

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК ТАДЖИКИСТАНА
ИНСТИТУТ БОТАНИКИ, ФИЗИОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ РАСТЕНИЙ**

**УДК:581.137.3/.4(575.3)
ББК:28.59(2Т)
Д-46**

На правах рукописи

ДИЛОВАРОВА НИГИНА СИФАТШОЕВНА

**ОРГАНОСПЕЦИФИЧНОСТЬ ПРО- И АНТИОКСИДАНТНОЙ
СИСТЕМЫ У РАСТЕНИЙ *SOLANUM TUBEROSUM L.***

Диссертация

на соискание учёной степени кандидата биологических наук по
специальности 03.01.05 – Физиология и биохимия растений

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор,
член-корреспондент Национальной Академии
наук Таджикистана, заслуженный деятель науки
и техники РТ Алиев К.А.

Душанбе - 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5-10
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11-39
1.1. Биотехнологические подходы к изучению реакции растений на стресс.....	11-13
1.2. Культура клеток растений и генной экспрессии <i>in vitro</i>	14-17
1.3. Механизмы возникновения соматональной изменчивости растений.....	17-23
1.4. Активные формы кислорода и устойчивость растений.....	23-33
1.5. Кислородные радикалы и перекисное окисление липидов.....	33-39
ГЛАВА II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	40-57
2.1. Объекты исследования.....	40-41
2.2. Условия культивирования растений <i>in vitro</i>	41
2.3. Определение водного дефицита в листьях картофеля.....	41-42
2.4. Определение содержания активной формы кислорода.....	42
2.5. Определение активности гваяколпероксидазы.....	43-44
2.6. Определение активности каталазы.....	44-47
2.7. Определение активности супероксиддисмутазы.....	47-50
2.8. Определение содержания перекиси водорода.....	50-52
2.9. Определение свободного пролина.....	52
2.10. Определение уровня перекисного окисления липидов (содержания малонового диальдегида).....	54-55
2.11. Определение содержания фотосинтетических пигментов.....	56
2.12. Определение pH.....	57
2.13. Статистическая обработка данных.....	57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i> И <i>EX VITRO</i>.....	58-66

3.1. Морфофизиологические параметры растений регенерантов в условиях <i>in vitro</i> и <i>ex vitro</i>	58-66
ГЛАВА 4. СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В УСЛОВИЯХ IN VITRO И EX VITRO.	67-78
4.1.Содержание фотосинтетических пигментов в листьях картофеля (<i>Solanum tuberosum L.</i>) в условиях <i>in vitro</i> и <i>ex vitro</i>	67-78
ГЛАВА 5. ОРГАНОСПЕЦИФИЧНОСТЬ ПРО- И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В УСЛОВИЯХ IN VITRO И EX VITRO У КАРТОФЕЛЯ.	79-104
5.1 Активность антиоксидантных ферментов в растениях-регенерантах в условиях <i>in vitro</i>	79-84
5.2. Антиоксидантная система в условиях <i>ex vitro</i>	84-89
5.3. Индукция антиоксидантной системы растений картофеля в условиях засухи.....	89-98
5.4. Перекисное окисление липидов у растений <i>Solanum tuberosum L.</i> в условиях <i>ex vitro</i>	99-104
ГЛАВА 6. СОДЕРЖАНИЕ ВОДЫ И ПРОЛИНА В ЛИСТЬЯХ РАЗНОУСТОЙЧИВЫХ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ КАРТОФЕЛЯ EX VITRO	111-119
6.1. Действие полиэтиленгликоля на относительное содержание воды (осв) и пролина в листьях в <i>ex vitro</i>	111-114
6.2. Влияние циклогексимида на формирование окислительных реакций и активность пероксидазы растений картофеля.....	114-119
ОБСУЖДЕНИЕ	120-126
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	127-128
РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРАКТИЧЕСКОМУ ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ	129
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	130-148
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ	149-150

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

№	Сокращенное название	Полное название
1	АБК	Абсцизовая кислота
2	АОА	Антиоксидантная активность
3	АОЗ	антиоксидантная защита
4	АПО	Аскорбатпероксидаза
5	АФК	Активные формы кислорода
6	БАП	6-бензиламинопурин
7	БС	Брассиностероиды
8	ГВП	Гваяколпероксидаза
9	ГК	Гиббереллиновая кислота
10	ГР	Глутатионредуктаза
11	ИМК	Индолилмасляная кислота
12	ИУК	Индолилуксусная кислота
13	КАТ	Каталаза
14	МДА	Малоновый диальдегид
15	МС	Мурасиге - Скуга
16	НУК	Нафтилуксусная кислота
17	ПА	Полиамин
18	ПО	Пероксидаза
19	ПОЛ	Перекисное окисление липидов
20	ПЭГ	Полиэтиленгликоль
21	СОД	Супероксиддисмутаза
22	α -ТОФ	α - токоферол

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Абиотические стрессы являются одними из основных факторов, ограничивающих продуктивность сельскохозяйственных культур, и представляют серьезную угрозу продовольственной безопасности во многих регионах мира [143, 160].

Засуха и солевой стресс нарушают многие физиологические и биохимические процессы растений, вызывая осмотический стресс, ионный дисбаланс и токсичность, дефицит микро-и макроэлементов и окислительный стресс [106]. В конечном итоге эти условия взаимодействуют с клеточными компонентами, особенно с ДНК, белками и липидами, что негативно влияет на рост и развитие растений [171].

Растения обладают различными физиологическими, биохимическими и молекулярными механизмами, обеспечивающими устойчивость к абиотическим стрессам, например, инициируют выработку различных белков и осмолитов, которые поддерживают ионный и водный гомеостаз. Стрессы любой природы вызывают, в первую очередь, окислительный стресс, сопровождающийся выработкой избыточных активных форм кислорода (АФК), в том числе супероксид - анион радикала кислорода (O_2^-), перекиси водорода (H_2O_2), синглетного кислорода (1O_2) и гидроксильного радикала водорода (ОН). В растениях функционирует сложная система антиокислительной и антиоксидантной защиты, в которой участвуют такие ферменты, как супероксиддисмутаза, пероксидаза, каталаза, полифенолоксидаза, аскорбатпероксидаза, гваяколпероксидаза, глутатионредуктаза, а также неферментативные компоненты, такие как пролин, некоторые фенольные соединения, глутатион и др. Компоненты антиоксидантной защиты локализованы в субклеточных структурах и в различных органах растений (листья, корни). В зависимости от толерантности и чувствительности генотипов растений проявляются различные вариации экспрессии генов, ответственных за

синтез антиоксидантных ферментов, локализованных в различных компартментах клетки [15, 138]. Функциональная, зависимость в норме и при стрессе мало изучена, что подчёркивает актуальность выбранной нами темы диссертационной работы.

Степень научной разработанности изучаемой проблемы. Изучение про- и антиокислительных систем защиты растений в зависимости от влияния экологических факторов является важнейшим вопросом современной физиологии и биохимии растений. Начало этих исследований было заложено в работе сотрудников лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии Института ботаники, физиологии и генетики растений НАН Таджикистана [4].

Связь исследования с программами (проектами), научной тематикой. Данная работа выполнена согласно проекту лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии Института ботаники, физиологии и генетики растений Национальной академии наук Таджикистана №ГР 0116 Тj 00540 «Молекулярно-генетические механизмы устойчивости и продуктивности растений, полученных на основе методов биотехнологии» [2016-2020].

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Цель исследования: Изучение органоспецифических особенностей про- и антиоксидантной системы растений *in vitro* и *ex vitro* в условиях засухи.

Задачи исследования:

1. Определение содержания фотосинтетических пигментов *in vitro* и *ex vitro* в условиях водного дефицита;
2. Определение содержания прооксидантов: АФК (супероксид анион-радикал кислорода) и H_2O_2 у контрастных генотипов картофеля;
3. Изучение органоспецифичности перекисного окисления липидов у растений картофеля в условиях *in vitro* и *ex vitro* при стрессорном воздействии;

4. Определение активности антиоксидантных ферментов в разных органах растений (листьях, корнях) *in vitro* и *ex vitro*;

5. Влияние циклогексимида на активность про- и антиоксидантных систем в условиях ингибирования трансляционного аппарата *in vitro* и *ex vitro*.

Объекты исследования: 2 перспективных клон-гибрида картофеля (*Solanum tuberosum* L.) (№26 и №52/6), полученные из Международного центра картофеля СИП (Лима, Перу), а также новый отечественный сорт картофеля Таджикистан и голландский сорт Пикассо.

Предмет исследования. Изучение органоспецифичности про- и антиоксидантной системы у растений *Solanum tuberosum* L.

Научная новизна исследования. Показано, что при переводе растений из условий *in vitro* в *ex vitro* содержание хлорофиллов и каротиноидов существенно отличается. Формирование светособирающего комплекса пигментов фотосинтеза в условиях стресса (засухи) зависит от времени воздействия и от генотипа.

Впервые показана органоспецифичность активности антиоксидантных ферментов. Установлено, что активность гваяколпероксидазы и каталазы в условиях *in vitro* была значительно ниже, чем в условиях *ex vitro*.

Выявлено, что при продолжительном выдерживании растений-регенерантов в условиях засухи активность гваяколпероксидазы в листьях значительно ниже, чем в корнях; и наоборот, активность каталазы в листьях выше, чем в корнях. Активность каталазы в листьях при продолжительной экспозиции в условиях засухи менялась значительно больше, чем в корнях как у растений-регенерантов, так и у сортов картофеля. Оптимальное значение активности фермента каталазы соответствует рН 5,6, и гваяколпероксидазы рН 7,6.

Выявлено, что степень функционирования системы эндогенной защиты в условиях стресса в хлоропластах более высокая, чем в цитозоле.

Показана роль ингибитора трансляционной системы на активность про- и антиоксидантов в динамике воздействия стресса.

Теоретическая и научно-практическая значимость исследования. Результат исследования заключается в изучении роли антиоксидантных ферментов в усилении устойчивости растений к воздействию стрессовых факторов и является частью физиологии и биохимии растений. На основе полученных результатов выявлено, что клон №26 существенно отличается по устойчивости и продуктивности. Соотношение про- и антиоксидантной системы защиты корней можно рекомендовать для ранней диагностики устойчивости растений к стрессу, клон №26 можно рекомендовать для производства.

Полученный экспериментальный результат можно использовать для чтения курсов по молекулярным основам устойчивости для Вузов Таджикистана. Выявленный клон №26 можно рекомендовать для производственного испытания в картофелеводческие регионы Таджикистана.

Положения, выносимые на защиту.

1. Органоспецифичность ферментов антиоксидантной защиты растений: более высокая функциональная активность пероксидазы в корнях растений, а каталазы - в листьях.
2. Активация процессов перекисного окисления липидов и функционирование антиоксидантных ферментов при переводе растений картофеля из условий *in vitro* в *ex vitro* в зависимости от генотипа.
3. Выдвигается гипотеза, согласно которой перекись водорода, как эволюционный предшественник воды, участвует в поддержании водного

гомеостаза клетки и играет существенную роль в повышении устойчивости растений в условиях действия стрессора.

Степень достоверности результатов. Достоверность научных результатов получена на основе современных методов биотехнологии, физиологии и биохимии, подтверждена достаточной повторностью и корректной статистической обработкой, а также использованием современного оборудования и уникальных реактивов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности (с объяснением и отраслью исследований). Проведенные исследования относятся к биологической науке, особенно к отраслям молекулярной биологии, биохимии и физиологии растений. Отраслью исследования является физиология и биохимия растений.

Диссертация соответствует нескольким главам паспорта специальности 03.01.05 – Физиология и биохимия растений

В соответствии с главой 1. Изучены содержания фотосинтетических пигментов *in vitro* и *ex vitro* в условиях водного дефицита. Показано, что при переводе растений из условий *in vitro* в *ex vitro* содержание хлорофиллов и каротиноидов существенно отличается.

В соответствии с главой 8. Выявление, что при продолжительной экспозиции растений-регенерантов картофеля в условиях засухи активность гваяколпероксидазы в листьях значительно ниже, чем в корнях; и наоборот, активность каталазы в листьях выше, чем в корнях.

В соответствии с главой 4. Изучен ряд физиолого-биохимических свойств активности антиоксидантных ферментов в разных органах растений (листьях, корнях) в условиях *in vitro* и *ex vitro*.

Личный вклад соискателя ученой степени в исследования. Личный вклад состоит в подборе материалов для исследования, проведение экспериментов и обработке результатов, написании статей и проведении лабораторных работ и их анализа.

Апробация и реализация результатов диссертации: Основные результаты и положения диссертации были представлены на: Республиканской научно-практической конференции «Биоразнообразие горных экосистем Памира в связи с изменением климата» (Душанбе, 2021); IX-ой Международной конференции «Экологические особенности биологического разнообразия» (Куляб, 2021); Международной научной конференции «Становление и развитие экспериментальной биологии в Таджикистане» (Душанбе, 2022); XV Международной научно-практической конференции «Образование и наука для устойчивого развития» (Москва, 2023), а также были обсуждены на семинарах лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии растений и на ученом совете ИБФ и ГР НАНТ.

Полученные результаты используются при чтении спецкурса по физиологии и биохимии растений в ВУЗах биологического и сельскохозяйственного профиля.

Публикация результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 11 работ, 5 из них входят в перечень ВАК при Президенте Республики Таджикистан.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 150 страницах компьютерного текста, состоит из введения, 6 глав, обсуждения, заключения, практических рекомендаций, списка цитируемой литературы, которая содержит 172 источника (74 отечественных и стран СНГ и 98 авторов дальнего зарубежья), работа иллюстрирована 19 таблицами и 37 рисунками.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Биотехнологические подходы к изучению реакции растений на стресс

Растения должны справляться с рядом экологических стрессов на протяжении всей своей жизни. Среди них абиотические относятся к наиболее вредным, так как экологические стрессы отвечают за более чем 50% снижение урожайности сельскохозяйственных культур, в связи с чем являются потенциальной угрозой глобальной продовольственной безопасности в ближайшие десятилетия.

Рост и развитие растений резко снижаются из-за неблагоприятного воздействия абиотических стрессов. Существуют данные о том, что растение может проявлять только 30% своего генетического потенциала в условиях абиотического стресса. Таким образом, возникает фундаментальная необходимость изучения реакции растений на стресс для разработки устойчивых к стрессу сортов различных сельскохозяйственных культур. АгронOMICеские практики, такие как выбор сортов, устойчивых к широкому диапазону климатических условий, дата посадки, планирование орошения, управление удобрениями, могут быть одними из эффективных краткосрочных адаптивных инструментов для борьбы с абиотическими стрессами. Кроме того, “системная биология” в недавних исследованиях предлагает долгосрочную возможность на молекулярном уровне бороться с абиотическими стрессами. Генетический подход, например, отбор и идентификация основных генов путем картирования сцеплений и количественных локусов признаков, продуцирование мутантных генов и трансгенная интродукция новых генов может придать сортам сельскохозяйственных культур некоторые толерантные характеристики от их диких видов. Дикие виды считаются возможными источниками полезных генов/аллелей, связанных со стрессоустойчивостью, поскольку они эволюционировали в условиях естественного отбора, чтобы пережить последовательные периоды экстремальных климатических явлений [153].

Селекционеры во всем мире прилагают усилия для выведения сортов, устойчивых к абиотическим стрессам. Классические методы селекции слишком медленны и имеют ограниченный вклад в улучшение стрессоустойчивости [3]. В настоящее время культуры *in vitro* используются в качестве альтернативной стратегии в решении проблем устойчивости и продуктивности. Показано, что абиотические стрессы сильно влияют на период вегетации, развитие растений. Коэффициент роста и продукция биомассы *in vitro* являются надежными показателями для определения степени засухо- и солеустойчивости растений.

На современном этапе уже разработана технология культуры *in vitro* пшеницы и картофеля, методы молекулярного скрининга, основанные на изучении физиологических и биохимических показателей с использованием селективных агентов, которые успешно используются для получения растений, свободных от вирусов и устойчивых к высокой температуре и засолению [24, 21, 26, 27]. Эти агенты биотического стресса вызывают различные виды заболеваний, инфекций и повреждений культурных растений и значительно влияют на урожайность сельскохозяйственных культур. Особое внимание уделяется грибным болезням, одной из наиболее разрушительных групп патогенов. Они не только вызывают снижение количества и качества зерна, но также могут быть опасны для здоровья человека из-за производства высоких концентраций микротоксинов.

В кратчайшие сроки необходимо выявить перспективные формы растений и раскрыть механизмы устойчивости растений с помощью молекулярных, физиологических и метаболических аспектов устойчивости к стрессу.

В последние годы был достигнут прогресс в идентификации генов устойчивости. Например, идентификация генов засухоустойчивости открывает новые возможности для идентификации толерантных генотипов растений. Гены, связанные с устойчивостью к засухе, изучены у растений, таких как картофель, LRR-рецептор о подобная серин/треонин- протеинкиназа ERECTA

(ERECTA), фактор ответа на этилен (ERF), связывание чувствительного к обезвоживанию MYB (StMYB) [14, 22, 23, 35].

Существуют значительные различия в чувствительности картофеля, а засухоустойчивость отдельных сортов сильно различается [11, 2, 8]. Следовательно, очень важно определить сорта, которые можно выращивать в регионах с высокой засухой, или интегрировать засухоустойчивые в селекционные программы, провести скрининг имеющихся сортов картофеля на их устойчивость к засухе [14, 13]. Некоторые исследователи [17, 11, 36] использовали анализ *in vitro* для выявления засухоустойчивых генотипов картофеля, однако о тщательной комбинированной оценке сортов *in vitro* в полевых условиях не сообщалось.

Гены, контролирующие морфологию корней и их рост, играют решающую роль в сохранении почвенной влаги, поэтому профиль экспрессии некоторых из этих генов был проанализирован в условиях засухи [1, 19, 28]. Любые сорта могут быть полезными в программах селекции засухоустойчивости, если учитывать культуру *in vitro* и полевые данные [16].

Значительные достижения в исследованиях засухоустойчивости коснулись ряда первичных генов и регуляторов экспрессии, которые манипулируют различными признаками роста или урожайности [1, 19, 28, 23].

Таким образом, растения, как правило, находят баланс между своей реакцией и биотическим стрессом, чтобы бороться с вредным воздействием на их выживание. Успех в селекции более адаптированных к абиотическим стрессам сортов зависит от согласованных усилий различных областей исследований, включая физиологию растений и клеток, молекулярную биологию, генетику и селекцию. Использование современных инструментов молекулярной биологии для выяснения механизмов контроля абиотической стрессоустойчивости и для разработки стрессоустойчивых культур основано на экспрессии специфических генов, связанных со стрессом.

1.2. Культура клеток растений и экспрессия генов *in vitro*

Механизмы морфогенеза и регенерации клеток растений в условиях *in vitro* очень сложны и до конца не изучены. Методы культивирования клеток и реконструкции растений *in vitro* применена с целью получения растений устойчивых к стрессовым воздействиям и обладающих высокой продуктивностью [107, 53, 5, 39].

«Кроме того, использование методов молекулярной и клеточной биологии обеспечивают значительный вклад в понимание вопросов каллусогенеза, соматического эмбриогенеза и регенерации растений в условиях *in vitro* в селекции растений.

Показана разработка селективной среды *in vitro* для каллусогенеза, соматического эмбриогенеза и регенерации различных генотипов злаковых растений (пшеницы и эгилопса). Длина Поли (A) хвоста (PAL) участвует в регуляции активности трансляции мРНК. Содержание поли (A)- в клетках каллусов эгилопса и регенерации эмбриоидов также увеличивается при наличии ауксина в среде [52].» При каллусогенезе и органогенезе пшеницы в среде, содержащей цитокинин, наблюдается наибольшее количество поли (A)- содержащих РНК. Спецификацию участков действия цитокининов, происходит в разных участках растений в зависимости онтогенеза [159, 51, 69, 115, 168].

В условиях *in vitro* у растительных тканей могут также проявляться специфичные гены, которые связаны с изменением экспрессии генов. В условия *in vitro* транскрипции и пост транскрипции отличные от растений в условиях *in vivo*. Механизмы регуляция экспрессии генов в растения *in vitro*, играет важную роль. Специфических генов, участвующих в регенерации растений *in vitro*, могут служить инструментом для создания устойчивости растений и повышения эффективности методов биотехнологии культурных растений.

Одним из наиболее впечатляющих достижений последних лет стало открытие специфических генов, участвующих в регенерации растений *in vitro*.

Такие гены исследуются на предмет использования для повышения эффективности трансформации и разработки безмаркерных трансгенных растений.

В течение многих лет существовало убеждение, что генетическая изменчивость, встречающаяся в регенерантах, может быть индуцирована *de novo* в результате среды культивирования ткани или ее источник может происходить из эксплантата как «предсуществующая» вариация [131].

Получение растений через культуры тканей сопровождается появлением изменений различного характера. Одним из многих типов этих изменений является генетическая изменчивость, проявляющаяся в повышенной частоте точечных мутаций [119].

Среди генетических изменений, поражающих регенерантов, наиболее распространены изменения последовательности ДНК, а также амплификация генов, транспозиция и хромосомные изменения. Хромосомные изменения включают несколько различных явлений, таких как нарушение ploидности и количества хромосом, а также изменения в архитектуре хромосом (дупликации, транслокации, делеции и инверсии сегментов хромосом). Более того, изменения в архитектуре хромосом более распространены, чем в количестве хромосом у растений, полученных с помощью культуры тканей [121]. В исследованиях, посвященных картофелю (*Solanum tuberosum L.*), которые были регенерированы либо из протопластов, либо из стеблевых эксплантов, выявлена анеуплоидия или структурные хромосомные изменения. Между структурными изменениями были сегментарные делеции и дупликации [80]. В случае картофеля среда культуры ткани вызвала геномную нестабильность, которая может привести к изменению фенотипа растения.

По мнению ряда авторов, как правило, между устойчивостью культурных растений к стрессорам и продуктивностью сельскохозяйственных растений существует обратная зависимость, т.е. более устойчивые растения обладают пониженным уровнем метаболизма [88, 98]. Другие авторы считают, что существует возможность выведения высоко- пластичных, устойчивых к

экстремальным факторам среды и продуктивных сортов [56, 43, 30, 63, 170, 153]. Известно, что интенсивная селекция на продуктивность и устойчивость привела к потере толерантности к абиотическим факторам среды. Это делает актуальным изучение физиолого-биохимических механизмов устойчивости и продуктивности растений, раскрывающих механизмы эндогенной защиты растений и позволяющих выявить маркеры устойчивости и продуктивности растений при стрессе. Более того, расширение фундаментальных и прикладных инновационных исследований на основе современной геномной и клеточной технологий, а также маркеры ассоциированной и виртуальной селекции позволят создавать растения, адаптированные к различным климатическим стрессам в условиях глобального потепления.

Повышение средней температуры воздуха, происходящее вследствие глобального изменения климата, ведёт к дисбалансу природных экосистем, что чревато нарушением режима выпадения осадков, температурными аномалиями и увеличением частоты таких явлений, как наводнение и засуха.

Засуха и засоление почв приводят к снижению продуктивности сельскохозяйственных культур, т. к. провоцируют подавление роста и развития растений. Изменение физиолого-биохимических процессов, таких как фотосинтез и дыхание, сопровождаются развитием окислительного стресса, возникающего вследствие сверхпродукции активных форм кислорода (АФК) [49, 50, 31, 88, 105, 160, 92, 98, 28]. В настоящее время накоплен обширный материал, свидетельствующий о том, что стрессоры различной природы, к которым относится не только засуха и различные типы засоления почвы, но и избыточное накопление тяжелых металлов в почве, приводят к генерации активных форм кислорода в растениях (АФК) [31, 50, 100, 61, 4, 76, 141, 151, 142].

Таким образом, использование методов, основанных на культуре клеток растений *in vitro* для создания новых форм. Новые разработки в области сельскохозяйственной биотехнологии используются для повышения продуктивности сельскохозяйственных культур. Применение

сельскохозяйственной биотехнологии может улучшить качество жизни за счет разработки новых сортов растений, которые дают более высокие урожаи при меньших затратах.

1.3. Механизмы возникновения соматклональной изменчивости растений

Факторами генетической изменчивости является важным факторов и играет ключевую роль в селекции растений. Культура растительных тканей и органов растений *in vitro*, широко используемая, в качестве специфического средства улучшения урожая, привела к внесению генетических изменений. Эти генетические изменения в клеточную культуру растения дают возможность за короткий период времени создать новые селекционные линии. Разнообразие (вариабельность) регенерированных *in vitro* растений является потенциальной возможностью генетической изменчивости, возникающей во время культуры ткани, называемой соматклональной изменчивостью [131, 144, 145]. До сих пор такие термины, как калликлоны и протоклоны, использовались для определения вариантов, регенерированных из культуры герани и протопласта картофеля [155], соответственно. Однако Larkin and Scowcroft [131] использовали термин соматклональная изменчивость для всех форм изменчивости культурных растений. Возникновение неконтролируемой и случайной спонтанной изменчивости при культивировании растительной ткани является серьезной проблемой [97]. Такая изменчивость может включать мутацию одного гена на одном конце ДНК и грубые изменения ploидности на другом конце. Наблюдались вариации морфологических и биохимических признаков, таких как выработка пигмента, синтез никотина, число и структура хромосом [96]. Культура растительных тканей считается основным аспектом работы с зародышевой плазмой *Musa* [167]. Соматклональная изменчивость может быть вызвана уже существующей изменчивостью в соматических клетках эксплантата.

Соматклональная изменчивость является результатом как предсуществующей генетической изменчивости внутри эксплантов, так и изменчивости, индуцированной во время фазы культивирования ткани [96].

Существуют два типа соматональных вариаций: генетическая и эпигенетическая. Генетические процессы обеспечивают стабильность носителей генетической информации, закономерное распределение их хромосом между дочерними соматическими клетками. Эпигенетическая регуляция также известна как вариация развития и включает изменения активности генов без изменения ДНК, в его кодирующей последовательности, которые включают экспрессию определенных генов [107].

Самым ярким примером эпигенетической вариации является высокое соотношение цитокининов, ауксинов или витаминов, что способствует индукции каллуса [116]. Другие эпигенетические изменения включают чрезвычайную активность *ex vitro*, связанную либо с реверсией к ювенильности [158], либо с элиминацией вируса [75].

Соматональная изменчивость включает все формы фенотипической и генотипической изменчивости, возникающие в результате роста *in vitro*. Это может обеспечить полезные генетические вариации для улучшения растений, особенно вегетативно размножаемых культур, таких как фрукты (яблони, груши и айвы, клубники и персика) [93]. В нескольких исследованиях изучалась молекулярная основа соматональной изменчивости [79, 169]. Было обнаружено, что изменение метилирования ДНК, вероятно, играет определенную роль в регуляции транскрипции у растений [137]. До работы Evans и Sharp [95] по описанию соматональной изменчивости у томата генетическая основа соматональной изменчивости культур, размножающихся вегетативным путем, не была установлена. В настоящее время понятно, что для применимости соматональной изменчивости к широкому кругу культур необходима подробная генетическая информация о культурах-донорах. Большинство ранних работ по выяснению генетической основы соматональной изменчивости было выполнено на сахарном тростнике и картофеле. Обе культуры являются полиплоидами, размножаемыми вегетативным путем, и могут переносить изменение числа хромосом в клетке без нарушения агрономических характеристик. Также редко встречается

мозаичная болезнь сахарного тростника, вызываемая вирусом семейства Potyviridae. [128]. По данным Ихсанпоур и др. [93] наблюдаются следующие вариации: изменения числа и структуры хромосом в клетке, при которых наиболее часто встречается полиплоидия. Геном современных гибридов сахарного тростника включает субгеномы двух прародителей - *Saccharum officinarum* и *S. spontaneum* с некоторыми хромосомами, полученными в результате рекомбинации между этими субгеномами. Передовые технологии секвенирования ДНК и стратегии сборки генома делают геном сахарного тростника более податливым.

