислот хвои пихты сибирской / С.А. Шевцов, В.А. Ралдугин // Химия природ. соед. 1988. № 3. С. 364–371.
11. Патент № 2244426. МПК А01N65/00, А61К35/78, С07С51/41. Препарат, содержащий водорастворимые соли тритерпеновых кислот и способ его получения. Ломовский О.И., Королев К.Г.; заявитель и патентообладатель Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН (ИХТТМ СО РАН) (RU). № 2003125160/15. Заявлено 11.08.2003. Опубл.: 20.01.2005, БИ № 2.

Reference list

1. Lutova L.A. Biotehnologija vysshih rastenij / L.A. Lutova – Izd. 2-e. SPb.: Izd-vo S.-Peterb. Un-ta, 2010. – 240 s.
2. Zykin A.G. Virusnye bolezni kartofelja / A.G. Zykin – L.: Kolos, 1976. – 152 s.
3. Trofimcom L.N. Ozdorovlenie i uskorennoe razmnozhenie semennogo kartofelja / L.N. Trofimcom, D.P. Ostapenko, V.V. Bojko, i dr. / Metodicheskie rekomendacii; M., 1985. – 35 s.
4. Butenko R.G. Kul'tura izolirovannyh tkanej i fiziologija morfogeneza rastenij / R.G. Butenko – M: Nauka, 1964. – 272 s.
5. Rozhanskaja O.A. Osobennosti morfogeneza jesvarceta i ljucerny *in vitro*. / O.A. Rozhanskaja, V.G. Darhanova, N.S. Stroeva, i dr. // Sibirskij vestnik sel'skohozjajstvennoj nauki. - 2008. - № 5. - S. 58–65.
6. Rozhanskaja O.A. Vlijanie reguljatorov rosta rastitel'nogo proishozhdenija na morfogenez rapsa *in vitro*. / O.A. Rozhanskaja, N.V. Judina, O.I. Lomovskij, K.G. Korolev // Sibirskij vestnik sel'skohozjajstvennoj nauki. - 2003. - № 2. - S. 108–112.
7. Kalinin F.L. Metody kul'tury tkanej v fiziologii i biohimii rastenij / F.L.Kalinin, V.V. Sarnackaja, V.E.Polishhuk – Kiev: Naukova dumka. 1980. – 320 s.
8. Oleg Lomovsky, Kirill Korolyov, Young Soon Kwon // Proceedings of the 7-th Russian-Korean International Symposium on Science and Technology "KORUS-2003", Ulsan, Republic of Korea, 2003. Vol. 1.
9. Korolev K.G., Lomovskij O.I., Rozhanskaja O.A., Vasil'ev V.G. // Himija prirodnyh soedinenij [K.G. Korolev, O.I. Lomovskii, O.A. Rozhanskaya, V.G. Vasil'ev //Chem. Natural compounds], 2003. 39:4.
10. Shevcov S.A. Triterpenoidy iz vidov *Abies*. V: Stroenie i spektral'nye svojstva osnovnyh 9β-ланостановых кислот хвои пихты сибирской / S.A. Shevcov, V.A. Raldugin // Himija prirod. soed. 1988. № 3. S. 364–371.

11. Patent № 2244426. MPK A01N65/00, A61K35/78, C07C51/41. Preparat, sodержashhij vodrastvorimye soli triterpenoyh kislot i sposob ego poluchenija. Lomovskij O.I., Korolev K.G.; zajavitel' i patentoobladatel' Institut himii tverdogo tela i mehanohimii SO RAN (ИИТТМ СО РАН) (RU). № 2003125160/15. Zajavleno 11.08.2003. Opubl.: 20.01.2005, BI № 2.