Для оценки генетической структуры растений по клонам растений, полученным *in vitro*, можно использовать множество стратегий, включая цитогенетический анализ и маркеры изоферментов и различные молекулярные маркеры ДНК, но большинство из них имеют ограничения. В анализах соматоклонального и генетического разнообразия использовались различные молекулярные маркеры, включая полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (RFLP), случайно амплифицированную полиморфную ДНК (RAPD), полиморфизм длины амплифицированных фрагментов (AFLP), между повторы последовательностей (ISSR) и простые повторы последовательностей (SSR) [125, 157]. Скорость этих изменений различается не только в зависимости от условий культивирования тканей, но и у разных видов и даже у сортов одного и того же вида [122]. Цитоплазматические генетические изменения также были обнаружены с помощью соматоклональной вариации. Наиболее подробный эксперимент в этом отношении был проведен [104], оценивая растения по двум цитоплазматическим признакам.

Потенциал соматоклональной изменчивости для генетического улучшения признаков, имеющих сельскохозяйственное значение, впервые был продемонстрирован у *Saccharum officinarum* при отборе *in vitro* коммерческого сорта, устойчивого к болезни Фиджи [110]. Были вариации в морфологии, цитогенетике и изоферментных признаках. В литературных источниках сообщается, что некоторые соматоклоны-растения-регенеранты,

устойчивые к вирусу, ложной мучнистой росе и вирусу мозаики сахарного тростника [128, 110]. Сомаклоны растений также были получены методом культивирования тканей. Хан и соавт. [124] сообщили, что процент по шкале Брикса у соматклонов — растения-регенеранты, устойчивые оказался меньше, чем у их потомков, полученных после самоопыления. Соматклоны были лучше по побегам растения, высоте стебля, количеству узлов/стеблю и ширине корневой полосы. Очевидно, соматклональная изменчивость очень распространена в сахарном тростнике и картофеле и влияет на многие важные признаки, которые можно использовать для улучшения некоторых сортов.

Соматклональная изменчивость установлена у растений картофеля, регенерированных из протопластов широко распространенного сорта «Russet Burbank» [81]. Статистически значимые и стабильные изменения были обнаружены для нескольких морфологических признаков, таких как рост клубней, срок созревания, однородность и цвет клубней (от начала отмирания ботвы до физического созревания клубней). Некоторые из соматклонов также обладают устойчивости, *Alternaria solani* часто называют "картофельным фитофторозом". Эти соматклоны были стабильны в течение ряда вегетативных поколений. Соматклональная изменчивость использовалась для отбора каллусов картофеля с желательными признаками, такими как солеустойчивость и устойчивость к засухе [93]. Недавно Хатаб и Антар [125] использовали УФ-С излучение для индуцированной соматклональной вариации в каллусе сорта картофеля Косима и ее обнаружения с помощью RAPD-PCR Росенберг и др., [147] исследовали влияние термотерапии на клоны нового сорта картофеля Риит, которые различались по урожайности, количеству и массе клубней, устойчивости к фитофторозу и морфологическим характеристикам. Таким образом, соматклональная вариация уже давно используется для улучшения сортов картофеля.

Как инициация культивирования, так и последующая субкультура подвергают экспланты окислительному стрессу [127], что может привести к мутациям [95, 44, 45]. Кажется очевидным, что «экстремальные» процедуры,

такие как культивирование протопластов, а также формирование каллуса, вызывают стресс [157]. Величина этого стресса зависит от метода культуры ткани.

Исследования указывают на большую изменчивость хромосом в фазе каллуса, чем в адвентивных побегах [149], что указывает на потерю компетентности в более серьезно нарушенных геномах. Это можно объяснить различной степенью нарушения, с которым сталкиваются клетки.

В первом случае клетки следуют схеме деления, которая является нормальной для развивающегося растения. С другой стороны, формирование каллуса подразумевает фазу дедифференцировки, за которой следует неконтролируемое деление клеток [71, 72, 73, 74, 163]. Некоторые типы тканевых культур в некоторых аспектах имитируют другие стрессовые ситуации, такие как, например, подготовка протопластов, в которых деградация клеточной стенки напоминает инфекционный процесс некоторых патогенов. Таким образом, тип и величина стресса, воздействующего на культивируемые клетки, варьируется в зависимости от используемого метода. В отличие от распространенного мнения о том, что рост неорганизованного каллуса необходим для индукции генетической изменчивости, изменчивость может быть замечена у растений, случайно регенерированных из эксплантов [97].

Соматональная изменчивость широко распространена и обнаруживается не только у культур, размножающихся вегетативным путем, но и у размножаемых семенами и самоопыляющихся видов (Рисунок 1.1).

Возможные причины соматональной изменчивости включают ранее существовавшие различия в соматических клетках эксплантатов и клетках, полученных в культуре. Развитие метода культивируемой растительной клетки и молекулярного манипулирования с генетическим материалом позволит выявить и охарактеризовать специфические генетические механизмы. Одной из целей соматональных вариаций является получение соматоклонов, которые служат исходным материалом для селекции растений.



Рисунок 1.1. Механизм соматоклональной изменчивости в микроразмножаемых растениях в результате окислительного стресса в культуре *in vitro*

Соматоклональная вариация может сыграть более важную роль в качестве дополнения к современным методам селекции растений, если окажется, что она отличается от вариации, которую можно получить с помощью существующих методов. Метод получения регенеранта сахарного тростника, кукурузы, подорожника и картофеля из каллусных культур. Растения демонстрировали вариации на фенотипическом, цитологическом и молекулярном уровнях, и эта

оценка растений тканевых культур, проведенная в течение трех лет подряд, исключила вероятность возникновения вариаций из-за среды. Механизмы, ответственные за генетические изменения в культуре, и факторы, которые на них влияют, должны позволить лучше контролировать соматическую изменчивость: либо уменьшать ее, либо направлять ее определенным образом, в зависимости от требований из системы регенерации.

Соматическая изменчивость является важным свойством культуры тканей сельскохозяйственных растений. Это может привести к получению растений-регенерантов с новыми признаками, такими как низкие скорости роста, морфология, измененная пигментация и снижение урожайности. Однако соматическая изменчивость также может привести к получению растений с желаемыми признаками, такими как устойчивость к болезням, улучшенное качество и повышенная урожайность.

Таким образом анализ литературных данных указывает, что культивирование способ в условиях *in vitro* является основным для создания новых адаптивных форм растений и их анализ позволяет по-новому оценить их про-и антиоксидантные способности в изменяющихся условиях жизни.

1.4. Активные формы кислорода и устойчивость растений в условиях стресса

Активные формы кислорода (АФК) продуцируются как нормальный продукт клеточного метаболизма растений. Различные экологические стрессы приводят к избыточной выработке АФК, вызывая прогрессирующее окислительное повреждение, что в конечном итоге приводит к гибели клеток растений.

АФК являются побочным продуктом аэробного метаболизма в различных клеточных органеллах, таких как хлоропласты, митохондрии, пероксисомы, плазматические мембраны и клеточная стенка (Рисунок 1. 2) [126, 108]. Конкретная генерация АФК в клетке сильно локализована, и в этот процесс интенсивно вовлечены различные пути [118].

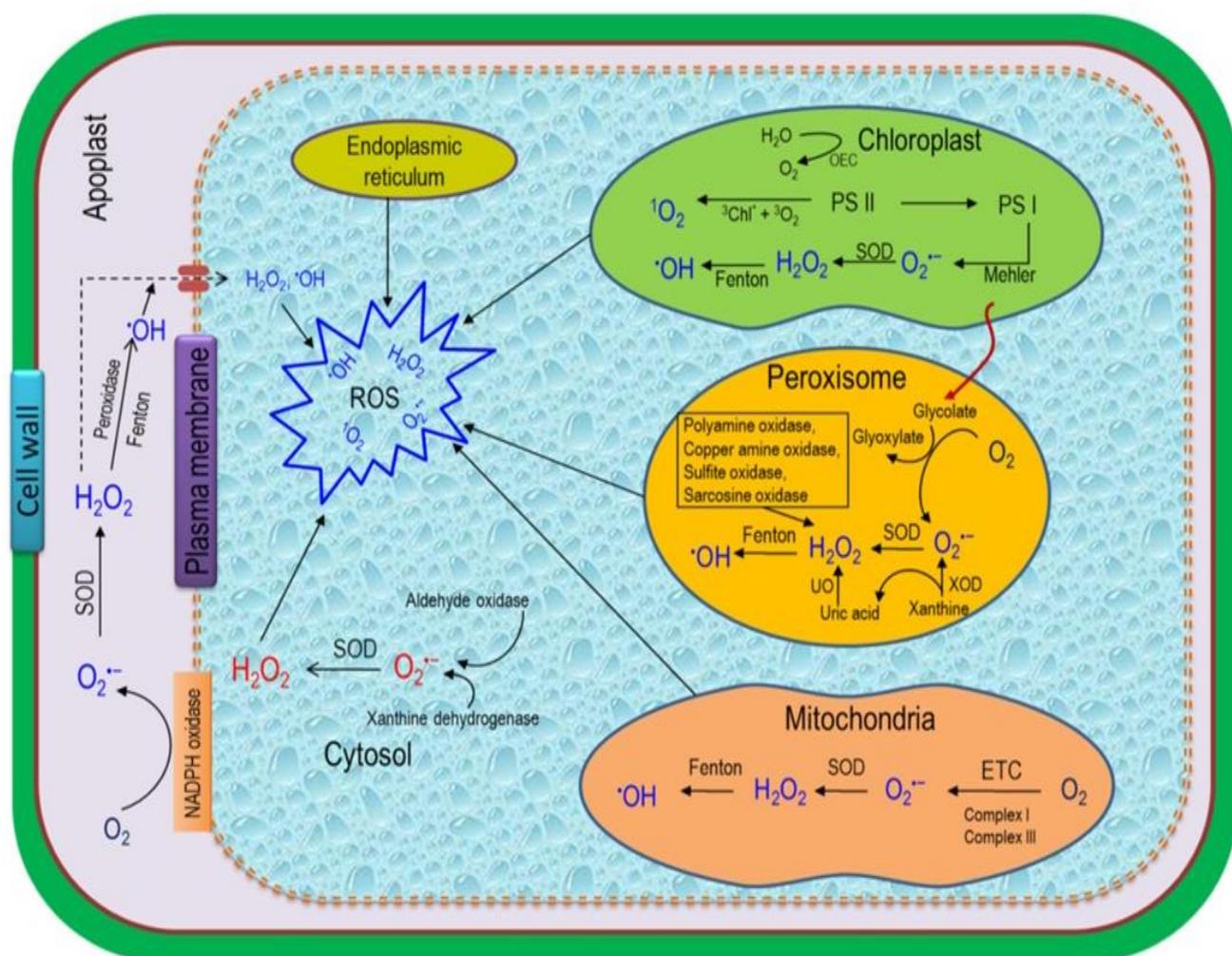


Рисунок 1.2. по Hasanuzzaman и др., [109]. Процесс генерации и локализация АФК в клетках растений. В различных клеточных органеллах АФК образуются в результате метаболических реакций, в которых задействованы разные ферментативные и неферментативные пути. АФК - активные формы кислорода; H_2O_2 - перекись водорода; 1O_2 - синглетный кислород; ETC - электронно-транспортная цепь; $\bullet OH$ - гидроксильный радикал; $^3Chl^*$ - тройной хлорофилл; PS I - фотосистема I; PS II - фотосистема II; $O_2^{\bullet-}$ - супероксид-анион; XOD - ксантиноксидаза; СОД - супероксиддисмутаза; НАДФН - никотинамидадениндинуклеотидфосфат; UO — уратоксидаза [109].

Формирование клеточной стенки растений ускоряется в стрессовых условиях. Активные формы кислорода (АФК) вместе с пероксидазой запускают полимеризацию гликопротеинов и фенольных соединений [170]. Эта

связанная с клеточной стенкой пероксидаза катализирует H_2O_2 в присутствии НАДФ и с участием НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы. Кроме того, диаминооксидазы восстанавливают диамины или полиамиды до хинина. Таким образом, ферментные системы продуцируют АФК в клеточной стенке растений [154].

Механизмы нейтрализации АФК можно разделить на два типа: ферментативные и неферментативные системы антиоксидантной защиты, которые работают синергически и интерактивно для нейтрализации свободных радикалов (Таблица 1. 1).

Экологические стрессы, такие как засоленность, засуха, радиация, температура, патогены и т.д., являются основными факторами, ограничивающими рост, развитие и продуктивность растений.

Следствием образования АФК в растениях является потеря продуктивности сельского хозяйства из-за нарушения функционирования метаболизма растений. АФК образуются в результате утечки электронов в ходе общих метаболических процессов и приводят к окислительной модификации нуклеиновых кислот, липидов и белков. С другой стороны, клетки могут задействовать несколько противодействующих механизмов, включающих ферментативные и неферментативные системы антиоксидантной защиты, для борьбы с разрушительным действием АФК.

Некоторые органеллы растительных клеток, такие как хлоропласты, митохондрии, пероксисомы и глиоксисомы, имеют системы антиоксидантной защиты от АФК. Таким образом, растения обладают способностью поглощать или снижать уровень АФК и, следовательно, переносить суровые стрессовые условия окружающей среды.

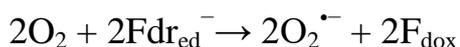
Таблица 1.1. Список всех ферментативных и неферментативных антиоксидантов с указанием их функций и клеточной локализации.

Ферментативные антиоксиданты	Код фермента	Реакция катализируется	Субклеточные локализации
Супероксиддисмутаза (СОД)	1.15.1.1	$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$	Пероксисомы, Митохондрии, Цитозоль и Хлоропласты
Каталаза (КАТ)	1.11.1.6	$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$	Пероксисома и митохондрии
Аскорбатпероксидаза (АПО)	1.11.1.11	$H_2O_2 + AA \rightarrow 2H_2O + DHA$	Пероксисомы, митохондрии, цитозоль и хлоропласты
Монодегидроаскорбатредуктаза (МДГАР)	1.6.5.4	$2МДГА + NADH \rightarrow 2AA + NAD$	Митохондрии, цитоплазма и хлоропласты
Дегидроаскорбатредуктаза (ДГАР)	1.8.5.1	$ДГА + 2GSH \rightarrow AA + GSSG$	Митохондрии, цитоплазма и хлоропласты
Глутатионредуктаза (ГР)	1.6.4.2	$GSSG + NADPH \rightarrow 2GSH + NADP^+$	Митохондрии, цитоплазма и хлоропласты
Гваяколпероксидаза (ГвП)	1.11.1.7	$H_2O_2 + ДГА \rightarrow 2H_2O + GSSG$	Митохондрии, цитоплазма, хлоропласты и ЭР.

Продолжение таблицы 1.1.

Неферментативные антиоксиданты	Функция	Субклеточные локализации
Аскорбиновая кислота (АК)	Выводит токсины H_2O_2 за счет действия АРХ	Цитозоль, Митохондрии, Пероксисома, Вакуоль и апопласт
Глютатион восстановленный (GSH)	Действует как детоксифицирующий ко-субстрат для таких ферментов, как пероксидазы, ГР и ГСТ	Цитозоль, Митохондрии, Пероксисома, Вакуоль и апопласт
α-Токоферол	Защищает и детоксифицирует продукты мембраны РЦ	Преимущественно в мембранах
Каротиноиды	Поглощают энергию фотосистем и передающие ее в реакционные центры (РЦ)	Хлоропласты и другие не зелёные пластиды
Флавоноиды	Прямые поглотители H_2O_2 , 1O_2 и OH^\bullet	Вакуоль
Пролин	Эффективный поглотитель OH^\bullet и 1O_2 и предотвращение ущерба из-за РЦ	Митохондрии, цитозоль и хлоропласты

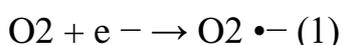
Хлоропласты считаются основным местом образования АФК, которое зависит от взаимодействия хлорофилла (хл) и света [92]. В условиях стресса устьичная проводимость и скорость ассимиляции CO_2 значительно снижаются и, таким образом, образуется возбужденный триплетный хлорофилл (3Chl^*), который препятствует фотосинтетическому транспорту электронов и способствует избыточной генерации АФК [57, 152, 156]. В нормальных условиях поток электронов от возбужденных центров ФС направлен к НАДФ, который восстанавливается до НАДФН, который затем входит в цикл Кальвина и восстанавливает конечный акцептор электронов CO_2 . При перегрузке электрон - транспортной цепи из-за снижения поступления НАДФ в результате стрессовых условий происходит утечка электронов от ферредоксина к O_2 , восстанавливающая его до $\text{O}_2^{\bullet -}$ [46, 47]. Этот процесс называется реакцией Мелера:

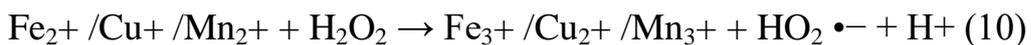
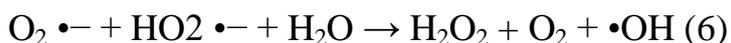
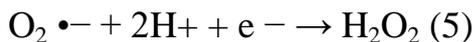


Утечка электронов к O_2 может также происходить из кластеров $2\text{Fe}-2\text{S}$ и $4\text{Fe}-4\text{S}$ в электрон - транспортной цепи ФС I. В ФС II акцепторная сторона электрон - транспортной цепи содержит QA и QB. Утечка электрона с этого места на O_2 способствует образованию $\text{O}_2^{\bullet -}$ [48].

В не зелёных частях растений митохондрии являются основным местом генерации АФК [109]. АФК, продуцируемые в митохондриях, снижают перенос митохондриальной энергии и другие субклеточные функции. Респираторные комплексы I и III являются основными источниками митохондриальных АФК, особенно O_2 - Однако образующийся $\text{O}_2^{\bullet -}$ - в обоих комплексах из-за утечки электронов в конечном итоге катализируется Mn-СОД и Cu-Zn-СОД и производит H_2O_2 [112, 156].

Некоторые реакции образования и превращения АФК в биологической системе:





Еще одним важным местом для образования активных форм кислорода являются пероксисомы, где ряд оксидаз катализирует различные реакции и генерирует H_2O_2 и $\text{O}_2 \bullet^-$ в качестве побочных продуктов. Считается, что гликолатоксидаза является основным источником продукции АФК в пероксисомах [123]. Гликолатоксидаза в пероксисомах вызывает закрытие устьиц; в результате скорость обмена устьичного газа значительно снижается и, таким образом, сокращается количество CO_2 для образования RuBisCO (Рбулоз-1,5- бифосфаткарбоксилаза/ оксигеназа CO_2), вызывая фотодыхание и производство H_2O_2 [101]. Кроме того, активность ксантиноксидазы может также генерировать $\text{O}_2 \bullet^-$ и мочевую кислоту в пероксисомном матриксе, которые далее дисмутируются до H_2O_2 металлоферментами СОД и уратоксидазой соответственно [146, 90]. Во время фотодыхания на окисление гликолата гликолатоксидазой в пероксисомах приходится большая часть образования H_2O_2 [54, 55]. Подобно митохондриям и хлоропластам, пероксисомы также продуцируют $\text{O}_2 \bullet^-$ вследствие их нормального метаболизма.

Цитохром Р450 является частью цепи переноса электронов, обнаруженной в эндоплазматическом ретикулуме (ER), его каталитическая функция требует взаимодействия с НАДФН-цитохром Р450 редуктазой (CPR) [8]. Электронно-транспортная цепь этих Р450:



Было идентифицировано несколько CYP116 Р450, которые обладают широким спектром субстратов и катализируют множество реакций.

Оксидоредуктазы, переносящие электроны, повсеместно распространены на плазматических мембранах и приводят к образованию АФК на плазматической мембране.

Клеточные стенки также считаются активными центрами продукции АФК. Показана роль пероксидазы, ассоциированной с клеточной стенкой, в образовании H_2O_2 . В хрене (*Armoracia rusticana*) пероксидаза, связанная с изолированными клеточными стенками, катализирует образование H_2O_2 в присутствии НАДН.

По сравнению с другими клеточными компартментами, скорость продукции активных форм кислорода (ROS) сравнительно ниже в цитозоле, где окислительное-восстановительный баланс в значительной степени поддерживается цитоплазматическим НАДФН в качестве центрального компонента. Однако, помимо продукции АФК, цитозоль играет ключевую роль в окислительно-восстановительном процессе передачи сигналов в растительных клетках. В общем, передача сигналов АФК от различных клеточных органелл проходит через цитоплазму, чтобы модулировать экспрессию генов в ядре клетки [164].

Растения обладают сложной системой антиоксидантной защиты, состоящей из неферментативных и ферментативных компонентов для удаления АФК.

Ферментативные компоненты системы антиоксидантной защиты состоят из нескольких антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ), гваяколпероксидаза (ГВП), ферменты аскорбатглутатионового (АГТ) цикла, аскорбатпероксидаза, (АПО), монодегидроаскорбатредуктаза (МДГАР) дегидроаскорбатредуктаза и глутатионредуктаз [18]. Эти ферменты действуют в разных субклеточных компартментах и согласованно реагируют, когда клетки подвергаются окислительному стрессу.

Супероксиддисмутаза (СОД, 1.15.1.1) - это группа металлоферментов, катализирующих реакцию дисмутации (или разделения) супероксидных

анион (O_2^-) радикалов на обычный молекулярный кислород (O_2) и перекись водорода (H_2O_2). Супероксиддисмутаза - это фермент, который содержит группы ионов металлов: марганец, железо, медь или цинк [85]. У растений самая высокая концентрация активности СОД локализована в основном в хлоропластах и обычно связана с мембранами. Cu/Zn СОД, основная форма СОД, также может быть обнаружена в цитозоле. Действие СОД очень важно для борьбы с окислительным стрессом в различных условиях абиотического стресса.

Сорго (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), является важной засухоустойчивой культурой и является хорошей моделью для оценки механизмов устойчивости к водному стрессу. У сортов *Sorghum bicolor* (L.) активность СОД и каталазы повышается при абиотическом стрессе [117].

Также было показано, что повышенные уровни СОД играют роль в устойчивости проростков *Zea mays* к холодному стрессу в сочетании с повышенными уровнями аскорбатпероксидазы [99]. Таким образом, известно, что активность СОД играет важную роль в защите тканей от окислительного стресса и стресса окружающей среды, и мониторинг уровней активности СОД [83] в тканях даст представление о способности тканей удалять опасный супероксид анион радикал O_2^- из клеток.

Каталаза (КАТ, 1.11.1.6) является антиоксидантным ферментом, присутствующим во всех аэробных организмах. Известно, что он катализирует расщепление H_2O_2 до воды и кислорода энергоэффективным образом в клетках, подверженных воздействию окружающей среды. Каталаза находится во всех основных местах образования H_2O_2 в клеточной среде (таких как пероксисомы, митохондрии, цитозоль и хлоропласт) высших растений. Изоферменты каталазы КАТ-1, КАТ-2, КАТ-3 кодируются структурными генами *Kat1*, *Kat2* и *Kat3* соответственно.

Присутствие множественных изоферментов каталазы предполагает структурную и функциональную универсальность каталаз у различных видов растений. ДНК различных каталаз была выделена и охарактеризована из

разных видов растений, чтобы изучить гены и их регуляторные компоненты [150] (Рисунок 1.3.).

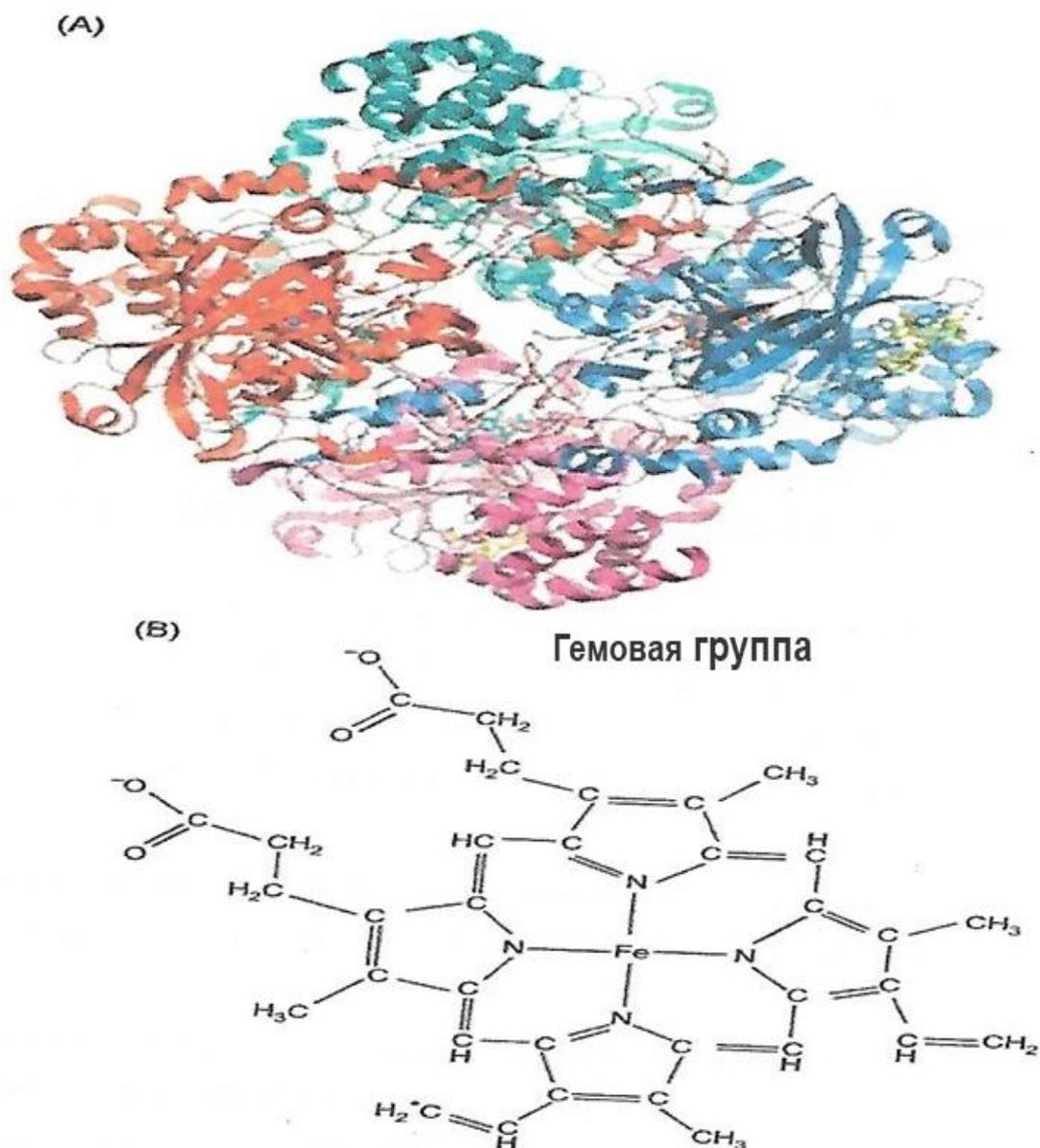


Рисунок 1. 3. (А) Трехмерная структура каталазы (изображение PDB на основе 1dgb). (В) Одна гемовая группа каталазы.

Гваяколпероксидаза (ГВП, ЕС 1.11.1.7), белок, содержащий гем, предпочтительно окисляет ароматический донор электронов, такой как гваякол и пирагаллол, за счет H_2O_2 . Он широко встречается у животных, растений и микробов. Эти ферменты имеют четыре консервативных дисульфидных мостика и содержат два структурных иона Ca^{2+} [78]. Многие

изоферменты ГВП в клетках растений локализованы в вакуолях, клеточной стенке и цитозоле [80].

Таким образом, устойчивость растений и адаптивность к внешним факторам среды определяются функционированием про- и антиоксидантной системы. Одним из механизмов гомеостаза внутриклеточного метаболизма является перекисное окисление липидов (ПОЛ), индуцированное накоплением АФК [134, 86, 15, 33, 34]. Нарушение баланса в сторону прооксидантов выражается в недостаточности антиоксидантной защиты и избыточной продукции АФК.

1.5. Кислородные радикалы и перекисное окисление липидов

Все аэробные организмы зависят от кислорода и окислительно - восстановительных реакций цепи переноса отдельных электронов в митохондриях. Они участвуют во многих важных жизненных процессах, включая клеточное дыхание, фотосинтез, метаболизм липидов и клеточную передачу сигналов [148]. Тот факт, что растения не могут избежать стрессов окружающей среды, при которых растение растет в неоптимальном или плохом состоянии, негативно влияет на рост растений и продуктивность сельскохозяйственных культур. Растения в различных стрессовых условиях имеют самые разные приспособления для выживания. Таким образом, при стрессах растения интегрировали широкий спектр сигналов окружающей среды в пути своего развития [150]. Таким образом, в окружающей среде, существует ряд проблем для всех аэробных организмов, которые в ней живут, и одной из самых серьезных проблем является окислительный стресс. Существует несколько механизмов, с помощью которых может возникать окислительный стресс, приводящий к повреждению клеток. Одним из ключевых механизмов является выработка АФК митохондриями во время клеточного дыхания. При нормальных условиях антиоксидантная система защиты организма может нейтрализовать эти АФК. Однако, когда выработка АФК превышает способность организма к их детоксикации, возникает окислительный стресс [82, 150]. Во всех живых клетках организма имеются

ферменты (такие как супероксиддисмутаза, каталаза и пероксидаза), ферментативные соединения (такие как глутатион, аскорбиновая кислота, токоферолы, каротиноиды и т.п), а также витамины Е, С и А, которые осуществляют защиту организма (клеток, тканей). Взаимоотношения между многими из этих антиоксидантов представлены на рисунке 1. 4.

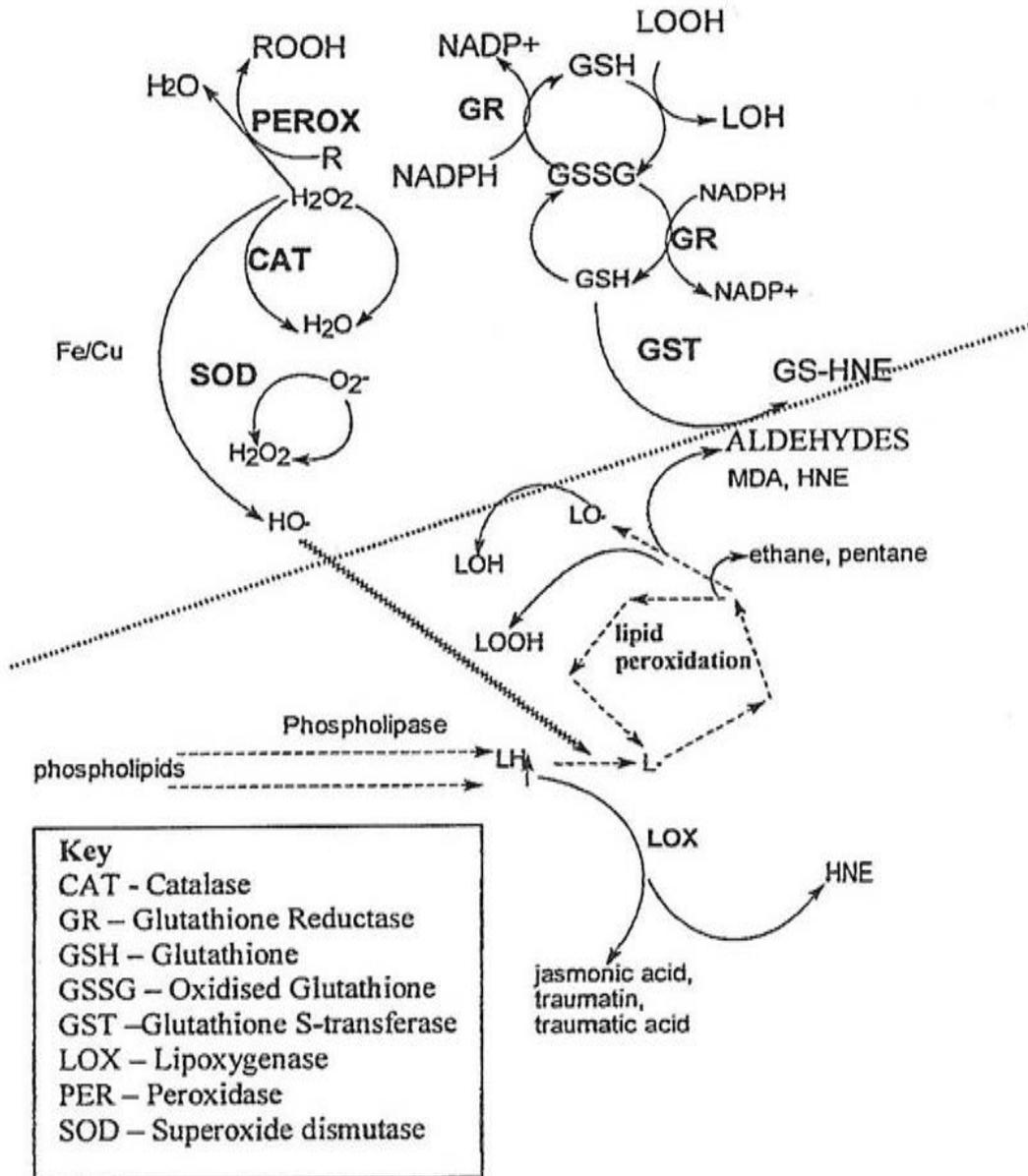


Рисунок 1.4. Взаимосвязь между активными формами кислорода, антиоксидантами и перекисным окислением липидов в растительных клетках [172]

Окислительный стресс вызывается свободными радикалами, активными формами кислорода (АФК), которые повреждают ДНК, липиды биомембран, белки и другие макромолекулы [172, 169].

Гидроксильный радикал ($\cdot\text{OH}$) является одним из самых мощных окислителей, способным повреждать практически любую органическую молекулу, включая углеводы, липиды, белки, ДНК и аминокислоты (например, превращение фенилаланина в м-тирозин и о-тирозин) [150]. Одной важной группой этих вторичных продуктов являются гидроксиалкены, и 4-гидроксиноненал (4-HNE) является одним из основных важных продуктов окисления липидов и перекисного окисления [89, 172].

Перекись водорода (H_2O_2), как основной вид активных форм кислорода, широко генерируется во многих биологических системах и является конечным продуктом метаболических реакций. Он считается важной сигнальной молекулой, которая опосредует различные физиологические и биохимические процессы в растениях. Нормальный метаболизм в клетках растений приводит к образованию перекиси водорода H_2O_2 из различных источников. H_2O_2 является основным продуктом фотодыхания и образуется при экологических стрессах в хлоропластах растений, при окислении гликолата гликолатоксидазой в пероксисомах, где H_2O_2 затем разлагается каталазой. H_2O_2 накапливается при стрессовых воздействиях, таких как ультрафиолетовое излучение, низкие температуры и тепловой шок [99]. H_2O_2 также образуется при дисмутации $\text{O}_2\cdot^-$ супероксиддисмутазой.

В нормальных условиях в этих реакциях образуется перекись водорода, однако, окислительный стресс растений используется как защитный механизм, при котором резко повышается количество свободных радикалов [85]. Пероксид водорода расщепляется рядом различных механизмов, включая действие фермента каталазы, содержащейся в клетках. Роль каталазы состоит в расщеплении перекиси водорода на воду и кислород. Каталаза важна, потому что перекись водорода является токсичным побочным продуктом

метаболизма, который может повредить клетки и ткани, если его не удалить. Активность каталазы в тканях и органах растений может иметь существенное влияние на ткани [132]. Низкая активность каталазы может способствовать накоплению H_2O_2 и следовательно, может привести к образованию гидроксильных радикалов посредством реакции Фентона, что, в свою очередь, может привести к иницированию реакции перекисидации (перекисного окисления) липидов [132]. H_2O_2 может легко проникать через различные клеточные мембраны [82]. В отличие от других продуктов, которые имеют очень короткий период полураспада свободно-радикальных реакций.

Накопление МДА. Другим важным продуктом перекисного окисления липидов является малоновый диальдегид (МДА), который широко изучался на различных организмах, в том числе у животных [94], растений [102] и микроорганизмов [162]. МДА во многих системах является наиболее распространенным альдегидом, образующимся в результате перекисного окисления липидов, и, следовательно, его образование используется в качестве маркера перекисного окисления липидов (Рисунок 1.5) [87]. Продукция МДА была изучена в ряде растительных систем, включая стареющие листья кукурузы [113], *Prunus avium* L. [102] и *Lycopersicon esculentum* (подвергшиеся заражению патогенами) [135].

Исследования перекисного окисления липидов в культурах растительных тканей показывают, что альдегиды вырабатываются во время инициации культивирования и во время рутинного субкультивирования [85, 147]. Они также накапливаются в культурах, утративших тотипотентность-способность к регенерации [85]. Хан и Као [113] изучали пути перекисного окисления липидов и образования МДА в листьях кукурузы. Франк и др., [102] отслеживали пути перекисного окисления липидов в культуре тканей растений и нарушение функций физиологических маркеров.

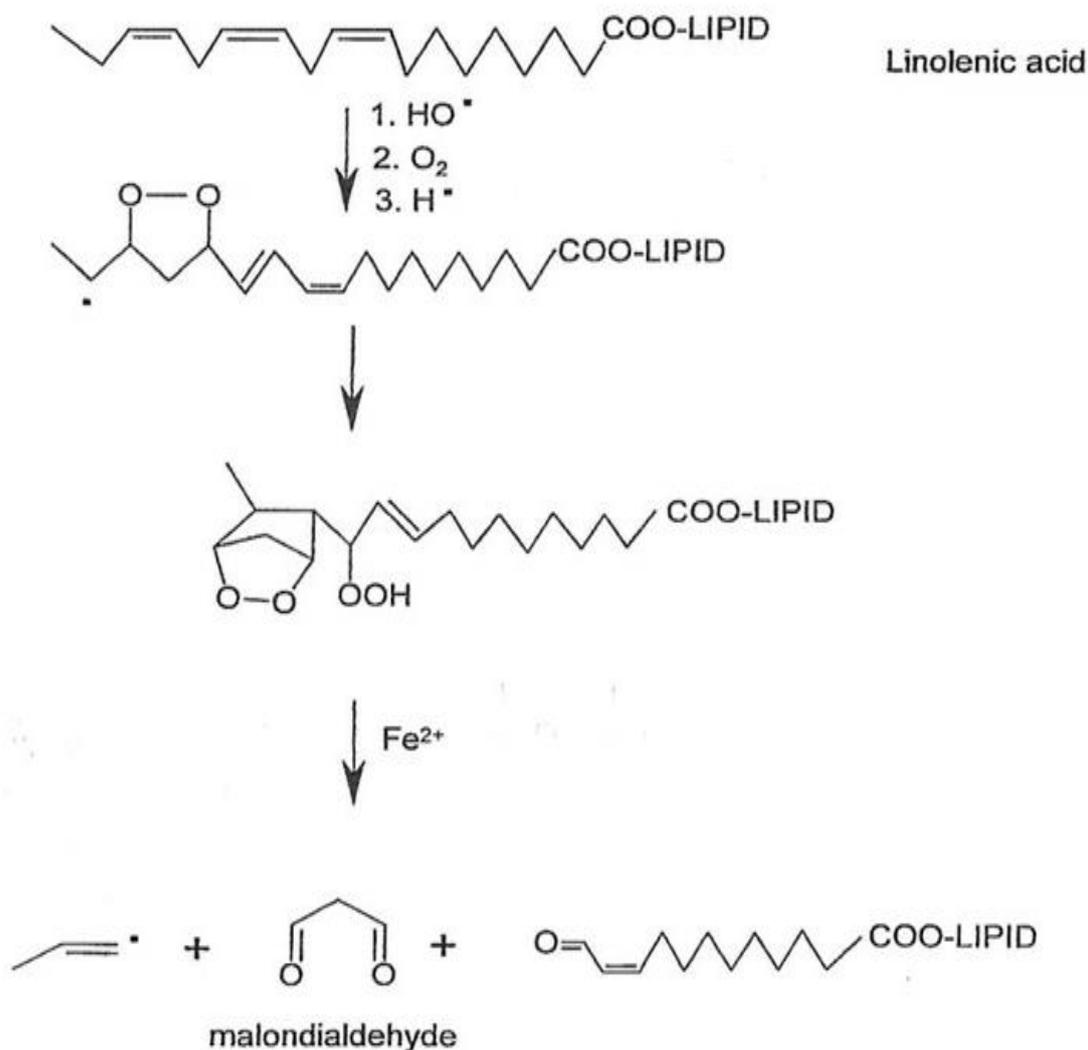


Рисунок 1.5. Образование малонового диальдегида из линоленовой кислоты [87].

Согласно Ishii, [114] злаки особенно подвержены окислительному стрессу, и этот процесс приводит к повышению уровня супероксида, т.е. окислительному стрессу. Имеются данные, свидетельствующие о том, что в культурах пшеницы и кукурузы снижение уровня окислительного стресса играет роль в адаптации растений к стрессу [91]. Повышенный уровень активности липоксигеназы и более низкая активность антиоксидантных ферментов были связаны с повышенной продукцией окислительных соединений и накоплением повреждений дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) [91]. При инициации каллуса у винограда (*Vitis vinifera* L.) наблюдались повышенные уровни флуоресцентных продуктов и веществ,

реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, которые связаны с окислительным стрессом [85, 166]. Все эти исследования указывают на возможность значительного воздействия окислительного стресса на рост и реакцию растительной клеток и ткани *in vitro*.

Механизмы антиоксидантных ферментов, связанные с индукцией активных форм кислорода, играют жизненно-важную роль в способности ткани справляться со стрессовыми условиями в культуре или вне ее. Культивирование клеток и тканей растений в условиях окислительного стресса связано с реакциями клеточной стенки растений *in vitro*. Таким образом, изучение окислительного стресса и свободно-радикальных процессов становится все более важным в культуре тканей и прикладной биологии растений [150]. Фитопатологическое и опосредованное окружающей средой повреждение свободными радикалами может привести к серьезному снижению реакции растений и урожайности. Исследования взаимосвязи антиоксидантных систем в клетках, культивируемых *in vitro*, растений. Окислительный стресс вызывается различных стрессовых состояний у растений.

Метод добавления антиоксидантов использовался для улучшения реакции некоторых видов *in vitro*. У некоторых видов микроорганизмов или грибов с добавлением антиоксидантов в питательной среде повышали толерантность к кислороду и, следовательно, для манипулирования и улучшения хозяйственных культур *in vitro* [94]. По мере расширения исследований по изучению перекисного окисления липидов в системах культур тканей растений добавление антиоксидантов или связанных с ними соединений может способствовать повышению жизнеспособности, о чем свидетельствует добавление антиоксидантов к клеткам риса во время выделения протопластов [114]. Усиление органогенеза табачного каллуса достигалось добавлением аскорбиновой кислоты [120].

В работе Караев и др. [32] показано, что добавление в питательную среду регуляторов роста растений ауксина и цитокинина заметно усилило

морфологические параметры растений в культуре *in vitro* и существенно повышалась активность антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза, аскорбатпероксидаза и др. Эти исследования показывают, что использование антиоксидантов при культивированиях может способствовать познанию роли окислительных стрессов, что играет важную роль в способности клетки реагировать в культуре *in vitro* и *ex vitro*.

Для Таджикистана с его резко- континентальными экологическими зонами наиболее подвержена риску зона земледелия. В этом плане биотехнологические подходы могут играть важную роль в получении высоких урожаев путем создания пластичных культурных растений (зерновые, масличные, картофель и др.) в условиях возрастающего статуса абиогенного стресса, основанные на клеточном и генно-инженерном принципах [35, 20]. Одно из глобальных решений продовольственной безопасности в будущем связывают с развитием и использованием фундаментальных наук, таких как молекулярная и генетическая биология, биохимия, физиология, в совокупности составляющие современную биотехнологию. Приоритетом является создание стресса- устойчивых, высокопродуктивных с высоким качеством продукции и устойчивых к вирусным и другим биотическим факторам сельскохозяйственных культур. Особенно актуальной становится роль этих направлений в условиях климатического синдрома, давление которого мы будем ощущать в ближайшие 15-20 лет.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА II. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Картофель относится к семейству паслёновых (*Solanaceae*), роду *Solanum*. Большинство европейских сортов относится к виду *Solanum tuberosum* L.. Учитывая тот факт, что в настоящее время одним из подходов в изучении механизмов адаптации растений к действию абиотических стрессоров, таких как засоление, засуха и действие высокой температуры, является использование в качестве объектов контрастных по устойчивости модельных или трансгенных растений с измененной экспрессией генов, кодирующих антиоксидантные ферменты и ферменты биосинтеза и катаболизма низкомолекулярных антиоксидантов, нами были использованы контрастные по устойчивости генотипы картофеля в условиях *in vivo* и *ex vitro*.

Объектами исследований служили пробирочные растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.), полученные из Международного Центра Картофеля CIP (Перу, Лима). В схему опытов были включены клон-гибриды, отобранные нами путем скрининга в культуре *in vitro* на устойчивость к воздействию стрессоров (засуха).

Оздоровленные растения-регенеранты картофеля *in vitro* получили из столоновых культур [139]. Регенеранты культивировали на агарозированной питательной среде Мурасиге-Скуга (МС), содержащей макро- и микроэлементы, витамины и фитогормоны, и культивировали на протяжении 25-30 суток при интенсивности света 2400 люкс, 16 часовом фотопериоде и температуре 23⁰С. Первую группу растений-регенерантов, достигших высоты 7-8 см, использовали для анализа фотосинтетических пигментов (*in vitro*). У второй группы растений-регенерантов отмывали корни от агаризованной среды и перенесли их в разбавленную в три раза водно-солевую среду МС, содержащую макро- и микроэлементы, и выращивали на протяжении от 3-х

до 12 суток в условиях *ex vitro*. Для создания водного дефицита регенеранты переносили в среду, содержащую ПЭГ-6000 (6%).

2.2 Условия культивирования растений *in vitro*

Картофель. Для работы использовали меристемы растения картофеля из коллекции лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии Института ботаники, физиологии и генетики растений НАНТ. Растения-регенеранты выращивали в среде МС [139] согласно таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Состав среды МС для культивирования картофеля

Компоненты	Количество, г/л	Компоненты	Количество, г/л
Макросоли:		Хелат-железа:	
NH_4NO_3	1.65	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.745
KNO_3	1.900	$\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.557
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.370	Хлорид кальция:	
KH_2PO_4	0.170	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.440
Микросоль 1		Витамины:	
H_2BO_3	62	Тиамин В1	10
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	86	Придоксин В6-	5
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	223	Никотин к-таРР-	5
Микросоль 2		Аскорбин к-та С	10
CuSO_4	00.25	Мезоинозит	100 мг/л
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	00.25	Глицин	2 мг/л
К	0.83	Сахароза	40
NaMoO_4	2.5	Агар-агар	7
pH 5.6-5.8			

Таблица 2.2 - Модифицированная питательная среда Мурасиге-Скуга для клубнеобразования у картофеля

Компоненты питательной среды	
Маточный раствор макросолей	50 мл/л
Маточный раствор микросолей	1 мл/л
Fe-хелат	5 мл/л
CaCl ₂	50 мл/л
Тиамин-HCl	1 мг/л
Пиридоксин-HCl	0.5 мг/л
Никотиновая кислота	0.5 мг/л
Аскорбиновая кислота	1 мг/л
Кинетин	0.5 мг/л
Сахароза	50 г/л
Агар-агар	7 г/л
pH 5.8-6.0	

2.3. Определение водного дефицита в листьях картофеля

Для определения водного дефицита из растений-регенерантов брали навески (0,3-0,5 г) и немедленно опускали в стакан - содержащий 40-50 мл дистиллированной воды при температуре 20⁰С. Для полного насыщения диски выдерживали в течение 4 ч. Затем диски промокали фильтровальной бумагой для удаления капель воды и взвешивали. Водный дефицит вычисляли по формуле [17]:

$$X = \frac{100(B - A)}{B}$$

где:

X - водный дефицит листа (растений) в % к весу после насыщения водой;

A - вес пробы до насыщения водой (г)

B - вес пробы после насыщения водой (г).

2.4 Определение содержания активной формы кислорода

Скорость образования АФК определяли по методике, приведённой в [70] с использованием в качестве донора электронов адреналина. Для анализа брали 100-150 мг листьев картофеля из пробирочных растений регенерантов и гомогенизировали в 3 мл холодный H_2O , центрифугировали 20 мин при 12.000 об/мин затем по 1 мл супернатанта переносим в две пробирки. В одну из них добавляем -100 мкл (5,6 мМ) адреналина (конечная концентрация 0,18 мМ) в другую 100 мкл H_2O (контроль). Реакционную смесь инкубировали 30 мин и освещали дневным светом (лампы дневного света). Скорость генерации O_2^- рассчитывали по формуле $E_{480} (k) / t$ (t- время инкубации, мин.) и выражали в отн. ед./мин. Скорость генерации $O_2^{\cdot -}$ -рассчитывали по формуле:

$$\Delta D \text{ опыт} \Delta D \text{ контроль} / t = \text{оп единица}$$

$$\Delta D \text{ оптическую контроль опыт} - \text{оп контроль}$$

$$t - \text{время инкубация мин}$$

ОП единицы – 1отн. Ед = 10^3 он единицы / мин = 0,010 оптический плотности при 480нм.

2.5. Определение активности гваяколпероксидазы

Активность гваяколпероксидазы определяли согласно методу [140] с некоторой модификацией [62]. 0.5 г растительного материала картофеля тщательно растирали в холодной фарфоровой ступке с небольшим количеством (1.5-2мл) 0.1 М фосфатного буфера (рН 7.0). Гомогенат центрифугировали при 15000 об/мин в течение 20 мин при $4^{\circ}C$. Супернатант переносили в чистую пробирку и помещали в сосуд со льдом, используя в качестве ферментного препарата. Активность определяли при 20...25°C. Оптическую плотность определяли при длине волны 470 нм каждые 10 сек в течение 2-3 мин. Для расчета содержания гидропероксидов в тканях растений

использовали калибровочную кривую, построенную для различных концентраций H_2O_2 (Рисунок 2.1), и рассчитывали на мг белка.

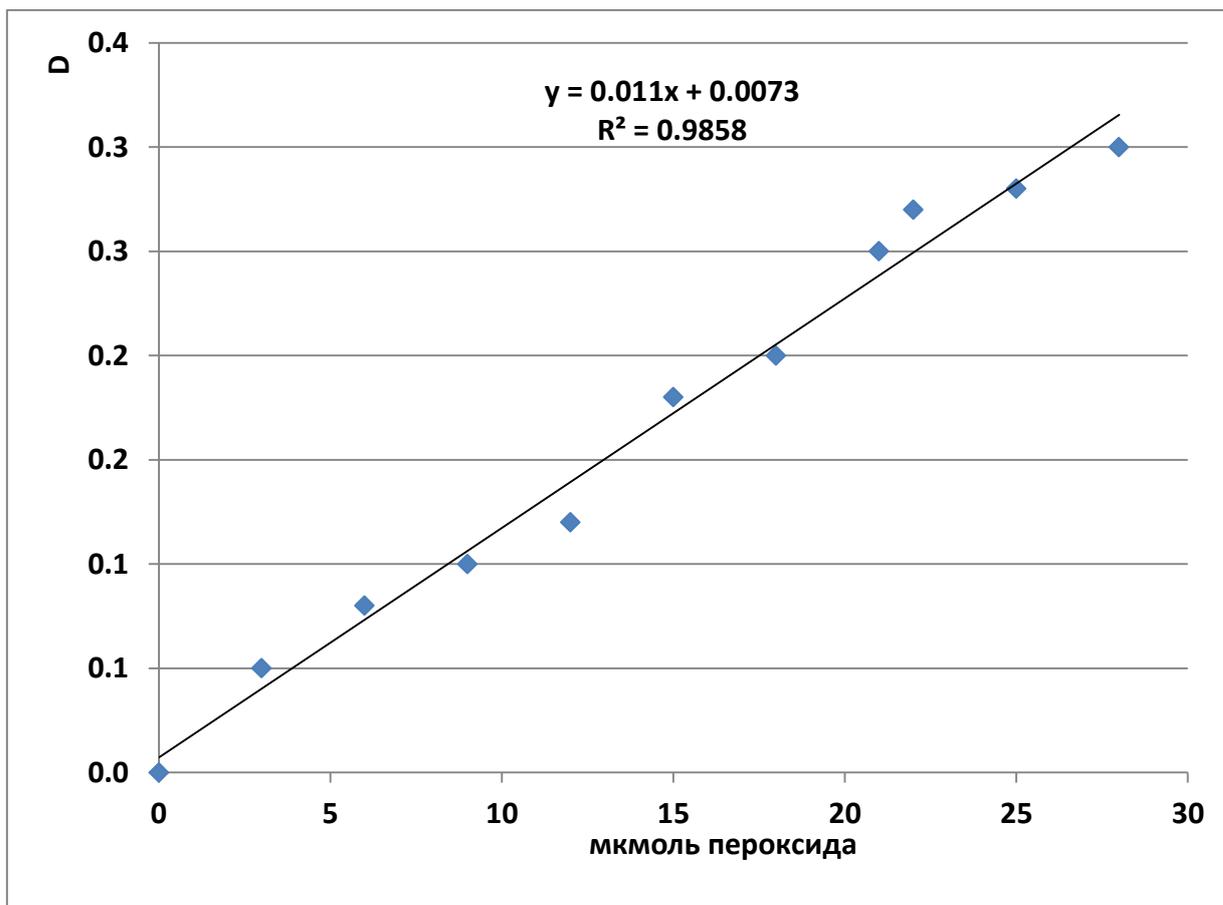


Рисунок 2.1. Калибровочная кривая для расчета содержания гидропероксидов в растениях.

Расчет активности проводили по формуле:

$$A = \frac{\Delta E \cdot V \cdot n}{m \cdot a}$$

где:

A-активность фермента,

ΔE - скорость изменения оптической плотности на линейном участке,

V-объем супернатанта,

m- сырой вес,

N-конечное разведение,

A-коэффициент молярной экстинкции гваякола $26.6mM^{-1}cm^{-1}$.

Активность выражали в мкмоль гв./г сырой массы мин.

2.6. Определение активности каталазы

Для определения активности каталазы используют спектрофотометрический метод, предложенный Эби [77], в модификации Полесская и др., [62].

Метод основан на воздействии каталазы на перекись водорода и измерении ультрафиолетового поглощения перекиси водорода .

Необходимые реактивы:

50мМ К,Na-фосфатный буфер (рН 7,8).

50мМ К,Na-фосфатный буфер (рН 7,0).

Буферы готовят из следующих сток- растворов:

0,2 МКН₂РО₄ (1,36 гКН₂РО₄ растворить и довести до 50 мл).

0,2 МNaOH (400 мг NaOH растворить довести до 50 мл).

Приготовление 50мМ К,Na-фосфатного буфера рН 7,8:

25 мл 0,2 МКН₂РО₄ и 22,25мл 0,2 МNaOH смешать и довести до 100 мл дистиллированной водой. Проверить и скорректировать рН раствора с помощью концентрированной Н₃РО₄ или 5% NaOH.

Приготовление 50мМ К,Na-фосфатного буфера рН 7,0:

25 мл 0,2 МКН₂РО₄ и 22,25мл 0,2 МNaOH смешать и довести до 100 мл дистиллированной водой. Проверить и скорректировать рН раствора.

3)экстракционный буфер (к 2 мл 50 мМ К,Na-фосфатного буфера (рН 7,8), добавить 20 мкл раствора 100 фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ)).

4) 0,6м перекись водорода (3 мл 3% перекиси водорода довести до 4,5 мл дистиллированной водой).

Навеску растений регенерантов картофеля массой 0,2- 0,3 мг тщательно растереть в холодной фарфоровой ступке в 0,5 мл экстракционного буфера. Гомогенат центрифугировать при 12 000 g в течение 5 минут при 4⁰С. Полученную смесь хранят в холодильнике при 4⁰С.

Реакционная смесь содержит:

2,95 мл 50 мМ К,Na-фосфатный буфер (рН 7,0).

30 мкл экстракта

Реакцию инициировали добавлением к реакционной смеси 20 мкл 0,6 М перекиси водорода. Определение скорости распада перекиси водорода каталазой в исследуемом образце определяли путем измерения изменения поглотительной способности смеси при длине волны 240 нм за каждую секунду в течение 100 с. Для расчета активности каталазы использовали соответствующие единицы на 1 мг белка по следующей формуле :

$$A = \frac{\Delta D \cdot V \cdot X}{T \cdot Lm}$$

где :

A – активность фермента,

ΔD -изменение оптической плотности (вычесть из оптической плотности в конце реакции оптическую плотность в начальный момент времени),

V – Общий объём полученной вытяжки, мл,

X – конечное разведение вытяжки в кювете (объем реакционной смеси разделить на количество вносимого экстракта)

t – время реакции, с,

m – масса навески, г.

Δm - отношение сухого веса к сырому

Для определения активности фермента на мг белка используют следующую формулу:

$$A = \frac{\left(\left(\frac{\Delta D}{T}\right) * X\right)}{(L * C)}$$

где:

A – активность фермента,

ΔD -изменение оптической плотности (вычесть из оптической плотности в конце реакции оптическую плотность в начальный момент времени),

V – Общий объём полученной вытяжки, мл,

X – конечное разведение вытяжки в кювете (объем реакционной смеси разделить на количество вносимого экстракта)

T-время реакции, с,

L-толщина кюветы, см,

m- масса навески, г,

Δm - отношение сухого веса к сырому.

Возможен еще один вариант расчета активности каталазы в относительных единицах, на грамм сухого веса

$$1) A = \frac{K \cdot X}{m \cdot \Delta m} \quad \text{или}$$

$$2) A = \frac{K \cdot X}{c}$$

На мл белка

где:

A-активность фермента,

$$K = (2,3/T) \cdot [\log_{10}(A_1/A_2)]$$

где:

T-время реакции, мин,

A_1 – оптическая плотность в начальный момент времени,

A_2 -оптическая плотность в конечный момент времени, разведение – отношение объема используемого образца к общему объему реакционной смеси

m – масса навески, г.

Δm - отношение сухого веса к сырому.

C- содержание белка в пробе, мг

2.7. Определение активности супероксиддисмутазы

Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по способности ингибировать фотохимические восстановления нитросинего тетразолия

(НСТ) по известному методу (Giannopolitis and Ries), [103] с некоторыми модификациями, как описано Полесской с соавторами (Полесская и др., [62].

1) 50 мМ К,Na-фосфатный буфер (рН 7,8). «Приготовление растворов. Растворы часто готовят путем разбавления более концентрированного исходного раствора. Необходимо готовить следующие сток - растворы:

0,2 М $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (1,36 г $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ растворить в дистиллированной воде, слегка нагревая на водяной бане при 50°C. Довести до 50мл дистиллированной водой);

0,2 М NaOH (400 мг NaOH растворить в дистиллированной воде, слегка нагревая на водяной бане при 50°C. Довести до 50 мг дистиллированной водой).

Приготовление 50 мМ К,Na-фосфатного буфера, рН 7,8:

25мл 0,2 М $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ и 25,22 мл 0,2 М NaOH смешать, слегка нагревая на водяной бане при 50°C. Довести до 100 мл дистиллированной водой .

рН раствора (содержащего H_2PO_4^- , смешанный с NaOH, будет зависеть от концентрации каждого компонента) .

2) экстракционный буфер (к 2 мл 50 мМ К,Na-фосфатного буфера (рН 7,8) добавить 20 мкл фенилметилсульфонилфторида(ФМСФ)).

3) 0,025% раствор рибофлавина (2,5 мг рибофлавина растворить в 10 мл кипящей дистиллированной воды).

4) 0,05% раствор п-нитросинего тетразолия(NBT) (5 мг NBT растворить в 10 мл дистиллированной воды).

5) 0,24% раствор Na-ЭДТА (24мг Na-ЭДТА растворить в 10 мл дистиллированной воды).

Точную навеску растений- регенерантов картофеля массой 0,2-0,3 мг тщательно растереть в холодной фарфоровой ступке в 300-400 мкл экстракционного буфера.

Гомогенат центрифугировать при 12 000 g в течение 5 минут при 4 С. Полученную смесь хранят в холодильнике при 4С .

Реакционная смесь содержит:

0,5 мл 0,05% раствора NBT

0,9 мл 50 мМ К,Na-фосфатного буфера (рН 7,8)

100 мкл экстракта

20 мкл 0,24% раствора Na-ЭДТА

Для каждого образца готовили две одинаковые пробирки с реакционной смесью и экстрактом. Затем одну пробирку поместить в темноту (эта пробирка будет служить темновым контролем), другую выставить на свет. Реакционные смеси состоят из двух стадий, а именно: световой и темновой реакции, по своему составу ничем не отличается!

Необходимо приготовить контрольные пробирки без ферментативной вытяжки. Для расчета максимального образования формазана. В эти пробирки вместо экстракта следует внести 100 мкл К,Na-фосфатного буфера.

Реакцию начали с добавления 20 мкл 0,025% рибофлавина во все пробирки, которые перемешивали быстро. Пробирки для определения максимального образования формазана помещают в темноту. Остальные трубки были установлены под две люминесцентные лампы (по 18 Вт).

Реакция практически закончится через 15 минут. по истечению времени реакцию следует остановить выключением света. Оптическую плотность измеряют при длине волны 560 нм.

За единицу активности СОД принимают количество фермента, необходимое для ингибирования фотодектирования синего нитротетразолия на 50%. Сначала измеряется оптическая плотность единице активности. Для получения оптическая плотность максимального образования формазана. Она делится на два реакции и принимается за 50% ингибирования или 0,5 единиц . Расчет производится по формуле :

$$a = \frac{1 - (\text{Добразца} * 0,5)}{(\text{Добразца}/2)}$$

1)

Активность СОД рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{a * V * X}{C * L} \quad 2)$$

где:

A-активность

a- относительная единица активности, см. формулу 1)

V-объем полученной вытяжки, мл,

X-конечное разведение вытяжки, в кювете,

L-толщина кюветы, мм,

C-количество белка в данной навеске, мг.

Активность СОД выражают в условных единицах на один мг белка.

Для расчета активности СОД на один грамм сухого веса в формуле (2)

C (количество белка в навеске) заменяли на

$$(m * \Delta m)$$

где m –масса сырой навески, Δm -отношение сухого веса к сырому.

Расчет активности СОД также можно производить по количественному показателю ингибирования образования формазана. Для этого используют следующую формулу:

$$\Phi = \frac{\Delta D * X}{7.2 * C * l}$$

Где:

Φ -количество образованного формазана, ммоль/мг белка,

ΔD - разность оптической плотности максимального образования формазана и оптической плотности образца,

X-разведение в кювете,

7,2 коэффициент экстинкции формазана при длине волны 560 нм, мм см,

C-содержание белка в пробе, мг,

l-длина оптического пути, см.

Измерение активности супероксиддисмутазы проводят в нескольких (не менее трех) биологических и аналогических повторностях (Рисунок 2.2.)

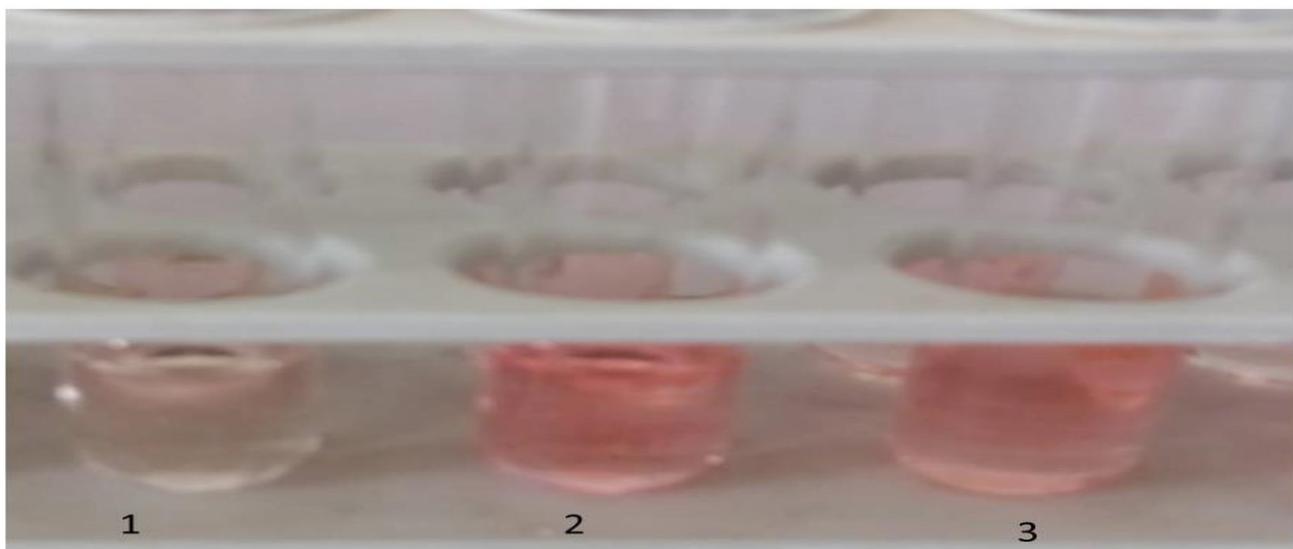


Рисунок 2.2. Измерение активности супероксиддисмутазы в образцах картофеля. 1 – контрольная проба, 2- лист, 3 – корень

2.8. Определение содержания перекиси водорода

Содержание перекиси водорода (H_2O_2) определяли по цветовой реакции с хлоридом титана ($TiCl_4$), как описано в работе [84] в модификации Полесская и др, [62]. Содержание H_2O_2 рассчитывали по калибровочной кривой для перекиси водорода в ацетоне (150-300 нм). Для анализа брали 100-150г листьев картофеля из пробирочных растений регенерантов и гомогенизировали в 1 мл холодного ацетона, центрифугировали 10 мин при 9000 об/мин, затем на 1мл супернатанта добавить 1мл 20% $TiCl_4$ + 2,5 конц HCl (общий объём 4,5мл), затем к 1мл образца добавить 0,2мл NH_4OH , осадок перекиси Т: (окрашенный р-р) – центрифугировать при 9000 об/мин 3 мин, осадок промывать холодным ацетоном 2-3 (мл ацетон) отделить центрифугирование – осадок ресуспендировать в 2 N H_2SO_4 . Оптическую плотность измеряют при длине волны 415 нм.

Построение калибровочной кривой (Рисунок 2.3).

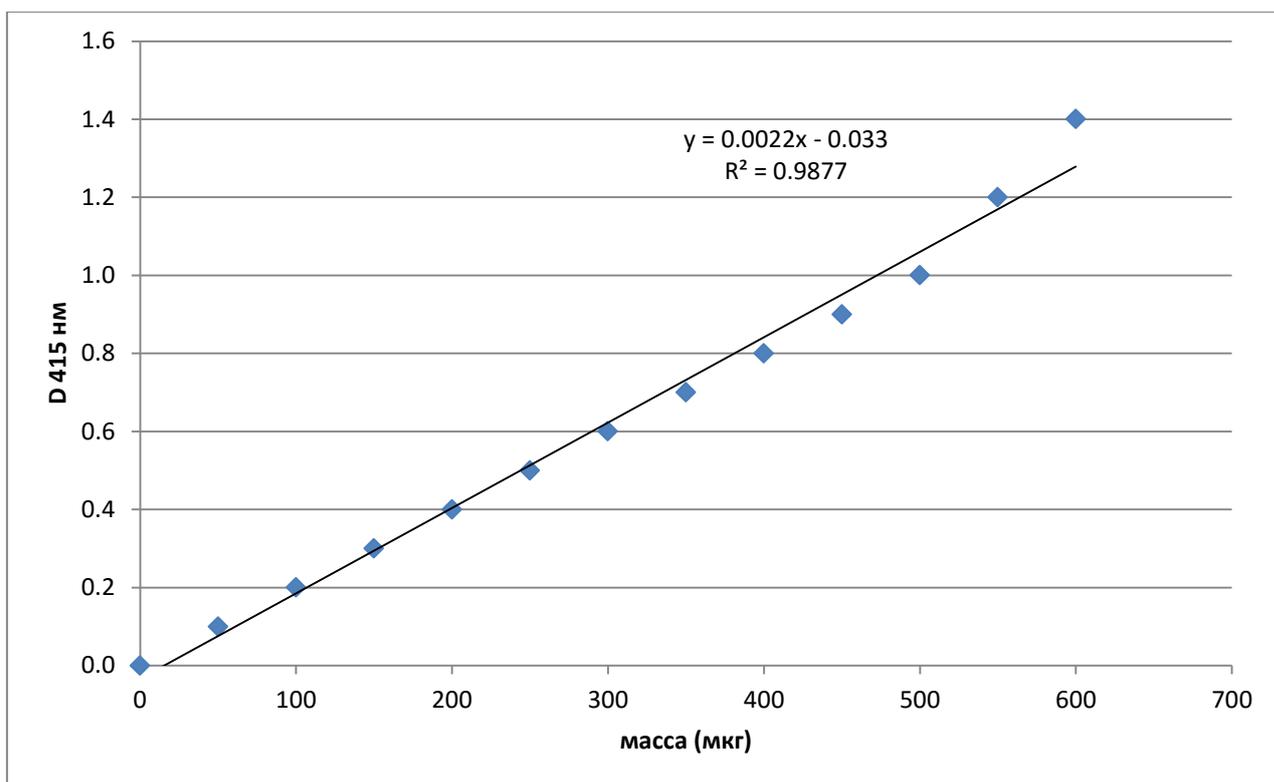


Рисунок 2.3. Калибровочная кривая для расчета содержания перекиси водорода (H₂O₂)

Расчеты:

Количество H₂O₂ на образец получается из соответствующей калибровочной кривой в микрограммах на образец без поправки на эффективность экстракции. Затем эта сумма корректируется путем вычитания общей суммы. Расчет производится по формуле :

$$C_m = \frac{M}{VEE}$$

где:

C_м - массовая концентрация (мг/м³).

M - микрограммы на пробу.

V- литры.

EE - эффективность экстракции в десятичной форме.

$$C_v = \frac{M}{VEE}$$

где:

C_v - объемная концентрация (ppm)

VM - 24,46 (молярный объем)

CM - массовая концентрация (мг/м³)

Mг- молекулярная масса H₂O₂ (34,01 г/моль)

2.9. Определение свободного пролина

Анализы проводили по протоколам, описанным Бейтсом и соавт. [82]. Нингидрин растворяли в количестве 25 мг мл⁻¹ в 60% (по объему) уксусной кислоте – 13,8% (по объему) фосфорной кислоте. Образцы (100 мкл) смешивали с одинаковым объемом раствора нингидрина и ледяной уксусной кислоты и инкубировали при 100°C в течение 60 мин. После охлаждения образовавшийся хромофор экстрагировали 200 мкл толуола путем несколько раз перемешивания. После центрифугирования при 10 000 g в течение 3 мин органическую фазу определяли при 520 нм в кварцевых или ПММА-кюветах с использованием спектрофотометра.

Концентрацию пролина в супернатанте определяют по калибровочной кривой.

Построение калибровочного графика

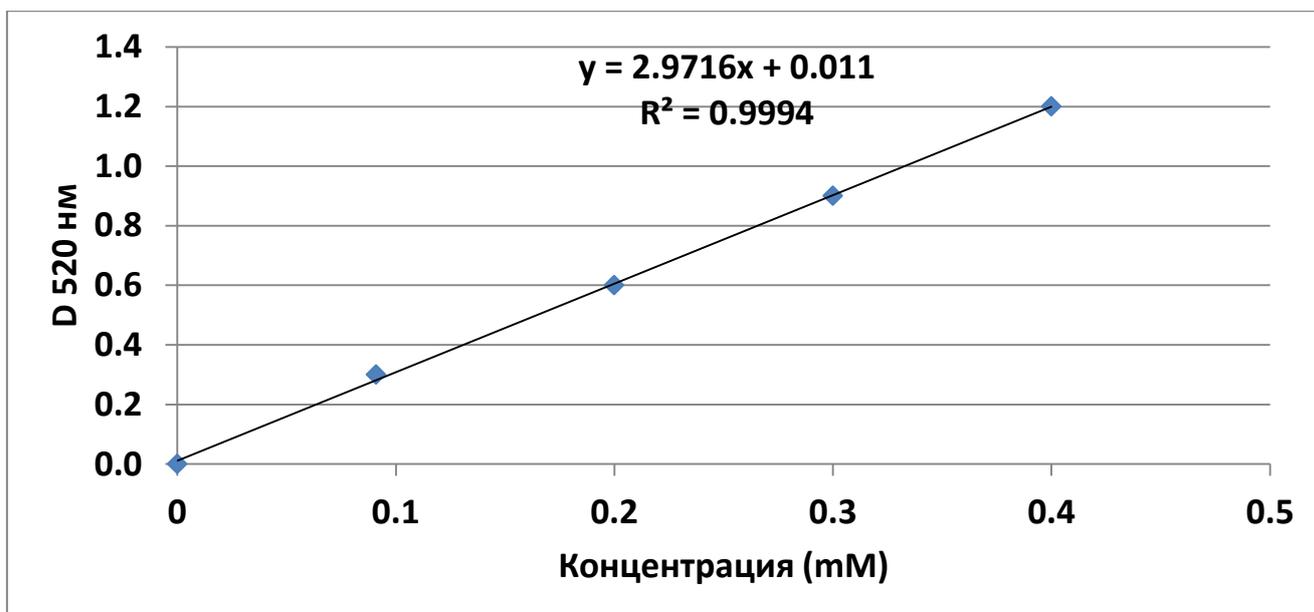


Рисунок 2.4. Калибровочная кривая для расчета содержания пролина

Реакцию с калибровочными растворами проводят аналогично реакции с опытными пробами. Содержание пролина в растительном материале рассчитывают по следующей формуле:

$$СП = \frac{C_n \cdot V}{115 \cdot 5 \cdot m}$$

где;

СП- содержание пролина, мкМ / г сырого веса;

C_n – концентрация пролина, определения по калибровочному графику, мкг/мл;

V - объем толуола, мл;

115 – молярная концентрация пролина, мкг/мкМ;

m – навеска растительного материала, г.

2.10. Определение уровня перекисного окисления липидов (содержания малонового диальдегида)

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) оценивали по накоплению продукта реакции малонового диальдегида (МДА) с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) (Рисунок 2.5) [129].

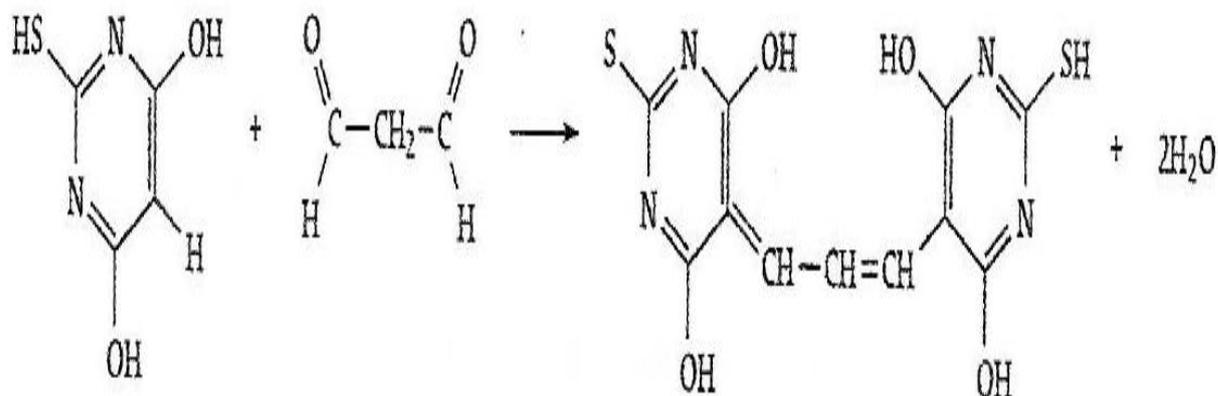


Рисунок 2.5. Схема реакции малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой

1) 20% ТХУ (20 г сухой ТХУ растворить в 100 мл дистиллированной воды).

2) 0,5% раствор ТБК (50 мг ТБК растворить в 10 мл 20% ТХУ).

500 мг растений картофеля растереть с 1 мл 20% ТХУ.

Полученный гомогенат центрифугировать в течение 5 мин, при 12 000g.

Полученный супернатант использовали в качестве образца для анализа.

По 0,4 мл супернатанта переносили в две разные пробирки, обозначенные как Т1 (добавить 0,4 мл 20% ТХУ) и Т2 (добавить 0,4 мл 0,5% раствора ТБК). Инкубировать при 100°C в течение 2 ч, затем охладить при комнатной температуре.

Оптическую плотность измеряют на спектрофотометре при длине волны 532 нм, а также при 600 нм для корректировки неспецифического поглощения [111].

Для вычисления содержания МДА используют коэффициент экстинкции $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Расчет производят по формуле:

$$C = \frac{\left(\frac{\Delta D}{155}\right) * X * V}{(m * \Delta m * 1)}$$

где:

C-количество МДА, ммоль/г сухого веса,

ΔD -разность оптической плотности образца при 532нм и 600нм,

155-коэффициент экстинкции МДА при 532 нм, $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

X-разведение (общий объем реакционной смеси разделить на количество вносимого образца экстракта),

V-объем вытяжки, мл,

m-масса сырной навески, г,

Δm -отношение сухого веса к сырному,

l-длина оптического пути, см.

2.11. Определение содержания фотосинтетических пигментов

Содержание фотосинтетических пигментов определяли согласно [134]. Для анализа использовали листья растений картофеля, которые растирали в 2 мл 96% этанола, затем центрифугировали в течение 5 мин. при 9000 об/мин. (Eppendorf, Польша). Осадок промывали спиртом три раза до полного извлечения пигментов. Оптическую плотность спиртового раствора измеряли при длине волны 665 нм, 649 нм, и 440 нм на спектрофотометре Ultraspec II (Швеция).

$$X_{ла}(\text{мг/л}) = \frac{13,70 \cdot D_{665} - 5,76 \cdot D_{649} (V)}{1000 \times W}$$

$$X_{лб}(\text{мг/л}) = \frac{25,80 \cdot D_{649} - 7,60 \cdot D_{665} (V)}{1000 \times W}$$

$$X_{ла} + X_{лб}(\text{мг/л})$$

$$\text{Кар мг/л} = 4,695 \cdot D_{440} - 0,268(X_{ла} + X_{лб} \text{ мг/л})$$

где:

Δ 665 и Δ 649: поглощения при определённой длине волны;

V: градуировка объема в мл -1 ;

W: образец вес в г;

1000: коэффициент преобразования.

Долю хлорофиллов, входящих в светособирающий комплекс (ССК) рассчитывали по формуле [134]:

$$\frac{X_{лb} + 1.2 X_{ла}}{X_{ла} + X_{лb}}$$

исходя из того, что весь $X_{лb}$ находится в ССК фотосистемы II, а соотношение $X_{ла}/X_{лb}$ в этом комплексе составляет 1.2.

2.12. Определение pH

Определение pH культуральных жидкостей проводили потенциометрическим способом (в основе которого лежит зависимость равновесного потенциала электрода от активности (концентрации) определяемого иона) на pHmeter mod. Expandable IonAnalyzer EA920 – Orion Research (Appendix A.1). Для меньших объемов использовалась индикаторная бумага узкого диапазона BDH.

2.13. Статистическая обработка данных

Эксперимент проводили в трёх повторностях. Результаты представлены в виде средней арифметической величины со стандартной ошибкой. Использовали параметрическую кривую Стьюдента, уровня значимости ($P < 0,05$).

$$a = \frac{\sum X}{n}; \quad a = \frac{\sqrt{\sum(X - \bar{X})^2}}{n - 1}; \quad m = \frac{a}{\sqrt{n}}$$

Где;

X — значение параметра,

\bar{X} — выборочное среднее соответствующей выборки,

μ — среднее арифметическое,

$t_{0,05}$ — критическое значение непарного критерия Стьюдента при уровне значимости 0,05, n — объем выборки.

Коэффициент корреляции Пирсона были проведены с использованием SPSS версии 22.0 (компания IBM).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* И *EX VITRO*

3.1. Морфофизиологические особенности роста и развития регенерантов в условиях *in vitro* и *ex vitro*

Интенсивная селекция на продуктивность и устойчивость, в известной мере, привела к потере толерантности растений к абиотическим факторам среды. Это делает актуальным изучение физиолого-биохимических механизмов устойчивости *in vitro* и *ex vitro* генотипов картофеля, различающихся по продуктивности и вызывает большой интерес. Размножение *in vitro* является альтернативным подходом к преодолению проблем сезонных колебаний, неэффективности воспроизводства, самонесовместимости и восприимчивости к болезням. Микроразмножение эффективно не только для размножения избранных клонов и получения большого количества генетически однородного растительного материала, но также является альтернативным средством круглогодичного производства вторичных метаболитов одинакового качества [170].

Тем не менее, широкое использование ограничивается образованием регенератов с аномальной морфологией, анатомией и физиологией, вызванными особыми условиями при культивировании *in vitro*, например, высокой влажностью воздуха, пониженной турбулентностью воздуха, низкой освещенностью, низкой концентрацией CO₂ в световой период, средой культивирования. После переноса *ex vitro* эти регенеранты могут быть легко повреждены внезапными изменениями условий окружающей среды. К наиболее вредным относятся низкая влажность воздуха и высокая освещенность.

В связи с этим выявление и отбор генотипов, обладающих повышенной системой защиты от стрессоров, является актуальным и перспективным. Были изучены особенность роста и развития растений

регенерантов картофеля и соотношение интенсивности прооксидантной и антиоксидантной системы у двух перспективных генотипов растений-регенерантов картофеля, различающихся по продуктивности в условиях *in vitro* и *ex vitro* и дано их сравнение с новыми отечественными сортами картофеля. Эксперименты проводили на оздоровленных растениях регенерантов картофеля, выращенных в условиях *in vitro*. Полученные данные показали, что эти клоны различаются по ряду морфофизиологических признаков: высота растений, масса растений и корней, количество и масса клубней (Таблица 3.1, рисунок 3.1, 3.2).



Рисунок 3.1. Рост и развитие клон - гибридов № 26 и 52/6 в условиях *in vitro*

Как видно из данных таблицы 3.1, высота растений у клона №26 на 22% выше, чем у клона №52/6, но по массе растений и корней клон №52/6

превосходит клон №26 на 10-12%, по количеству формирующих столонов клон №26 превосходит клон 52/6 на 10%.

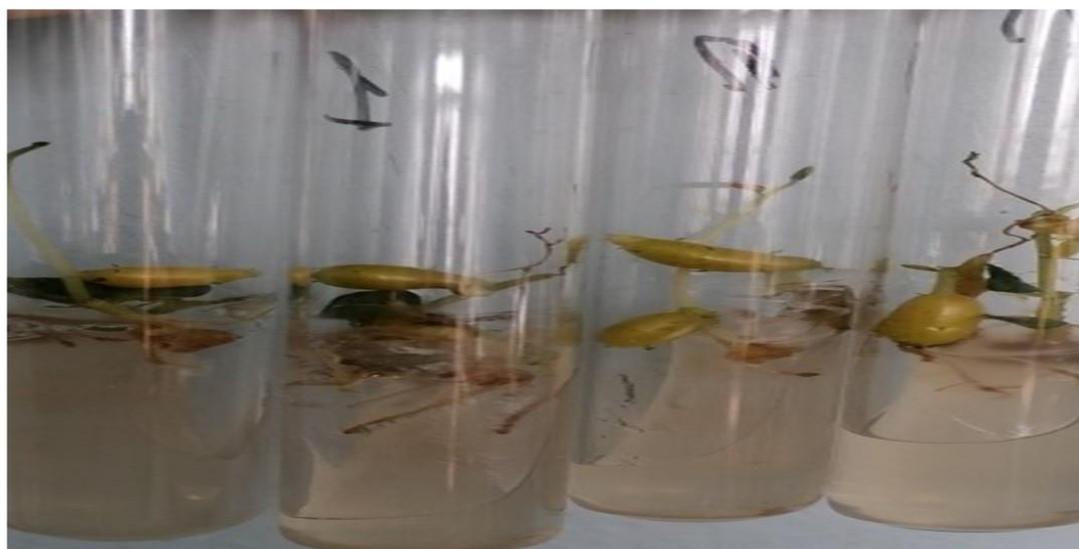


Рисунок 3.2. Рост и развитие, сортов Таджикистан и Пикассо в условиях *in vitro*

Важной характеристикой изученных генотипов является формирование микроклубней в условиях *in vitro* в стандартной среде микроклубнеобразования (МС+5% сахарозы и 1мг/л кинетина) (Рисунок 3.3, 3.4). По этим признакам эти клоны существенно различаются. Так, количество микроклубней на растение у клона №26 составляет в среднем 1.85 шт., а у клона 52/6 – 2.14шт., что на 16% выше, чем у клона №26. Средняя масса одного клубня у этих клонов примерно одинакова, а общая масса клубней у клона №52/6 значительно больше по сравнению с клоном №26 и составляет 3.21 г/растение.



а



б

Рисунок 3.3. Формирование микроклубней у гибридов, а) № 26, б) № 52/6 после 40 суток культивирования *in vitro*.



Клон-гибрид №26



Клон-гибрид №52/6



Клон-гибрид №26



Клон-гибрид №52/6

Рисунок 3.4. Вид микроклубней полученных в культуре *in vitro* и клубней, полученные со второй посадки для дальнейшего его размножения в полевых условиях,

Таблица 3. 1. - Морфофизиологические признаки растений-регенерантов картофеля *in vitro*

Генотипы/ Сорта	Высота растения, см	Масса растения, г	Масса корней, г/растение	Общая масса растения, г	Количество столонов, шт	Количество клубней, шт/ растение	Средняя масса одного клубня, г	Общая масса клубней, г/растение
№26	7.41±0.23	0.50±0.013	0.48±0.017	0.98±0.030	3.64±0.5	1.85±0.11	0.108±0.016	1.41±0.11
№52/6	5.81±0.33	0.55±0.016	0.53±0.035	1.08±0.041	3.92±0.4	2.14±0.13	0.107±0.015	3.21±0.13
Таджикистан	8.5±0.4	0.54±0.07	0.56±0.3	1.2±0.056	4.3±0.09	2.65±0.8	0.134±0.08	2.09±0.3
Пикассо	9.5±0.2	0.44±0.04	0.8±0.06	0.97±0.6	3.45±0.08	1.3±0.07	0.100±0.07	1.78±06



а



б

Рисунок 3.5. Формирование микроклубней у сортов а) № Таджикистан б) Пикассо после 40 суток культивирования *in vitro*.



Сорт Таджикистан



Сорт Пикассо



Сорт Таджикистан



Сорт Пикассо

Рисунок 3. 6. . Вид микроклубней полученных в культуре *in vitro* и клубней, полученные со второй посадки для дальнейшего его размножения в полевых условиях,

Таблица 3.2. - Морфологические параметры растений- регенерантов в условия *ex vitro*.

Генотипы/ Сорта	Рост растений, см	Масса растения, г	Масса корней, г	Количество листьев, шт	Расстояние между узлами, см
№26	10.9±0.2	3.45±0.1	0.096±0.04	8±0.3	1.2±0.01
№52/6	9.2±0.2	5.22±0.3	0.245±0.08	11±0.5	0.7±0.01
Таджикистан	12.1±0.3	4.45±0.4	0.260±0.07	12±0.6	1.1±0.04
Пикассо	10.3±0.4	4.22±0.08	0.145±0.08	10±0.9	0.8±0.08

Вес после удаления корней пробирочных растений (образование новых корней).

Данные таблицы 3.2. показывают, что при переводе растений из условий *in vitro* в водную среду *ex vitro* генотипы значительно отличаются по ряду морфологических параметров, таких как высота растения, количество листьев на растение и т.д.

По изученным параметрам растения клона №26 и клона №52/6 значительно отличаются. Так, длина междоузлий клона №26 значительно больше, чем клона №52/6, также отличаются эти клоны по массе растений и корней. Более интенсивнее формируется корневая система в условия *ex vitro* у клона №52/6, чем у клона №26, что отражается на увеличении сырой массы корневой системы клона №52/6.

Для выявления биохимических механизмов, обеспечивающих функциональную перестройку метаболизма при воздействии таких стрессовых факторов, как засоление и засуха, нами были проведены сравнительные исследования различных физиолого-биохимических процессов у устойчивых и неустойчивых генотипов картофеля.

Генотипы, устойчивые и неустойчивые к засолению и засухе, были получены путем скрининга растений *in vitro* на солевой стресс .

Таким образом, полученные результаты дают основание использовать толерантные к соли клон-гибриды в качестве модельных растений в биотехнологии и молекулярно-генетических исследованиях. Для адаптивирования производства картофеля в условиях засоленности почвы требуется еще более глубокое и детальное исследование, и использование таких модельных объектов имеет принципиальное значение для производства первичного семенного материала и выявления механизмов адаптации растений к стрессовым условиям. Полученные нами экспериментальные результаты показали надежность системы *in vitro* для скрининга с использованием селективных химических агентов: полиэтиленгликоль (ПЭГ). Засоление, особенно в сочетании с засухой является одним из главных стрессовых факторов, снижающих продуктивность растений. Засоление и засуха приводят к ингибированию биохимических процессов и даже к гибели растений. В основе этих процессов лежит усиление осмотического стресса, которое является следствием нарушения водного гомеостаза. Результаты наших исследований подтвердили мнение, что нарушение тургорного состояния клетки является главной причиной снижения интенсивности фотосинтеза и дыхания растений.

ГЛАВА 4. СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* И *EX VITRO*.

4.1. Содержание фотосинтетических пигментов в листьях картофеля (*Solanum tuberosum*) в условиях *in vitro* и *ex vitro*

Применение методов культивирования *in vitro* является мощным инструментом вегетативной пролиферации для многих видов растений. Однако этот процесс может быть ограничен из-за значительных потерь при акклиматизации к условиям *ex vitro*. Доступность света и, следовательно, процесс фотосинтеза являются ключевым фактором для акклиматизации *ex vitro*. Микроразмножаемые растения очень восприимчивы к экологическим проблемам после переноса в условия *ex vitro*. Например, растения *ex vitro* обычно подвергаются более высокой плотности фотосинтетического потока фотонов, чем растения, выращенные в условиях *in vitro*. Улучшение фотосинтетической активности является важным шагом для достижения высокой выживаемости при акклиматизации *in vitro* [161]. При переносе растения - регенеранта из условий *in vitro* в условия *ex vitro* до сих пор отсутствует соответствующая модель исследования. В некоторых исследованиях использовали метод флуоресценции хлорофилла в качестве неразрушающего индикатора для отслеживания процесса акклиматизации [137, 37]. Кроме того, при переносе растений из условий *in vitro*, характеризующихся высокой влажностью, условия *ex vitro* с пониженной влажностью часто приводят к высыханию растений.

Содержание фотосинтетических пигментов является одним из важнейших биохимических показателей реакции растений на изменение условий выращивания [134]. Исследование зелёных пигментов в зависимости от условий культивирования *in vitro* и *ex vitro* является актуальной задачей для выявления механизмов защиты растений как в нормальных условиях, так

и в условиях воздействия стрессовых факторов, но к сожалению, до сих пор мало изучено.

Как видно из данных таблицы 4.1., содержание фотосинтетических пигментов у исследованных генотипов растений в условиях *in vitro* отличается от значений, полученных в условиях *ex vitro*. Содержание хл *a* у всех генотипов варьирует в пределах 1.36-1.83 мг/г сырой массы листа.

Таблица 4.1. Содержание фотосинтетических пигментов в условиях *in vitro* и *ex vitro* у растений-регенерантов картофеля, мг/г сырой массы

Генотипы/ Сорта	Хл <i>a</i>	Хл <i>b</i>	Сумма (хл <i>a</i> +хл <i>b</i>)	Соотношение хл <i>a</i> /хл <i>b</i>	Каротиноиды
<i>in vitro</i>					
Клон-гибрид № 26	1.44±0.3	1.25±0.07	2.70	1.90	0.36±0.01
Клон-гибрид №52/6	1.74±0.4	1.34±0.07	3.08	1.30	0.26±0.05
Таджикистан	1.83±0.4	1.62±0.3	3.45	1.13	0.52±0.01
Пикассо	1.44±0.2	0.94±0.05	2.38	1.53	0.25±0.03
<i>ex vitro</i>					
Клон-гибрид №26	1.37±0.2	0.75±0.05	2.12	1.78	0.23±0.03
Клон-гибрид №52/6	1.25±0.2	0.70±0.06	1.95	1.81	0.29±0.03
Таджикистан	1.45±0.3	0.89±0.07	2.34	1.63	0.54±0.04
Пикассо	1.22±0.2	0.72±0.06	1.94	1.68	0.21±0.02

Следует отметить, что содержание хл *a* у клон-гибрида 52/6 в условиях *in vitro* несколько выше, по сравнению с остальными изученными генотипами. Разный уровень хл *a* и хл *b* влияет на соотношение хл *a/b* и составляет 1.9 у клон-гибрида №26. У остальных генотипов этот показатель несколько ниже и составляет 1.13-1.5. Общее содержание зелёных пигментов (хл *a*+хл *b*) варьирует в пределах от 2.38 мг/г сырой массы (сорт Пикассо) до 3.45 мг/г сырой массы (сорт Таджикистан). Содержание каротиноидов у изученных генотипов в условиях *in vitro* варьирует в диапазоне от 0.2 до 0.52 мг/г сырой массы. Содержание каротиноидов у клон-гибрида №26 и сорта Таджикистан несколько выше, чем у остальных генотипов.

Следует отметить, что в условиях *ex vitro*, т. е. при переводе растений-регенерантов из агаризованной в водно-солевую среду содержание фотосинтетических пигментов несколько ниже, чем в условиях *in vitro* (пробирочная культура).

Разный уровень содержания хл *a* и *b* хл и их суммы отражается на их соотношении. Низкое значение соотношения хл *a/* хл *b* указывает на то, что, возможно, при переходе растений-регенерантов в условия *ex vitro* (вне пробирки) в первые часы срабатывают адаптационные механизмы при изменении условий, что незамедлительно сказывается на формировании фотосинтетической системы растений.

Процессы адаптации растений при переходе от условий *in vitro* к *ex vitro* напрямую зависят от времени нахождения растений-регенерантов в водно-солевой культуре (МС-разбавленной в 2 раза) (Рисунок 4.1).

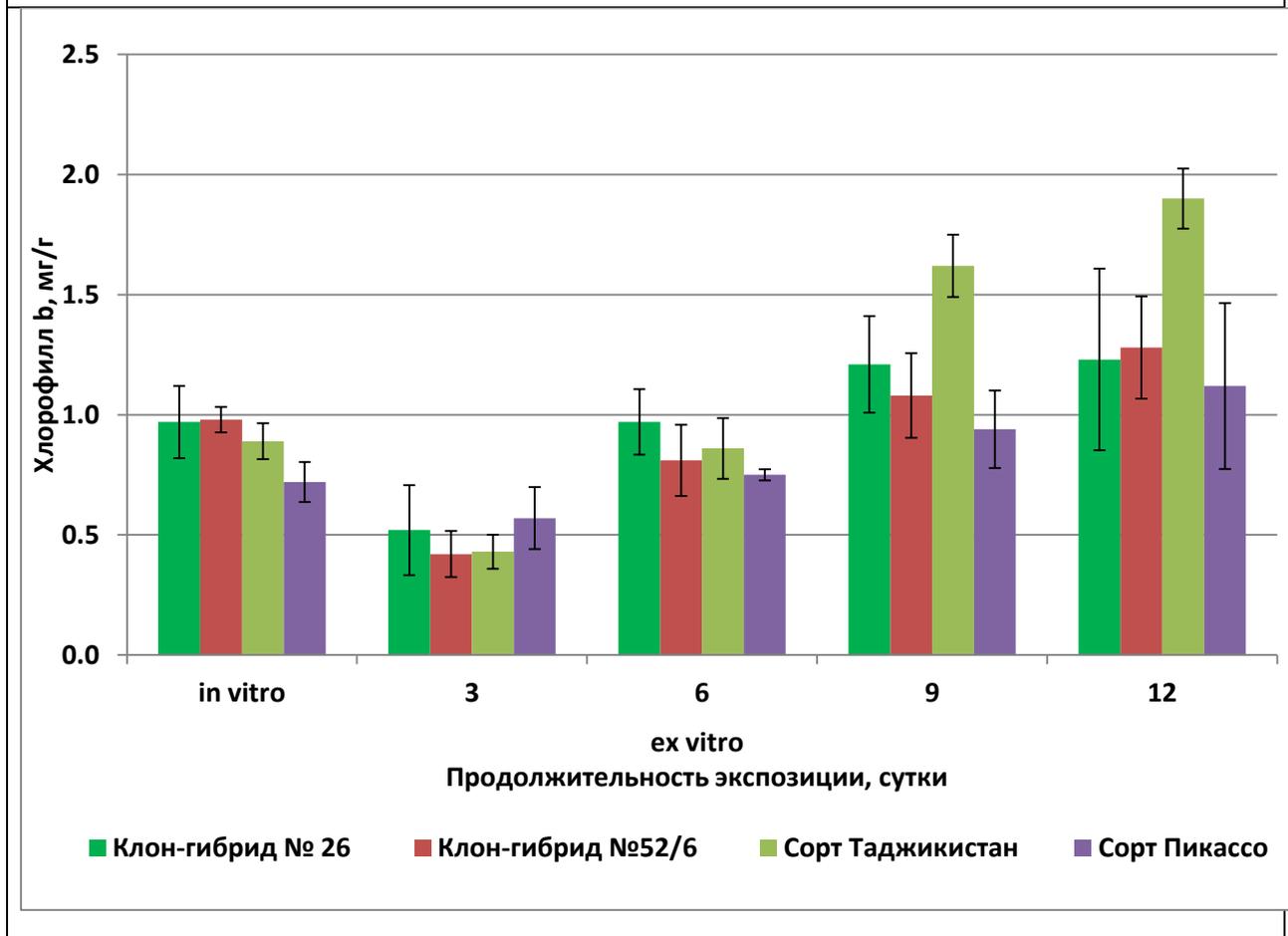
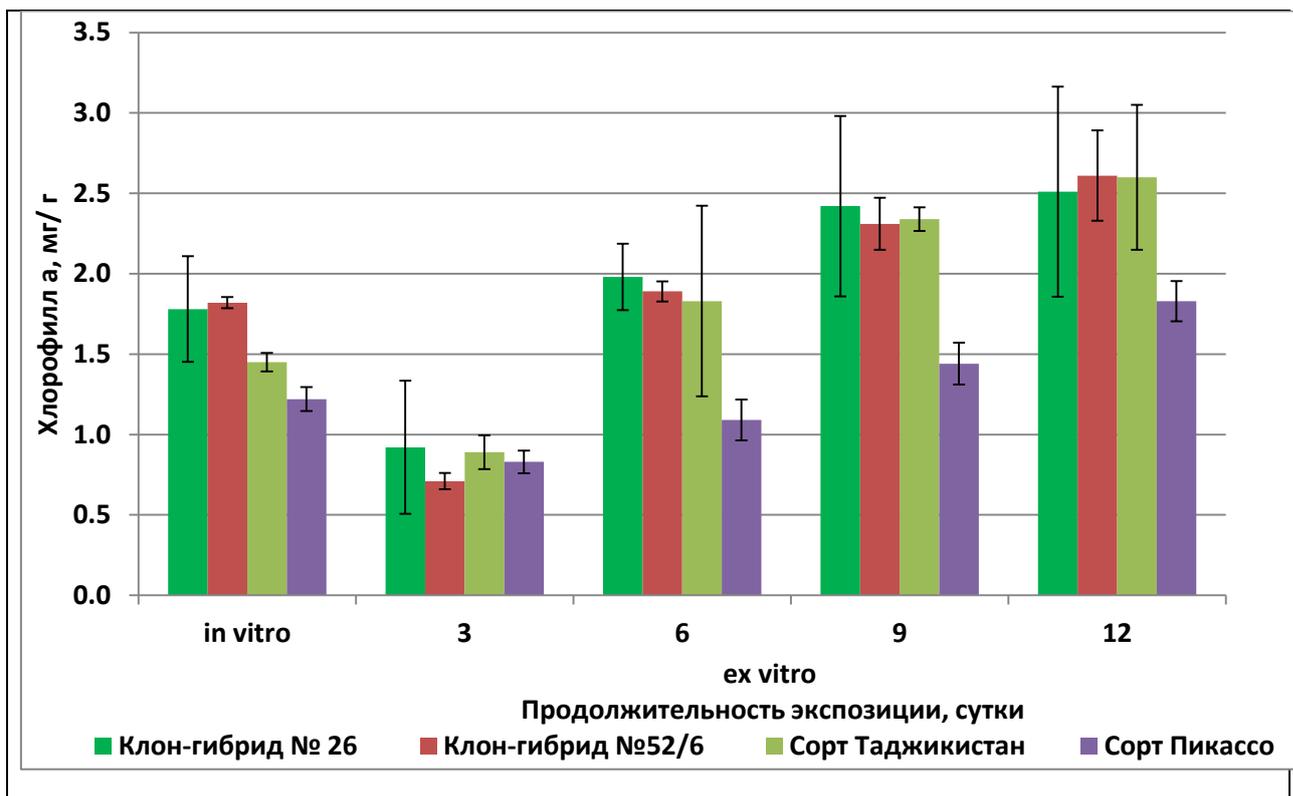


Рисунок 4.1. Зависимость содержания хлорофилла а и б от продолжительности экспозиции в условиях *in vitro* и *ex vitro*, мг/г сырой массы

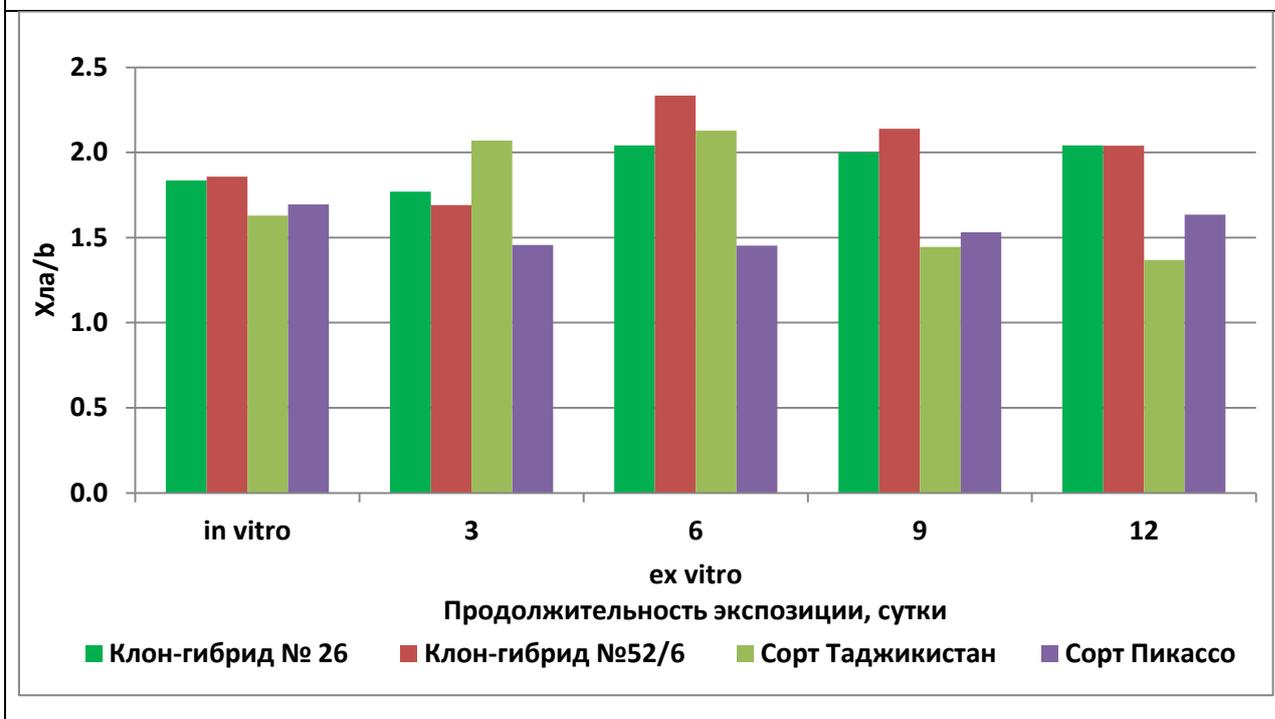
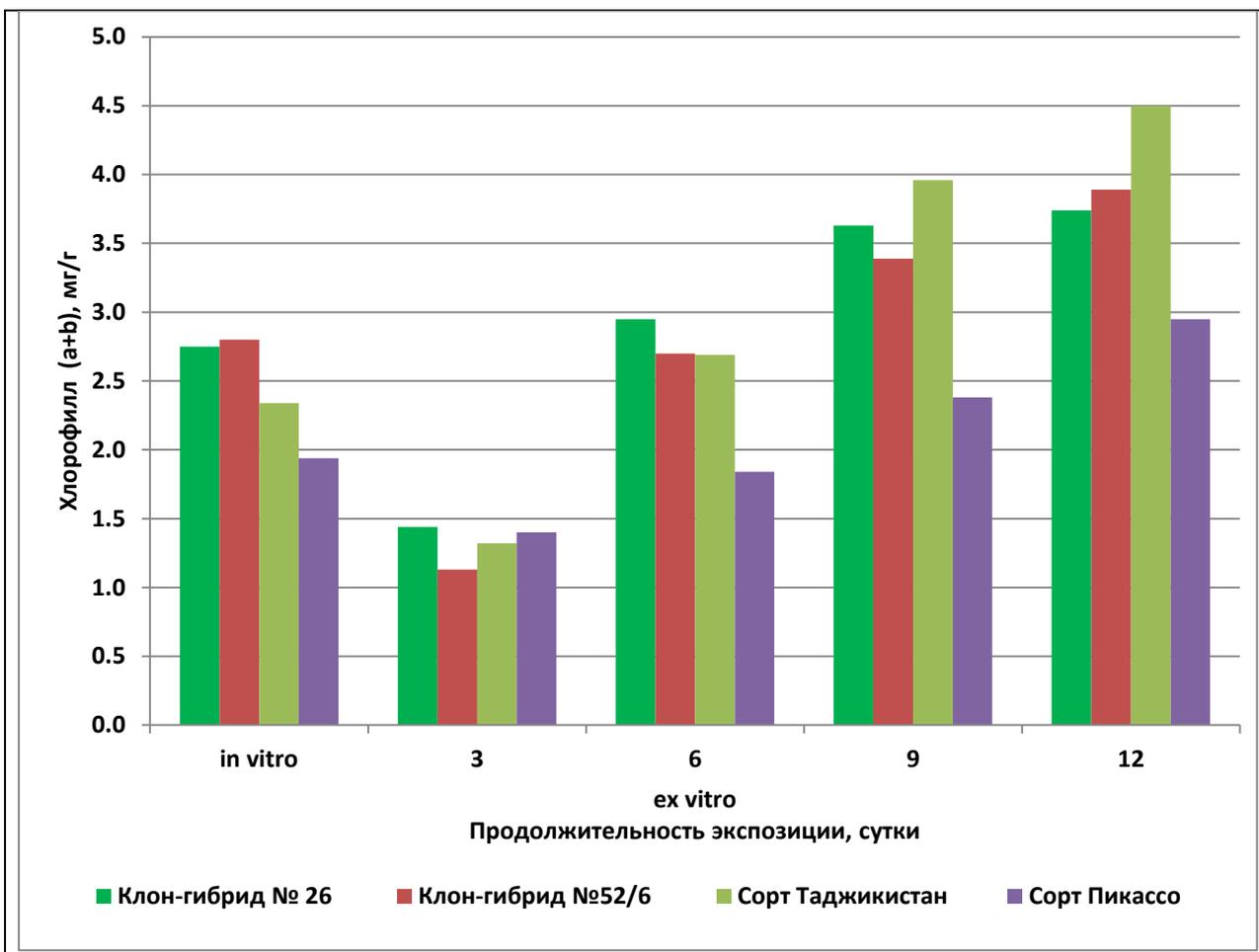


Рисунок 4.2. Соотношение хл а / хл b и суммы хлорофиллов от продолжительности экспозиции в условиях *in vitro* и *ex vitro*, мг/г сырой массы

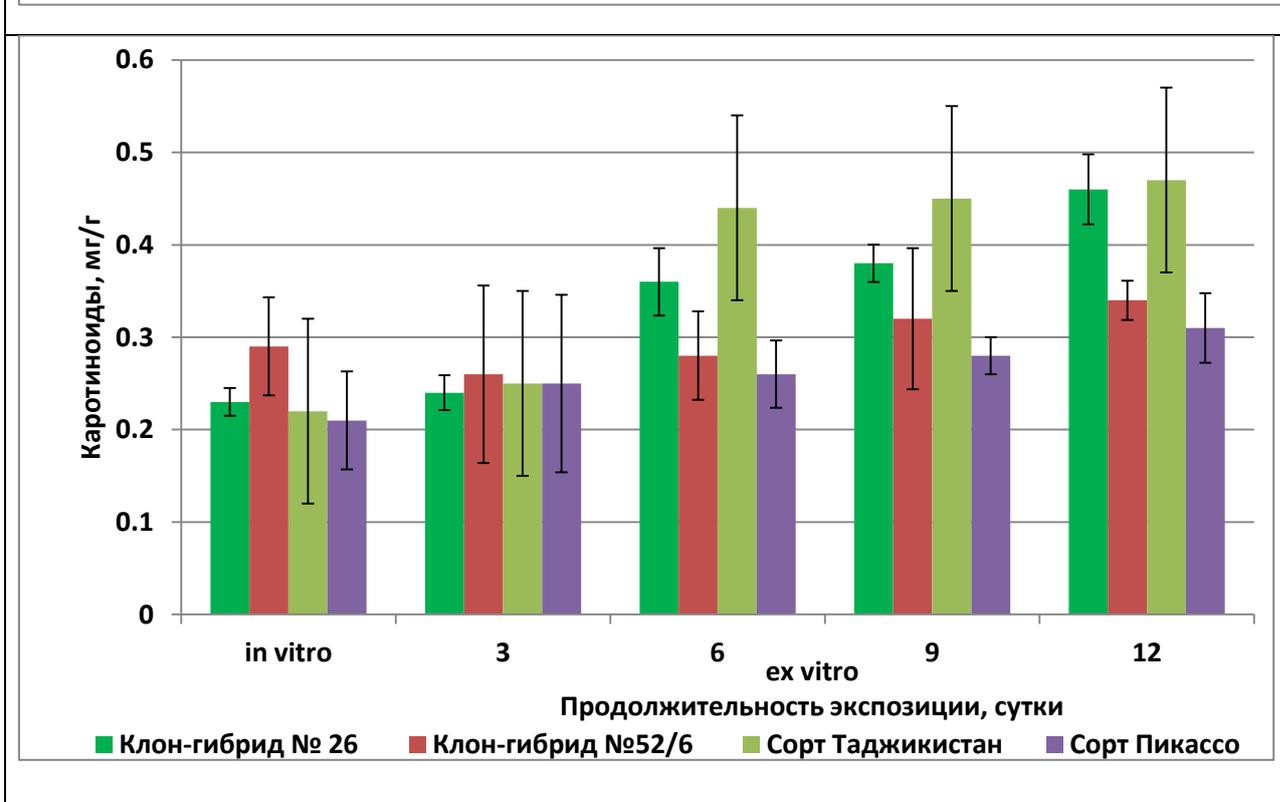
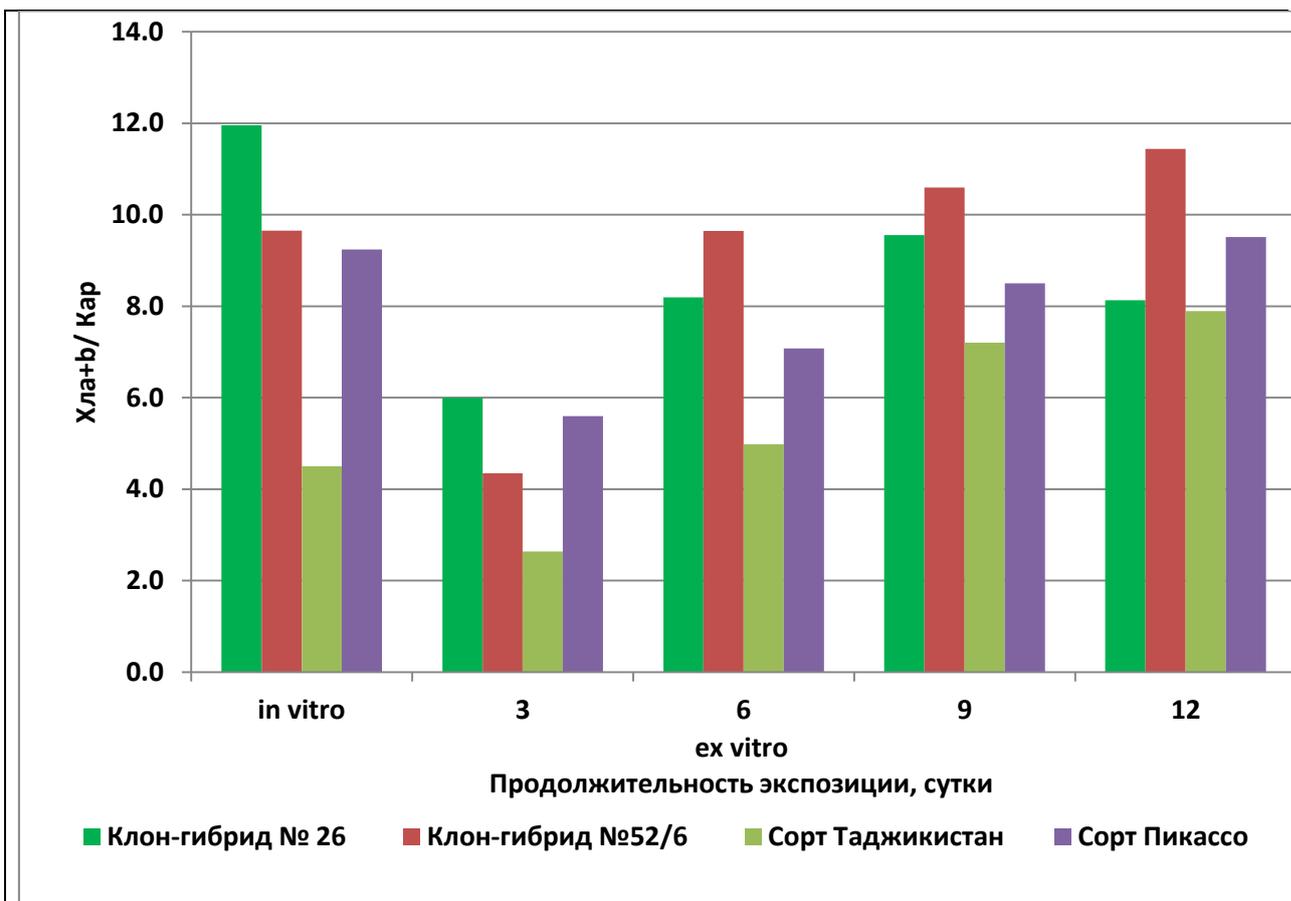


Рисунок 4.3. Зависимость содержания каротиноидов и соотношение хла+хл b/К от продолжительности экспозиции в условиях *in vitro* и *ex vitro*, мг/г сырой массы

Содержание фотосинтетических пигментов при кратковременной адаптации в условиях *ex vitro* в первые 3-е суток снижалось примерно на 50%. В дальнейшем (6-е сутки) содержание хл *a* и хл *b* и их соотношение увеличиваются и остаются на стабильном уровне при последующем выдерживании растений в водно-солевой среде (9-12 суток) (Рисунок 4.1) Соотношение хл *a*/хл *b* составляет более 2.0 на 9-е сутки выращивания растений в условиях *ex vitro* и не изменяется при последующем выращивании. Общее содержание хлорофиллов у изученных клон-гибридов (№26 и 52/6) и сортов картофеля в 1.5-2 раза выше, чем в условиях *in vitro* (Рисунок 4.2.)

Содержание каротиноидов у изученных генотипов в условиях *in vitro* варьирует в диапазоне от 0.2 до 0.52 мг/г сырой массы. Содержание каротиноидов у клон-гибрида №26 и сорт Таджикистан несколько выше, чем у клон-гибрида №52/6 и сорт Пикассо (Рисунок 4.3.).

Следует отметить, что в условиях *ex vitro* (фототрофии), т. е. при переводе растений-регенерантов из агаризованной в водно-солевую среду содержание каротиноидов увеличился при 6-12-х суточной экспозиции.

Было бы интересно рассчитать долю хл *a* в ССК, исходя из того, что весь хл *b* находится в ССК и соотношение хл *a*/хл *b* для этого комплекса равно 1.2 [25, 134].

Как видно из данных рисунка 4.4, доля хлорофилла, входящего в состав ССК в условиях *in vitro* и *ex vitro* у изученных генотипов резко отличается. Так, в условиях *in vitro* доля хл *a* составила в среднем 44-53%. В условиях *ex vitro* этот показатель увеличился до 30-55% при 3-х суточной экспозиции и до 66-70% в последующие сутки.

Исходя из полученных данных можно предположить, что в условиях культуры *in vitro* растения испытывают недостаток света для биосинтеза и полного функционирования фотосинтетических пигментов, и по этой причине доля хл *a* в сумме хлорофиллов значительно ниже, а в условиях *ex*

in vitro содержание хл *a* повышается, что указывает на относительно стабильное функционирование фотосинтетической функции хлоропластов и, возможно, в культуре *in vitro* повышенный фон макро- и микроэлементов, витаминов, сахарозы и агара в комплексе оказывает двойное воздействие: с одной стороны, способствует росту регенерантов, а с другой - ингибирует синтез фотосинтетических пигментов, особенно хл *a*.

Возможно, повышение содержания хл *a* по отношению к хл *b* в условиях *ex vitro* свидетельствует об увеличении количества (числа) светособирающих комплексов фотосинтетического аппарата и реакционных центров фотосистемы I и II. Это, видимо, обеспечивает возрастание скорости переноса электронов в электрон-транспортной системе фотосинтетического аппарата. На этом фоне очень важно понять роль оксидантных и антиоксидантных систем как в условиях *in vitro*, так и в условиях *ex vitro* и их взаимосвязь с формированием и усилением фотосинтетической функции хлоропластов.

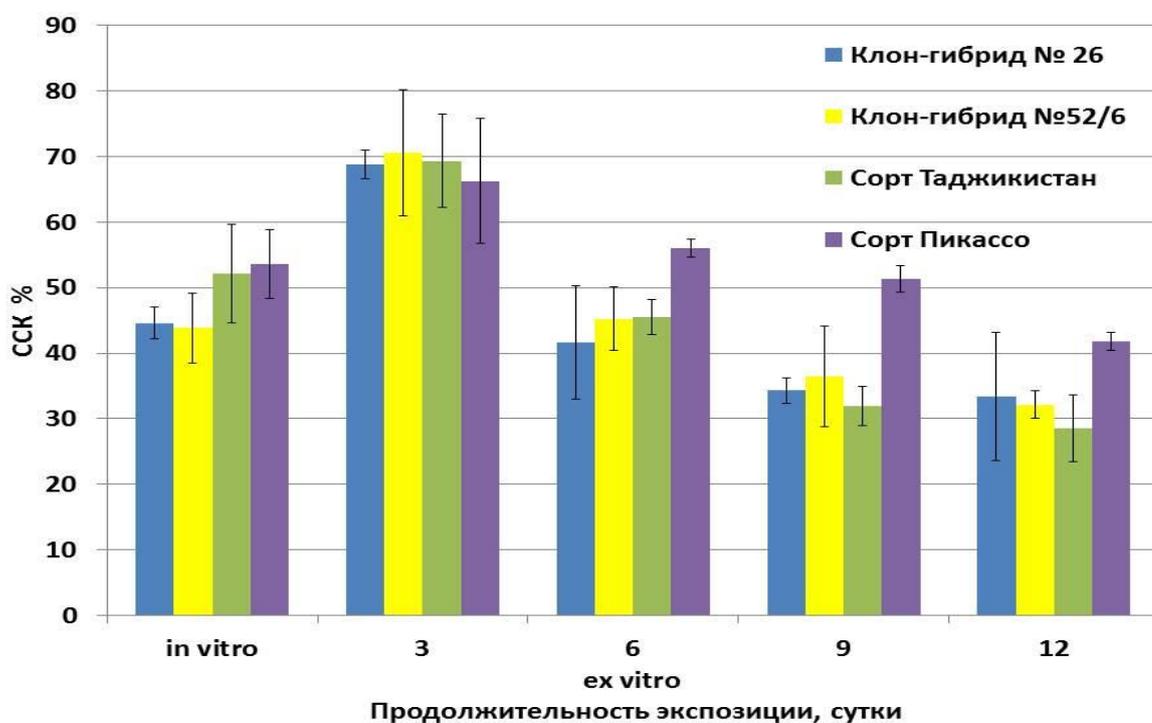


Рисунок 4.4. Доля Хл_а в ССК в условиях *in vitro* у растений – регенерантов картофеля

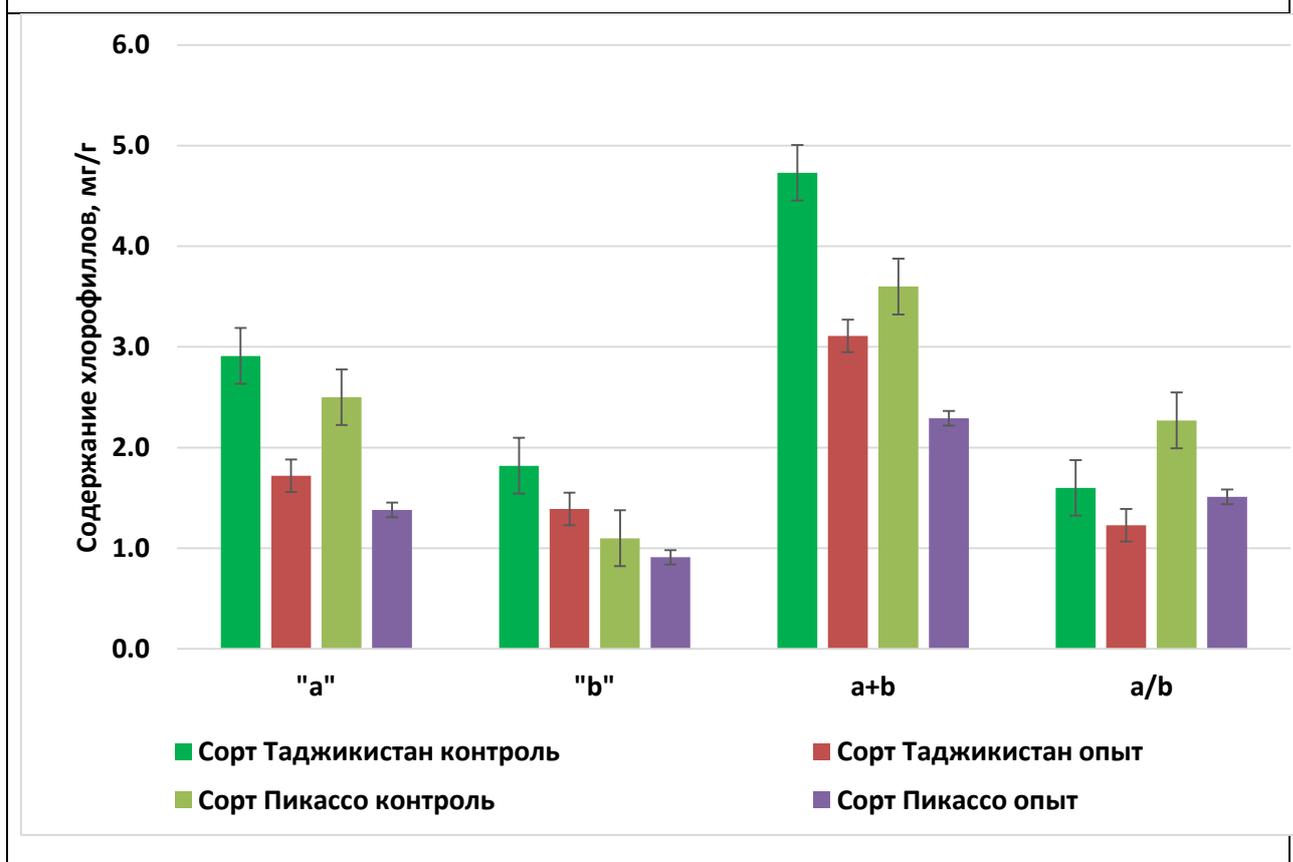
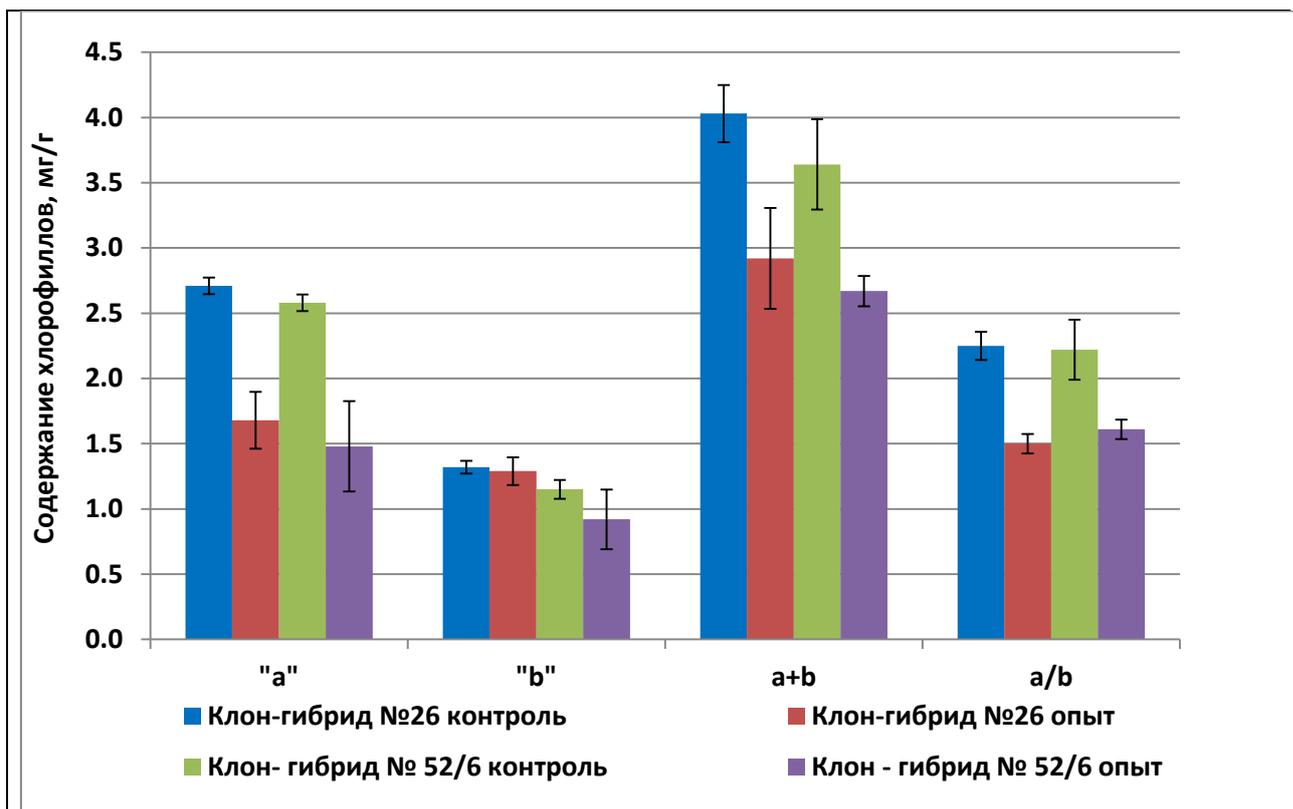


Рисунок 4.5. Влияние ПЭГ- 6000 на содержание фотосинтетических пигментов в условиях *ex vitro*

Возможно, при переходе растений от автотрофии к фототрофии наблюдается у дифференциальная активность биосинтеза хлорофиллов, зависящая от продолжительности нахождения растений в условиях *ex vitro* (Рисунок 4.4.).

Следует отметить, что дифференциальный биосинтез хлорофиллов проявился в условиях водного дефицита. Данные рисунка 4.5. показывают, что в этих условиях содержание хл *a* у изученных генотипов (клон-гибриды №26 и 52/6) и сортов (Таджикистан и Пикассо) резко снижалось и составило 62% от контроля. Содержание хл *b* снизилось в меньшей степени и составило 27% от контроля. Снижение содержания хл *a*, соответственно, отразилось на соотношении хлорофиллов, которое составило в опыте 1.61 напротив 2.25 в контроле. Общее содержание хлорофиллов в условиях недостатка воды (ПЭГ-6000) у опытных растений составило 2.9-2.7 мг/г сырой массы и 4.03-3.64 у клон-гибридов №26 и 52/6 соответственно, то есть содержание зелёных пигментов снизилось в среднем на 32%.

Статистический анализ показывает, что значительное снижение содержания хлорофилла было обнаружено в растениях в условиях стресса. Снижение содержания хлорофилла может быть связано с увеличением деградации хлорофилла или снижением биосинтеза хлорофилла. Наиболее очевидным биохимическим ответом является изменение содержания хлорофилла под влиянием ПЭГ. Существуют аналогичные результаты при размножении растения в условиях засоления и засухи, где показано, что снижение хлорофилла, связанное со снижением фотосинтетической активности и скорости испарения у растений на всех уровнях засоления, считается защитным механизмом от повреждения активными формами кислорода путем уменьшения светпоглощающей способности, что уменьшает поток электронов через фотосистему. Кроме того, нарушение тилакоидной и стромальной мембран может привести к хлорозу и некрозу листьев [41, 42].

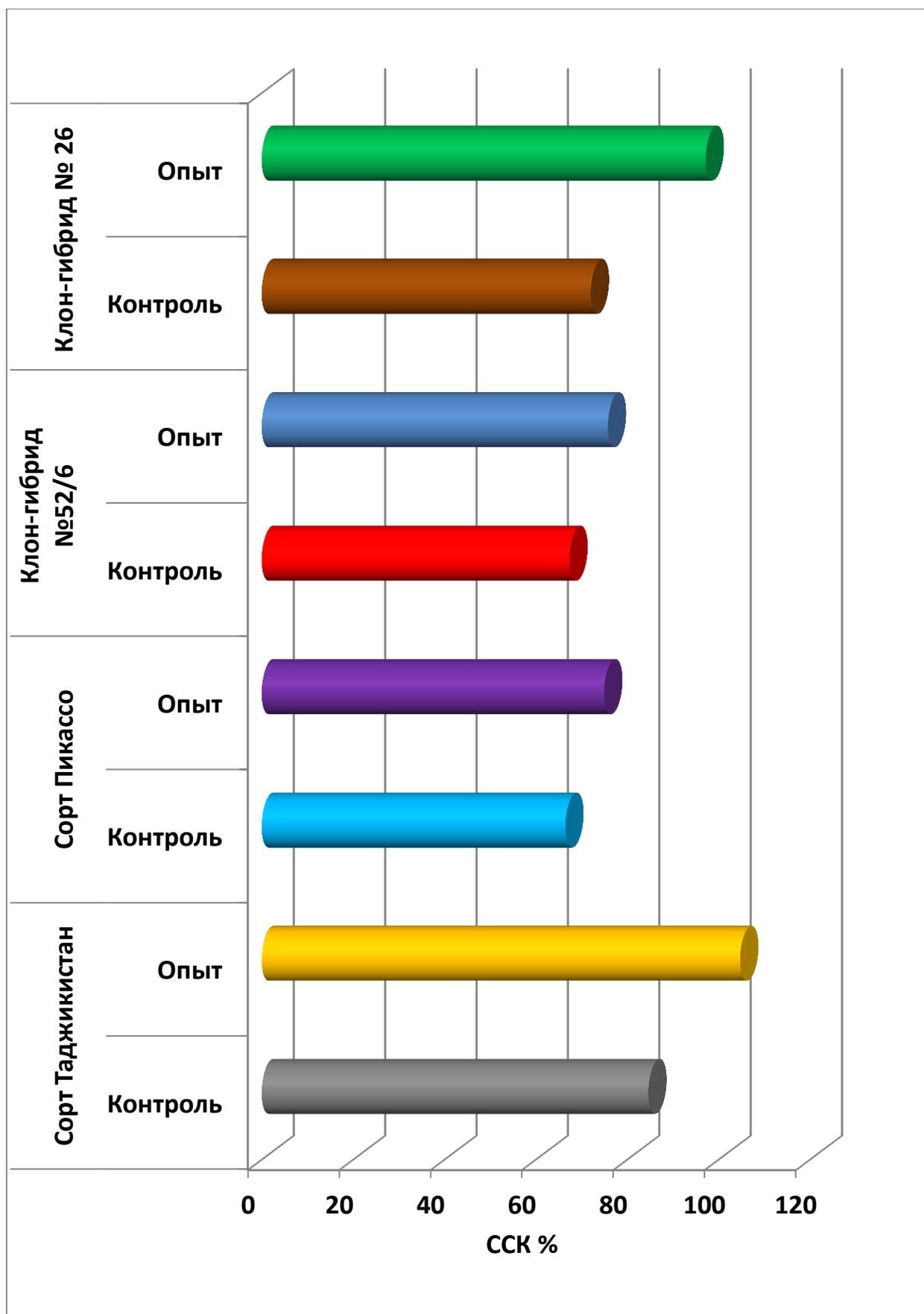


Рисунок 4.6. Доля хл а в ССК в условиях *ex vitro* (ПЭГ- 6000) у растений – регенерантов картофеля

В условиях *ex vitro*, при переводе растений-регенерантов из агаризованной в водно-солевую среду, содержащую ПЭГ- 6000 (6%), наблюдалось резкое снижение всех показателей содержания фотосинтетических пигментов. На рисунке 4.6 показано, что уровень ССК у сортов Таджикистан, Пикассо, клон – гибрида №26 и клон – гибрида №56/2 был зафиксирован на 16, 8, 8, и 25 % выше контрольного значения, соответственно. Увеличивается уровень ССК, выполняющего роль антенны, которая эффективно поглощает свет и переносит энергию возбуждения к реакционному центру.

Таким образом, полученные данные подтверждают положение о большей чувствительности хл *a* к стрессору, чем хл *b* в ПЭГ- 6000 условиях водного дефицита, засоления и других экстремальных природных факторов, а снижение общего содержания хлорофиллов в основном связано с уменьшением содержания хл *a*.

В условиях *in vitro* и *ex vitro* содержание хлорофиллов и каротиноидов существенно отличалось и оказывало определенное влияние на сборку ССК комплекса фотосистемы. Можно предположить неоднозначность роли ССК в формировании и функционировании фотосинтетического аппарата, что может является одним из показателей адаптации растений в стрессовых условиях внешней среды.

Возможно, возрастание содержания хлорофиллов (хл *a* и хл *b*) в условиях *ex vitro* свидетельствует об увеличении числа компонентов ССК, и это способствует более эффективной работе электрон-транспортной цепи хлоропластов, что в свою очередь может инициировать образование свободных радикалов кислорода в хлоропластах. Этот важный вопрос стал предметом дальнейших наших исследований. Особый интерес вызывает локализация про-и антиоксидантных компонентов клетки в органах растений.

ГЛАВА 5. ОРГАНОСПЕЦИФИЧНОСТЬ ПРО - И АНТИОКСИДАНТНЫХ СИСТЕМ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* И *EX VITRO* У КАРТОФЕЛЯ

5.1 Активность прооксидантов в растениях-регенерантах в условиях *in vitro*

Активные формы кислорода (АФК), такие как радикалы перекиси ($\cdot\text{OH}$), радикалы супероксида ($\text{O}_2^{\cdot-}$) и перекись водорода (H_2O_2), являются неизбежными молекулами, продуцируемыми аэробным дыханием и стрессовыми условиями во всех живых клетках [19, 21]. Эти АФК при высоком уровне вызывают повреждение мембран, перекисное окисление липидов, деградацию белков, инактивацию ферментов, повреждение ДНК и гибель клеток. Однако при более низких концентрациях активные формы кислорода вызывают метаболические реакции, реакции развития и адаптации [22].

Культуры клеток и органов растений *in vitro* подвергаются воздействию высокой влажности воздуха, пониженной турбулентности воздуха, низкой освещенности, низких концентраций CO_2 в течение светового периода. Кроме того, добавление в питательную среду таких компонентов, как сахара и регуляторы роста, может создавать стресс с последующим образованием АФК [23].

Полученные данные указывают на существенные различия изученных генотипов картофеля по морфофизиологическим признакам. Далее был проведен сравнительный анализ некоторых компонентов про - и антиоксидантной системы у генотипов картофеля в условиях *in vitro* и *ex vitro* (Таблица 5.1.).

Таблица 5.1. Содержание супероксид анион-радикала кислорода (АФК) у растений-регенерантов *in vitro* (мкмоль/г сырой массы)

Клон-гибриды / Сорта	Органы растений	
	лист	корень
52/6	2.53±0.03	0.065±0.003
26	1.84±0.02	0.032±0.006
Таджикистан	1.88±0.2	0.033±0.046
Пикассо	2.44±0.06	0.062±0.008

Как видно из таблицы 5.1., скорость генерации АФК была несколько выше у сорта Пикассо и клона №52/6, чем у сорта Таджикистан и клона №26. Такая тенденция имела место как в листе, так и в корнях. Но скорость генерации АФК в листе у клона №52/6 в 35 раз больше, чем в корнях, а у клона №26 в 27 раз. Таким образом, у растений в условиях гетерофототрофии наблюдается схожий характер изменения скорости генерации супероксид-анион радикала кислорода. Однако у клона №26 скорость генерации $O_2^{\cdot-}$ гораздо ниже, чем у клона №52/6 как в листе, так и в корнях. Можно предположить, что системы генерации АФК, видимо, отличаются у изученных генотипов растений в условиях гетеро- фототрофного питания. Подтверждением этого является изменение накопления другой формы АФК- перекиси водорода. Сравнительным анализом содержания перекиси водорода у изученных клонов картофеля (Таблица 5.2) показано, что содержание H_2O_2 несколько выше у сорта Пикассо и клона №52/6 по сравнению с сортом Таджикистан и клоном №26.

Таблица 5. 2. Содержание H_2O_2 у растений-регенерантов картофеля *in vitro* (мкмоль/г сырой массы)

Клон-гибриды / Сорта	Органы растений	
	лист	корень
52/6	0.983±0.02	0.545±0.03
26	0.818±0.03	0.220±0.01
Таджикистан	0.832±0.006	0.32±0.007
Пикассо	0.942±0.05	0.402±0.02

Содержание H_2O_2 у обоих изученных клонов в листе несколько выше, чем в корнях. Но содержание H_2O_2 в корнях клона №52/6 в два раза выше, чем у клона №26. В целом, характер накопления перекиси водорода у сортов и клонов совпадал, но по абсолютным значениям уровень H_2O_2 был выше у растений сорта Пикассо и клона №52/6, чем у растений сорта Таджикистан и клона №26. Был проведен сравнительный анализ образования конечного продукта ПОЛ –малонового диальдегида (МДА).

Уровень накопления МДА как в листе, так и в корнях у сорта Таджикистан и клона №26 гораздо ниже, чем у растений сорта Пикассо и клона №52/6 (Таблица 5.3). Если у клона №26 и сортов Таджикистан и Пикассо содержание МДА в листе и в корнях примерно одинаково, то у клона №52/6 в корнях содержание МДА гораздо выше, чем в листе. Очевидно, этот клон испытывает определённый дисбаланс в системе про-окислительных и антиокислительных защитных компонентов, но общий уровень МДА у обоих генотипов очень низкий.

Таблица 5.3. Содержание МДА у растений-регенерантов картофеля *in vitro* (мкмоль/г сырой массы)

Клон-гибриды / Сорта	Органы растений	
	лист	корень
52/6	0.212±0.13	0.262±0.07
26	0.176±0.09	0.170±0.10
Таджикистан	0.173±0.2	0.170±0.08
Пикассо	0.234±0.9	0.230±0.2

Полученные экспериментальные данные показали, что растения клонов №26 и №52/6 имели неодинаковую скорость генерации супероксидного анион-радикала кислорода, который является наиболее опасной формой АФК. Супероксидные анион-радикалы с помощью фермента супероксиддисмутазы подвергаются разрушению с образованием H_2O_2 . Далее перекись водорода разрушается с помощью других ферментов - каталазы и пероксидазы.

Поэтому в последующих экспериментах мы сравнили активность гваяколпероксидазы и каталазы, которые ответственны за ликвидацию H_2O_2 в клетках двух генотипов картофеля. Как показывают данные таблица 9., активность гваяколпероксидазы и каталазы у изученных клонов не сильно различалась. Активность гваяколпероксидазы в листе у клона №26 составила 16.83, у сорта Таджикистан 17.08 а у клона 52/6 – 11.35 и сорта Пикассо 11.0 мкмоль/г сырой массы (Таблица 5.4). Такой же характер имел место и в корнях этих клонов. Так, в корнях у клона №26 активность этого же фермента составила 11.44 мкмоль/г сырой массы, а у клона 52/6 – 12.14 мкмоль/г сырой массы.

Следует отметить, что активность гваяколпероксидазы в корнях у изученных генотипов картофеля несколько различается; активность у клона №52/6 несколько выше, чем у клона №26 и сорта Таджикистан. Такие же результаты получены при определении активности фермента-каталазы. Активность каталазы у клона №52/6 и сорта Пикассо в листе и в корнях была несколько ниже, чем у клона №26 и сорта Таджикистан.

Таблица 5.4. Активность антиоксидантных ферментов в растениях-регенерантах *in vitro*

Клон-гибриды / Сорта		Активность гваяколпероксидазы/мкмоль/г сырой массы мин.	Активность каталазы/мкмоль H ₂ O ₂ /г сырой массы, мин.
№26	лист	16.83±1.44	6808±121
	корень	11.44±1.31	3215±197
№52/6	лист	11.35±1.23	5803±118
	корень	12.14±1.16	2379±107
Таджикистан	лист	17.08±1.08	6908±101
	корень	11.84±1.01	3810±104
Пикассо	лист	11.0±1.43	5608±130
	корень	11.87±1.06	2265±123

Как известно, в основе устойчивости растений лежит их способность сохранять равновесие между про-и антиоксидантной системами защиты. В основе развития окислительного стресса лежит генерация АФК. Необходимо отметить, что у растений картофеля клона №52/6 уровень накопления АФК несколько выше, чем у клона №26, что свидетельствует о слабом развитии или меньшей эффективности системы защиты у этого клона. Этим можно объяснить значительную активность антиоксидантных ферментов: гваяколпероксидазы и каталазы как надземной, так и подземной части

растений. Итак, полученные нами данные указывают на то, что растения картофеля клонов №52/6 и №26 несколько отличаются по некоторым физиолого-биохимическим параметрам в изученных нами условиях *in vitro*, но общая активность антиоксидантных ферментов и системы про-оксидантов находится в равновесном состоянии, которое можно назвать перекисным гомеостазом, являющимся фактором адаптации растений, что подтверждается формированием у растений микроклубней в этих условиях. Видимо, равновесное состояние системы анти-и окислительных процессов является специфическим для каждого клон-гибрида и сорта картофеля и меняется в зависимости от условий выращивания растений, что и служило последующей задачей.

5.2. Антиоксидантная активность ферментов в условиях *ex vitro*

Источниками АФК являются хлоропласты, митохондрии, пероксисомы и цитозоль. В хлоропластах АФК образуется при прямом потоке электронов к кислороду (реакция Мелера). Более того, при фотодыхании генерация H_2O_2 происходит на стадии образование глиоксилата из гликолата [133]. В митохондриях образование АФК происходит главным образом в двух участках цепи переноса электронов: НАДФ-дегидрогеназах и комплексе цитохрома. АФК являются неизбежными продуктами аэробного метаболизма и могут вызывать перекисное окисление липидов и, как следствие, повреждение мембран, деградацию белков, инактивацию ферментов, повреждение ДНК.

Изменения активности антиоксидантных ферментов после переноса растений *ex vitro* зависели от освещенности. Активность СОД не изменялась при низкой освещенности, в то время как при высокой освещенности она сначала снижалась, а затем возрастала. Активность КАТ увеличивалась после трансплантации больше при низкой, чем при высокой освещенности [165].

Повреждающее действие АФК зависит от эффективности антиоксидантных систем, включающих низкомолекулярные антиоксиданты,

а также ряд антиоксидантных ферментов. Реакция дисмутации супероксида катализируется супероксиддисмутазой, превращающей его в радикал O_2 и H_2O_2 . Следует отметить, что при культивировании *in vitro* также наблюдается устойчивость растений может образование АФК и окислительный стресс [85, 136]. Кроме того, при переносе проростков, выращенных *in vitro*, в условия *ex vitro* часто наблюдается водный стресс и/или фотоингибирование [105, 143]. Эти стрессы также могут быть факторами, способствующими образованию активных форм кислорода и, как следствие, окислительному стрессу. Для успешного переноса растений *ex vitro* очень важно, чтобы они обладали достаточным количеством антиоксидантов, образовавшихся в ходе предшествующего роста *in vitro*. Не менее важной является способность клеток растений-регенерантов картофеля к индукции антиоксидантов при переносе *ex vitro*, однако об этих изменениях до сих пор известно немного.

В нормальных условиях АФК вырабатываются в растительных клетках в небольших количествах: концентрация супероксидного анион-радикала и гидроксильного радикала составляет около 10^{-11} М, а концентрация гидропероксидного радикала – 10^{-88} М. [50, 6,61]. В условиях стресса образование АФК может резко увеличиться, что приводит к угнетению защитных систем организма [40,38].

Для решения этого вопроса был использован клон-гибрид №26. Нами было показано, что данный генотип интенсивнее реагирует на действие водного стресса и характеризовался достаточно высокой устойчивостью к действию данного стресса [58, 23]. Вместе с тем, эти данные полностью не раскрывают специфичность функции антиоксидантных ферментов в органах растения и не раскрывают активность конкретных АФК-окисляющих антиоксидантных ферментов в листьях и корнях растений.

Для того, чтобы измерять активность фермента пероксидазы, необходимым является определение оптимума функции в зависимости от рН-буфера для экстракции. рН реакционной среды влияет на уровень ионизации

функциональных группировок активных центров ферментов. Как видно из рисунок 5.5, зависимость активности ферментов каталазы и гваяколпероксидазы от рН-среды существенно отличалась. Оптимальное значение активности фермента каталазы соответствует рН-5.6, а гваяколпероксидазы рН-7.6, что было использовано нами в дальнейшей работе для определения активности антиоксидантных ферментов (Рисунок 5.1).

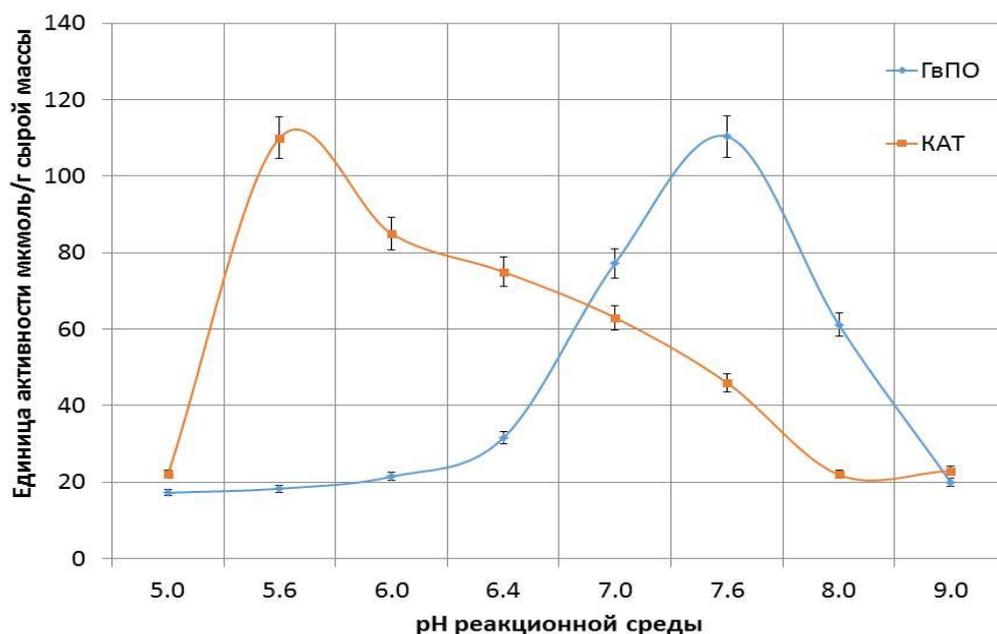


Рисунок 5.1. Зависимость активности ферментов гваяколпероксидазы (ГвПО) и каталазы (КАТ) от pH реакционной среды

На рисунке 5.2 и 5.3 видно, что в условиях *in vitro* активность гваяколпероксидазы и каталазы была значительно ниже, чем в условиях *ex vitro*. При переводе растений-регенерантов в условия *ex vitro* резко повысилась активность как гваяколпероксидазы, так и каталазы с последующим переходом на стационарный уровень.

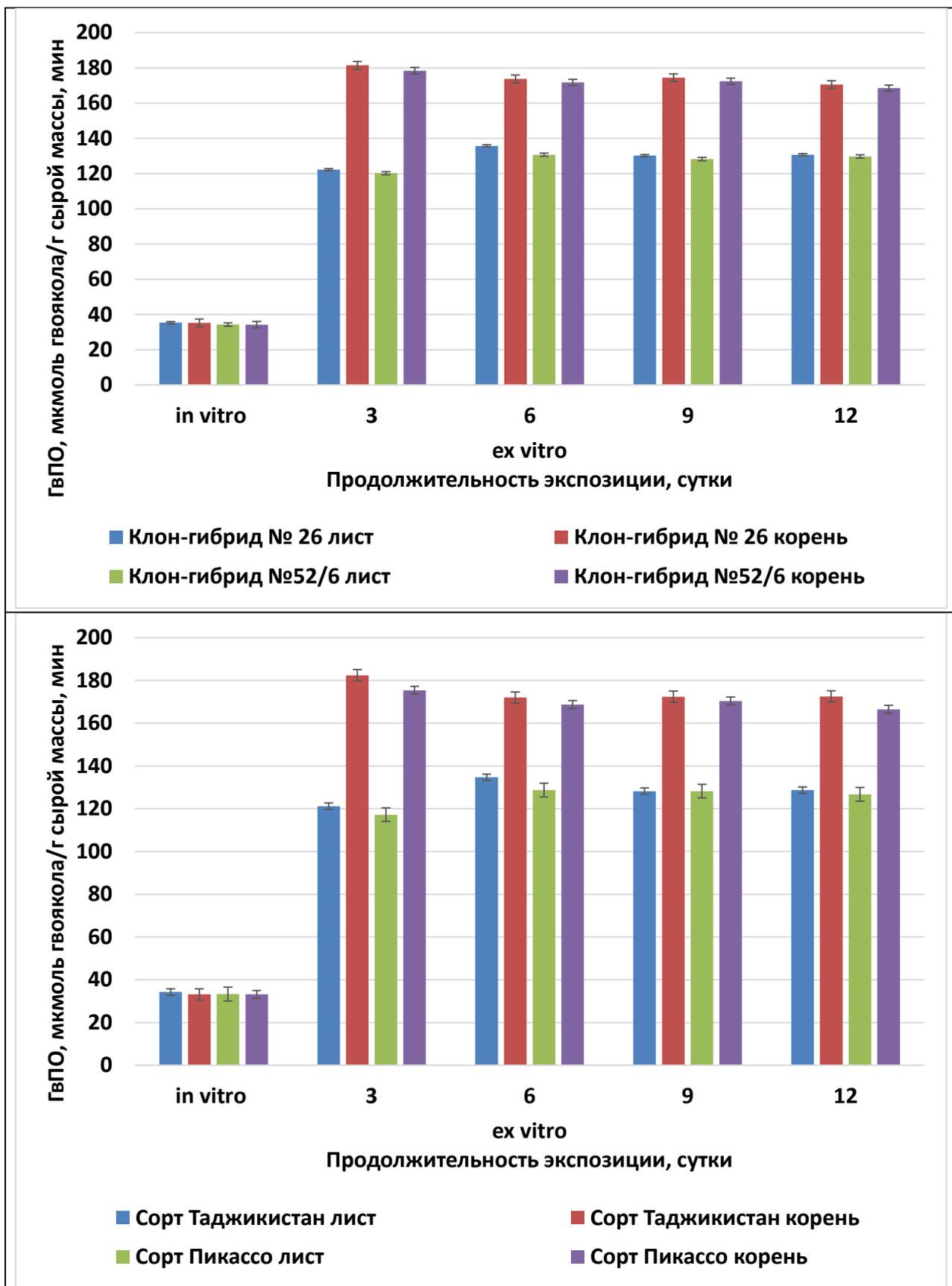


Рисунок 5.2. Активность гваяколпероксидазы в листьях и корнях растений картофеля в условиях *in vitro* и *ex vitro*

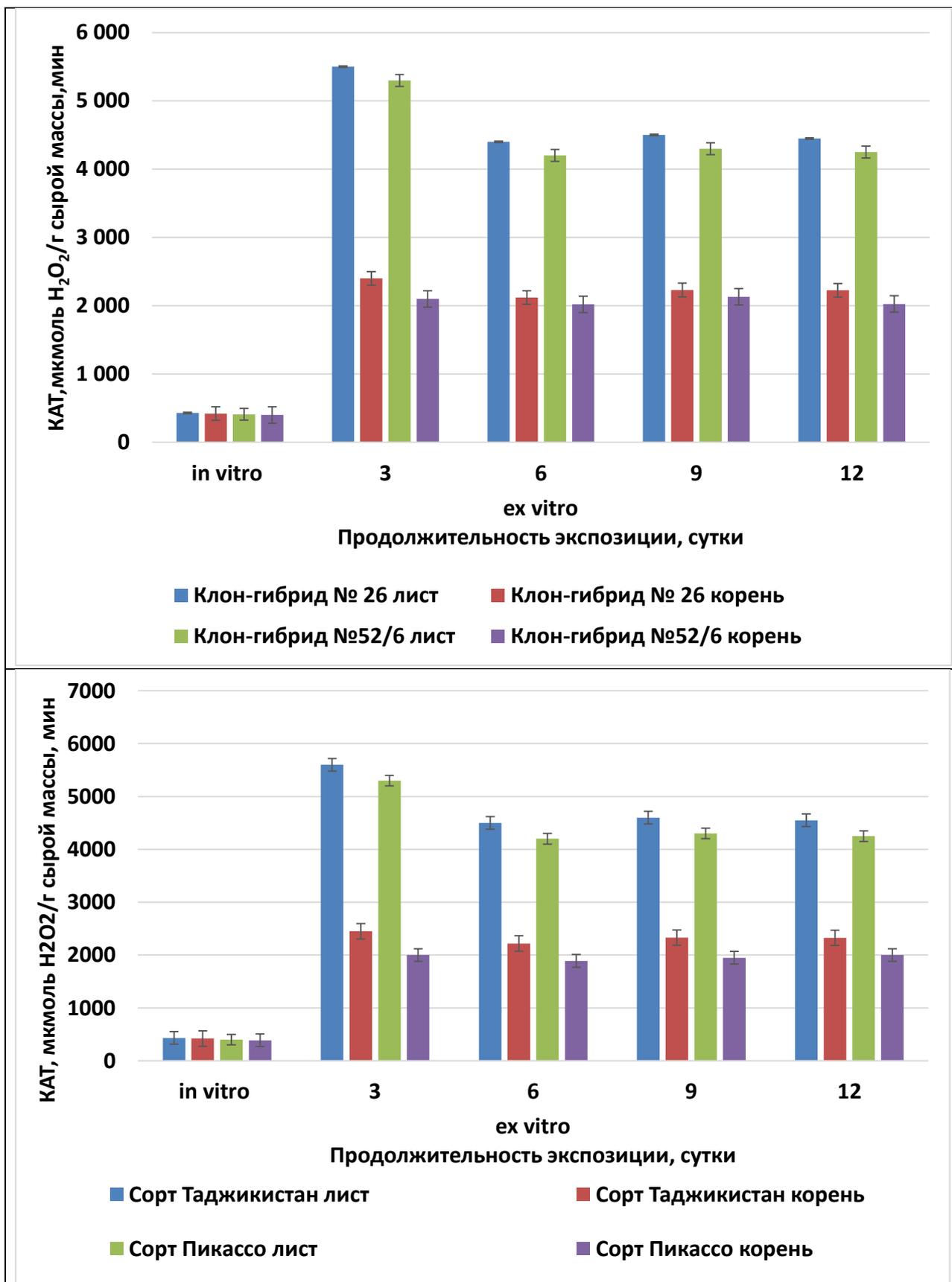


Рисунок 5.3. Активность каталазы в листьях и корнях растений картофеля в условиях *in vitro* и *ex vitro*

Характер проявления активности ферментов (гваяколпероксидазы, каталазы) при продолжительном выдерживании растений в условиях *ex vitro* существенно отличался как в листьях, так и в корнях, т.е. активность гуаяколпероксидазы в корнях в течение всего эксперимента менялась неоднозначно и была ниже, чем в листьях. Активность каталазы как в листьях, так и в корнях в течение всего эксперимента менялась значительно больше, чем активность фермента гуаяколпероксидазы.

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы: во-первых, системы антиоксидантной защиты у растений органоспецифичны; во-вторых, активность изученных ферментов в корнях выше, чем в листьях, это дает возможность высказывать мысль о том, что основной механизм устойчивости растений к стрессорному воздействию определяется, главным образом, сосредоточением антиоксидантов в корневой системе растений. Высокая активность гуаяколпероксидазы в корнях связана с процессом лигнификации и суберинизации [64, 65, 66, 68, 67]. В-третьих, полученные результаты показали, что при продолжительном выращивании растений-регенерантов в условиях *ex vitro* активность каталазы в листьях была значительно выше, чем в корнях.

Таким образом, полученные в данной работе результаты позволяют заключить, что корневая система растений картофеля обладает высоким потенциалом устойчивости в отличие от листьев. Это связано с высоким уровнем активности антиоксидантных ферментов, особенно гуаяколпероксидазы.

5.3. Индукция антиоксидантной системы растений картофеля в условиях засухи

Повышение температуры воздуха, происходящее вследствие глобального изменения климата, ведёт к дисбалансу природных экосистем, что чревато нарушением режима выпадения осадков, температурными аномалиями и увеличением частоты таких явлений, как наводнение и засуха.

Как правило, засуха приводит к снижению продуктивности сельскохозяйственных культур, т. к. вызывает подавление роста и развития растений, нарушение ряда физиолого-биохимических процессов, таких как фотосинтез и дыхание, а также сопровождается развитием окислительного стресса [49, 50, 59].

Окислительный стресс является неизбежным следствием экологических стрессов. Накопление АФК начинается в хлоропластах, а затем распространяется по всей клетке. Активация вторичных источников АФК, например, комплексов НАДФН-оксидазы или фотодыхания, приводила к существенному накоплению H_2O_2 в цитозоле. Чтобы избежать вредных эффектов АФК, развилось несколько компартмент-специфических механизмов, включая накопление низкомолекулярных антиоксидантов (глутатион, аскорбат), ферментов (каталазы, аскорбат-пероксидазы и натриевые дисмутазы) и белковых тиолов (пероксиредоксины, глутаредоксины и тиоредоксины), которые подвергаются обратимым циклам тиол-дисульфидного обмена. Стресс-индуцированное накопление АФК стимулирует окисление глутатиона и в то же время *de novo* синтез.

К антиоксидантной системе защиты растений относятся высокомолекулярные ферменты-антиоксиданты, такие как супероксиддисмутаза (СОД), пероксидазы, каталаза и неэнзиматические соединения: аскорбат, гваякол, глутатион, токоферол, каротиноиды, антоцианы и др. [138, 136, 60]. Ранее [35] нами было показано, что некоторые устойчивые к соли растения картофеля имеют более высокий уровень активности фермента СОД в отличие от чувствительных генотипов. Устойчивые к стрессу (засуха, засоление) растения обладают механизмами более интенсивного ингибирования АФК и имеют эффективную систему антиоксидантной защиты [49, 52, 27, 28].

Водный статус растений во-многом определяет рост, развитие, продуктивность и адаптивность растений, особенно в условиях засухи.

Основными показателями водного статуса являются относительное содержание воды и водный дефицит. Водный дефицит мы инициировали добавлением в среду ПЭГ, на рисунок 5.5 представлены опыты с использованием ПЭГ, и показано что при добавлении в среду ПЭГ в условиях *ex vitro* наблюдается замедление роста растений и слабое образование корней. Следует отметить, что у клона №52/6 корневая система практически не формируется в присутствии ПЭГ, а у клона №26 отмечено слабое развитие корневой системы. Нами обнаружено отличие клона №26 от клона №52/6 в условиях стресса, т.е. при добавлении в среду ПЭГ (Рисунок 5.4., 5.5).

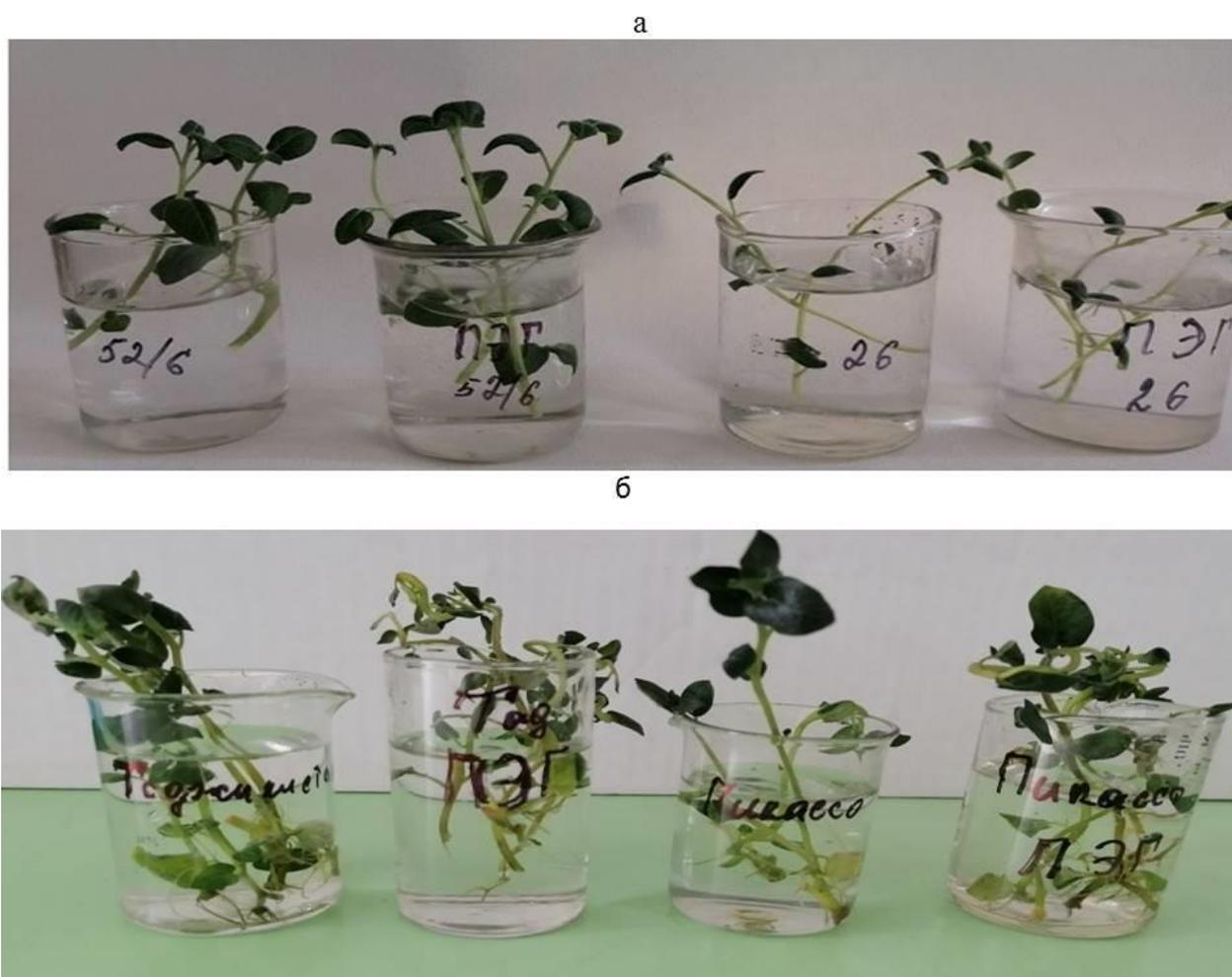


Рисунок 5.4. Влияние ПЭГ-6000 на содержание воды и водный дефицит в условиях *ex vitro* а) клон - гибридов №52/6 и №26 б) Сортов Пикассо и Таджикистан в течение 24ч

а



б



Рисунок 5.5. Влияние ПЭГ-6000 на формирование корневой системы у клон - гибридов и сортов картофеля в течение 60 ч. Обозначения: а) 1 клон гибрид №52/6 (контроль); 2- клон гибрид №52/6 (опыт); 3- клон гибрид №26 (контроль);4- клон гибрид №26 (опыт), б)1- Сорт Пикассо (контроль); 2- Сорт Пикассо (опыт); 3- Сорт Таджикистан (контроль);4- Сорт Таджикистан (опыт)

Определение содержания воды и водного дефицита в растениях клон - гибридов картофеля в условиях кратковременной засухи (24 ч), имитируемой 6% ПЭГ-6000. В таблице 5.5 показано, что в контрольном варианте содержание воды в листьях генотипов картофеля №26 и №52/6 и сортов Таджикистан и Пикассо отличается незначительно (на 2%), а водный дефицит выше (на 7.8%) у растений клон -гибрида №52/6. В условиях засухи у клон-гибрида №26 содержание воды снижается в меньшей степени, чем у клон-гибрида №52/6 (на 9 и 15% соответственно). Обратную картину при воздействии ПЭГ-6000 наблюдали для показателя водного дефицита. Так, водный дефицит у растений клон-гибрида №52/6 был почти в два раза выше, чем у клон-гибрида №26. На основании изучения влияния засухи, моделированной ПЭГ-6000, на показатели водного режима генотипов картофеля можно предположить, что растения картофеля клон-гибрида №26 и сорта Таджикистан проявляют большую устойчивость к засухе, чем клон-гибрид №52/6 и сорт Пикассо.

Таблица 5.5. - Влияние ПЭГ-6000 (6%) в питательном растворе на содержание воды и водный дефицит у растений картофеля

Клон-гибриды / Сорта	Варианты опыта	Содержание воды, %	% от контроля	Водный дефицит, %	% от контроля
№26	контроль	94±4	100	14.4±1.8	100
	ПЭГ	86±2	91	16.6±1.4	116.1
№52/6	контроль	92±3	100	22.2±1.5	100
	ПЭГ	79±2	85	31.3±2.1	140.9
Таджикистан	контроль	98±0.8	100	15.3±0.7	100
	ПЭГ	88±1.0	90	17.7±0.9	115.6
Пикассо	контроль	90± 0.7	100	20.8±0.7	100
	ПЭГ	74±4	82	28.4±1.7	136.5

Известно, что МДА служит маркером ПОЛ и по динамике его накопления можно судить о развитии окислительного стресса и, следовательно, об устойчивости растений к стрессовым факторам. Воздействие растворов полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000) эффективно использовалось для имитации стресса от засухи с ограниченными метаболическими нарушениями, связанными с использованием низкомолекулярных осмолитов, которые могут усваиваться растением. Засуха приводит к снижению содержания воды в тканях, что приводит к снижению тургора листьев и, как следствие, к замедлению удлинения клеток [78]. Определение содержания МДА у растений двух генотипов картофеля в условиях засухи показало, что кратковременное воздействие ПЭГ-6000 (24 ч) на растения привело к изменению содержания МДА (Таблица 5.6). Наибольшее увеличение содержания МДА наблюдалось у клон-гибрида №52/6, в отличие от клон-гибрида №26. При более длительном воздействии ПЭГ-6000 (72 ч) уровень накопления МДА возрастал у обоих генотипов картофеля, у клон-гибрида №26 на 22% по отношению к контролю, тогда как в листьях клон-гибрида №52/6 содержание МДА увеличилось более чем в 2 раза по отношению к контролю.

Полученные результаты по накоплению МДА указывают на разный уровень устойчивости использованных нами генотипов картофеля к условиям засухи (ПЭГ). Вероятно, незначительное изменение накопления МДА в листьях клон-гибрида картофеля №26 в условиях засухи обусловлено его большей устойчивостью, а клон-гибрид №52/6 обладает сниженным механизмом защиты от окислительного стресса, что может быть связано с различной активностью фермента СОД, участвующего в первой линии защиты растений в условиях стресса.

Таблица 5.6. - Влияние ПЭГ-6000 (6%) на содержание МДА (мкм/г сырой массы) в листьях клон-гибридов картофеля

Клон-гибриды / Сорта	Вариант опыта	Время воздействия ПЭГ-6000			
		24 ч		72 ч	
		содержание МДА	% от контроля	содержание МДА	%
№26	контроль	14.7±0.9	100	18.5±0.3	100
	ПЭГ 6%	17.9±1.2	108	22.72±1.3	122
№52/6	контроль	19.4±0.7	100	17.4±0.8	100
	ПЭГ 6%	27.4±1.7	142	38.5±1.9	223
Таджикистан	контроль	15.4±0.8	100	19.7±0.7	100
	ПЭГ 6%	18.2±1.1	118	24.9±1.0	126
Пикассо	контроль	18.7±0.9	100	16.7±0.9	100
	ПЭГ 6%	25.4±1.2	136	27.9±1.2	167

Исследование влияния засухи в модельных опытах с использованием ПЭГ-6000 показало (таблица 5.7), что активность антиоксидантного фермента СОД в листьях у изученных генотипов картофеля при кратковременной засухе (24 ч) отличалась незначительно как в контрольном, так и в опытном варианте. При этом общая активность фермента СОД в корнях растений картофеля в контрольном варианте была в два раза ниже, чем в листьях. Более длительное воздействие ПЭГ-6000 (72 ч) привело к увеличению активности фермента СОД в листьях растений, но в разной степени у изученных генотипов. В листьях растений клон-гибрида №26 активность этого фермента в условиях длительной засухи была выше, чем в контроле на 120%, а у растений №52/6 - на 63%. В корнях растений картофеля в условиях длительного воздействия ПЭГ-6000 (72 ч) уровень активности СОД также повышался, но был значительно ниже, чем в листьях (Таблица 5.7).

Таблица 5.7. - Активность СОД (ед. активности/г сырой массы) в разных частях растений при воздействии ПЭГ-6000

Клон-гибриды / Сорта	Вариант опыта	Активность СОД			
		24 ч воздействия ПЭГ		72 ч воздействия ПЭГ	
		лист	корень	лист	корень
№26	контроль	9.83±1.32	4.45±0.65	10.22±1.74	5.11±0.44
	ПЭГ	12.44±1.92	8.55±1.62	22.53±2.43	9.45±1.47
№52/6	контроль	12.06±0.34	3.72±0.94	14.76±2.33	5.12±0.77
	ПЭГ	13.44±2.33	4.14±0.39	24.14±3.11	7.18±1.12
Таджикистан	контроль	9.88±1.2	4.85±0.75	11.02±1.85	5.71±0.56
	ПЭГ	12.85±1.62	9.55±1.72	23.33±1.03	10.0±1.09
Пикассо	контроль	10.3±1.0	3.45±0.60	15.2±0.74	5.51±0.75
	ПЭГ	11.48±1.72	4.55±1.02	20.53±2.43	6.45±1.07

На основании полученных данных можно заключить, что возрастание активности антиоксидантного фермента в условиях длительной засухи обусловлено наличием систем регуляции активации фермента СОД на уровне генома, либо на уровне протеома, обеспечивающего синтез этого фермента *de novo*.

Учитывая тот факт, что фермент СОД функционирует во всех компартментах клетки [36], представляло интерес определить активность фермента в хлоропластах и цитозоле в условиях засухи у изучаемых клон-гибридов. Среди ферментативных систем защиты супероксиддисмутаза (СОД) (ЕС 1.15.1.1), являются первой линией защиты от окислительного

повреждения и присутствуют повсеместно в каждой клетке всех типов растений. Являясь основной системой защиты растений от окислительного стресса. СОД катализирует превращение или дисмутацию токсичных супероксиданион-радикалов в перекись водорода и молекулярный кислород. Супероксиддисмутазы являются повсеместными металлоферментами, которые составляют первую линию защиты от активных форм кислорода (АФК). Он представляет собой один из основных ферментативных компонентов детоксикации супероксидных радикалов, образующихся в биологической системе путем катализации их дисмутации до H_2O_2 и, наконец, до H_2O и O_2 каталазой и пероксидазой. Большинство видов растений содержат многочисленные изоформы СОД, различающиеся по ионам металлов в их активном центре, а именно Cu/Zn- СОД, Mn- СОД и Fe-СОД. Во многих исследованиях также сообщалось, что уровень толерантности растений положительно коррелирует с активностью СОД, а также с количеством изоформ СОД, и был установлен тот факт, что "Чем выше активность СОД, тем выше устойчивость к стрессу". Следовательно, профиль изофермента СОД любого растения может быть использован в качестве стабильного маркера устойчивости растений к стрессу [36].

Результаты исследований показали (Таблица 5.8), что в листьях клон-гибрида картофеля №26 в контрольном варианте активность СОД в хлоропластах выше, чем в цитозоле, а в листьях клон-гибрида №52/6 активность СОД в цитозоле выше, чем в хлоропластах. Такая закономерность наблюдалась как в контрольном, так и в опытном вариантах (в условиях засухи, моделируемой ПЭГ). Более того, следует отметить, что активность СОД в хлоропластах растений клон-гибрида картофеля №26 и сорта Таджикистан выше, чем у генотипа №52/6 и сорта Пикассо как в контрольном, так и в опытном вариантах. Можно предположить, что высокая активность СОД в хлоропластах клон-гибрида №26 способствует сохранению уровня МДА в клетках растений этого генотипа как в норме, так

и в условиях стресса, тогда как снижение активности этого фермента в хлоропластах клон-гибрида №52/6 сопровождается более высокими значениями содержания МДА. Более высокая активность СОД в условиях засухи в хлоропластах клон-гибрида №26 свидетельствует о том, что у этого генотипа функционирует более мощная антиоксидантная система, обезвреживающая активные формы кислорода, в отличие от генотипа №52/6.

Таблица 5.8. - Активность СОД в хлоропластах и цитозоле листьев картофеля при воздействии засухи (72 ч)

Клон-гибриды / Сорта	Вариант опыта	Активность СОД, ед. активности/г сырой массы	
		хлоропласты	цитозоль
№26	контроль	18.83±2.24	6.48±0.03
	ПЭГ	25.25±3.44	8.94±1.39
№52/6	контроль	14.93±1.39	12.44±1.74
	ПЭГ	17.72±1.98	28.53±2.28
Таджикистан	контроль	19.08±1.24	7.08±0.09
	ПЭГ	25.85±0.49	8.04±1.09
Пикассо	контроль	13.83±0.24	9.88±0.73
	ПЭГ	15.85±1.44	11.04±1.24

Таким образом, полученные нами результаты указывают на то, что изученные генотипы картофеля отличаются по интенсивности ПОЛ, активности СОД и по водному гомеостазу в условиях засухи, имитированной ПЭГ-6000. Закономерность изменчивости общей активности СОД свидетельствует о генетическом контроле синтеза фермента СОД и наличии регуляторной системы, обеспечивающей повышенный адаптационный потенциал клон-гибрида №26 в условиях воздействия стресса. Сравнительный анализ активности СОД в разных компартментах клетки (хлоропласты, цитозоль) показал, что система защиты от воздействия

стрессоров в хлоропластах более высокая, чем в цитозоле, независимо от генотипов (клон №26, клон №52/6, сорт Таджикистан, сорт Пикассо).

5.4. Перекисное окисление липидов у растений *Solanum tuberosum* L. в условиях *ex vitro*

Основной причиной повреждения растений при воздействии неблагоприятных факторов является развитие окислительного стресса, приводящего к перекисному окислению липидов (ПОЛ) мембран клеточных структур, снижению степени ненасыщенности жирных кислот и, следовательно, к изменению вязкости мембраны, которые тестируются по образованию малонового диальдегида (МДА) [29, 49, 60].

Малоновый диальдегид (МДА) представляет собой органическое соединение с номинальной формулой $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$. Малоновый диальдегид может вырабатываться окислителями, которые изменяют структуру липидов и вызывают перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот. Малоновый диальдегид является одной из наиболее широко измеряемых неферментативно образующихся реакционноспособных электрофильных форм и обычно используется в качестве маркера окислительного стресса. Вместе с тем содержание АФК и низкомолекулярных антиоксидантов и ферментов системы защиты определяет адаптации растений к действию экстремальных факторов среды, поскольку указывает на устойчивость растений к стрессорам различной природы [46, 10, 19], которые зависят от генотипа и условиям выращивания. Однако причины, сдерживающие интенсивность образования АФК или его стимулирование у генотипов, отличающихся по продуктивности и устойчивости картофеля в системах *ex vitro* и *in vitro*, недостаточно изучены.

У растений основными механизмами устойчивости к водному стрессу являются накопление активных форм кислорода, синтез антиоксидантных ферментов, синтез специфических белков (гидрофилинов, дегидринов, шаперонинов) и осмотическая регулировка, опосредованная совместимыми

осмолитами 5-8. Водный стресс снижает доступность воды в цитоплазме клеток, влияя на их гомеостаз. Недостаток воды в клетках вызывает осмотический и окислительный стресс, нарушая физиологические, биохимические и молекулярные процессы [9, 5].

Моделирование осмотического стресса *in vitro* с использованием осмотических агентов является эффективным методом, обеспечивающим контролируемую и однородную среду для изучения различных механизмов реакции на водный стресс [7, 11]. Высокомолекулярный полиэтиленгликоль (ПЭГ) хорошо растворим в воде и не проникает в клетки, создает отрицательный осмотический потенциал в культуральной среде, не вызывая токсичности, и является одним из наиболее широко используемых осмотических агентов для изучения стресс - эффектов воды *in vitro* у растений [39, 12].

Знаний о поведении антиоксидантного аппарата во время акклиматизации *ex vitro* очень мало, и лишь немногие исследователи изучали изменения ферментативных и неферментативных антиоксидантов во время этого процесса.

В связи с этим в задачу данной работы входило изучение показателей, характеризующих состояние про-и антиокислительных систем в условиях *in vitro* и *ex vitro* на примере двух отличающихся по устойчивости генотипов картофеля.

Для этого были использованы клон-гибриды №26 и №52/6. Результаты анализа содержания МДА в листьях и корнях клон-гибрида №26 клона №52/6 и сортов Таджикистан и Пикассо представлены на рисунке 5.6. Как видно из рисунка 5.6, низкое содержание МДА как в листьях, так и в корнях наблюдалось в условиях *in vitro*.

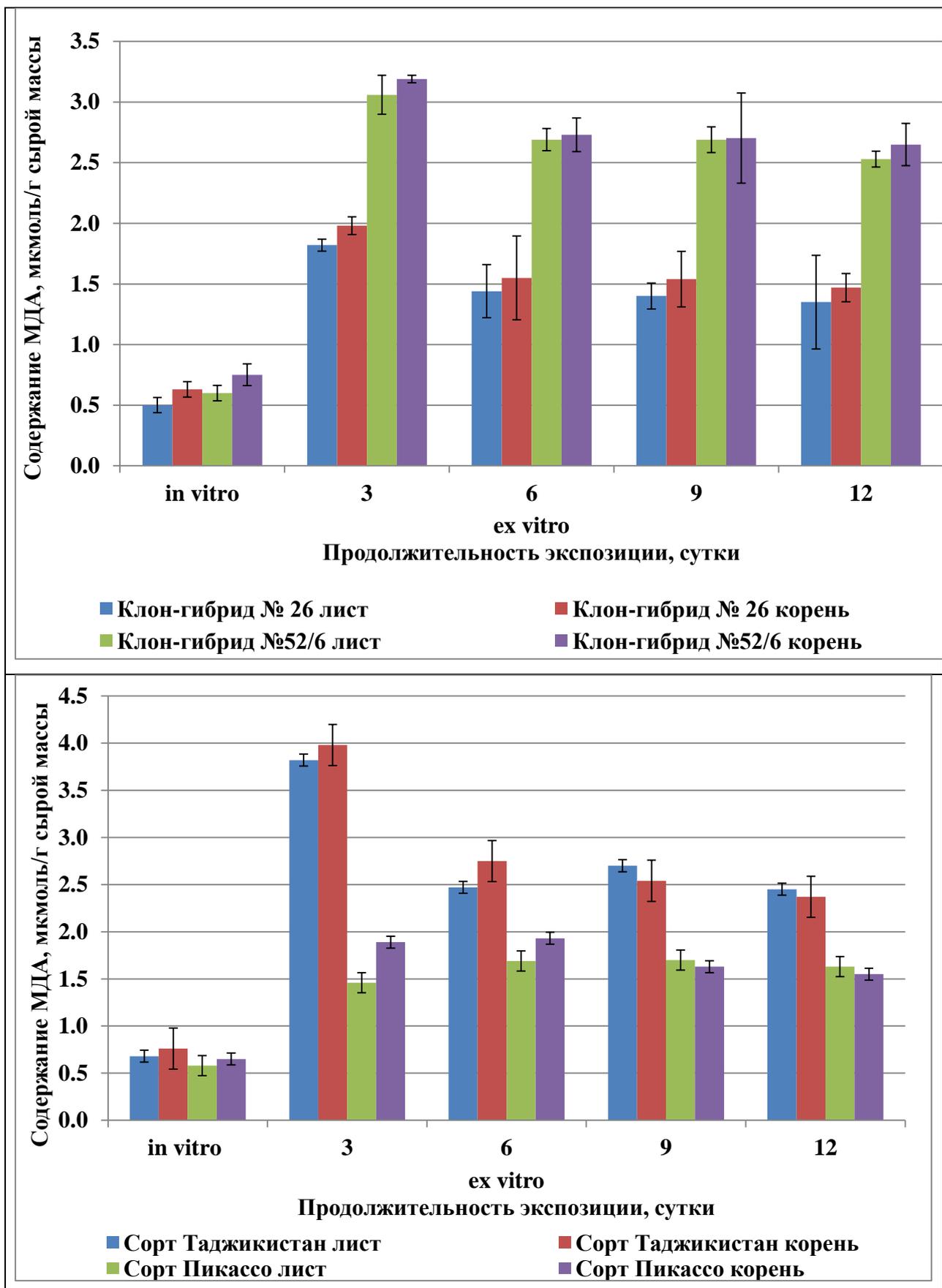


Рисунок 5.6. Содержание малонового диальдегида МДА в листьях и корнях растений картофеля в условиях *in vitro* и *ex vitro*

При переводе растений-регенерантов в условия *ex vitro* происходило быстрое накопление МДА в течение последующего их выращивания в водно-минеральной смеси МС. Такая тенденция быстрого накопления МДА отмечалась в течение 3-х - 9-ти суток с последующим падением его содержания. Характер накопления МДА в листьях и корнях при переводе растений в условия *ex vitro* несколько отличается. Содержание МДА в листьях в первые 3 и 6 суток было гораздо выше, чем в корнях.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в клетке растений существуют две фазы: чувствительная, кратковременная (до 3-х суток) и продолжительная, специфическая (от 6-ти до 12 суток). Эти фазы в листьях и корнях отличаются по уровню накопления МДА и H_2O_2 .

Результаты, представленные на рисунке 5.6, свидетельствуют о том, что клон № 52/6 и сорт Пикассо продуцируют больше МДА, чем клон №26 и сорт Таджикистан. Эти результаты указывают, что клон №26 и сорт Таджикистан более устойчивы, чем клон №52/6 и сорт Пикассо. Но характер изменения содержания МДА в листе и корнях у клона №52/6 и клона №26 одинаков, независимо от продолжительности экспозиции.

Повышение уровня содержания МДА может быть связано с быстрым увеличением содержания H_2O_2 (Рисунок 5.7), которое в последующем периоде выращивания выходит на стационарный уровень. Уровень накопления H_2O_2 в условиях *ex vitro* в корнях был значительно выше, чем в листьях.

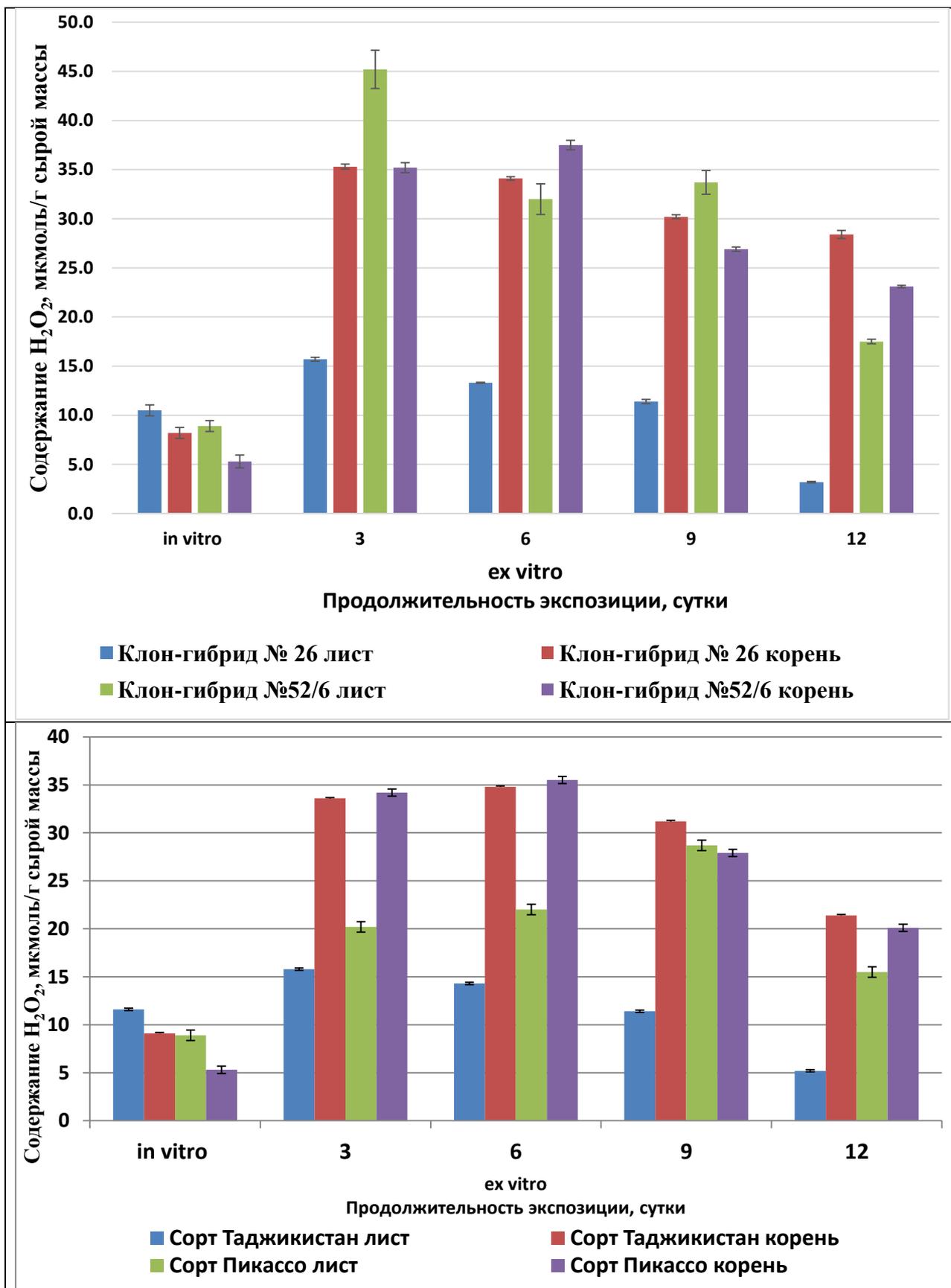


Рисунок 5.7. Содержание перекиси водорода в листьях и корнях растений картофеля в условиях *in vitro* и *ex vitro*

Данные рисунка 5.7 указывают, что накопление H_2O_2 у клон №52/6 и сорта Пикассо имеет такой же характер, что и у клона №26 и сорта Таджикистан. Содержание H_2O_2 в условиях *in vitro* существенно ниже, чем при экспозиции в условиях *ex vitro*. Наблюдается более высокое содержание H_2O_2 в корнях, выше чем в листьях. Единственное отличие заключается в том, что у клона №52/6 содержание H_2O_2 в листе больше при экспозиции, чем у клона №26, что, возможно, указывает на меньшее функционированием пероксидазных ферментов у клона №52/6.

Чувствительная фаза и в листьях, и в корнях характеризуется повышением содержания H_2O_2 и интенсивным образованием МДА. А специфическая фаза (от 6-ти до 12 суток) по этим показателям не имеет такой тенденции: наблюдается переход на стационарный уровень, что незамедлительно отражалось на активности антиоксидантных ферментов.

МДА имел достоверную положительную корреляцию с содержанием H_2O_2 в условиях *ex vitro* (Таблица . 5.9 - 5.12). Корреляционный анализ Пирсона выявил значительную положительную корреляцию между МДА и H_2O_2 ($R = 0.997$) (от 3-ти до 12 суток) в условиях *ex vitro* у клон-гибрид №26. Наблюдались значительные отрицательные корреляции между содержанием H_2O_2 *in vitro*, МДА и H_2O_2 *ex vitro* (от 3-ти до 12 суток) ($R = -0.997$) у клон-гибрид №26. На таблица 5.11 показаны положительные корреляции между содержанием H_2O_2 *ex vitro* (от 3-ти до 12 суток) и МДА *ex vitro* (от 6-ти до 12 суток) у сорт Таджикистан.

Общее содержание МДА отрицательно коррелировало с концентрацией H_2O_2 *in vitro* для всех растений. Наблюдались положительные корреляции МДА и концентрации H_2O_2 *ex vitro* (от 6 и 12 суток) ($R = 0.525$ до 0.991) у клон-гибрид № 52/6.

Таблица 5.9.- Корреляция Пирсона между содержанием МДА и H₂O₂ в листьях и корнях у клон-гибрид №26 в условиях *in vitro* и *ex vitro*

	МДА, 3 сутки	МДА, 6 сутки	МДА, 9 сутки	МДА, 12 сутки	H ₂ O ₂ in vitro	H ₂ O ₂ , 3 сутки	H ₂ O ₂ , 6 сутки	H ₂ O ₂ , 9 сутки	H ₂ O ₂ , 12 сутки	МДА in vitro
МДА, 3 сутки	1	0.991	0.973	0.997	-0.977	0.993	0.991	0.993	0.987	0.931
МДА, 6 сутки	0.991	1	0.978	0.998	-0.942	0.989	0.99	0.99	0.965	0.967
МДА, 9 сутки	0.973	0.978	1	0.981	-0.946	0.981	0.984	0.985	0.975	0.923
МДА, 12 сутки	0.997	0.998	0.981	1	-0.96	0.993	0.993	0.994	0.978	0.951
H ₂ O ₂ in vitro	-0.977	-0.942	-0.946	-0.96	1	-0.972	-0.968	-0.972	-0.993	-0.853
H ₂ O ₂ , 3 сутки	0.993	0.989	0.981	0.993	-0.972	1	1	1	0.987	0.948
H ₂ O ₂ , 6 сутки	0.991	0.99	0.984	0.993	-0.968	1	1	1	0.986	0.951
H ₂ O ₂ , 9 сутки	0.993	0.99	0.985	0.994	-0.972	1	1	1	0.989	0.945
H ₂ O ₂ , 12 сутки	0.987	0.965	0.975	0.978	-0.993	0.987	0.986	0.989	1	0.886
МДА in vitro	0.931	0.967	0.923	0.951	-0.853	0.948	0.951	0.945	0.886	

Таблица 5.10.- Корреляция Пирсона между содержанием МДА и H₂O₂ в листьях и корнях у клон-гибрид №52/6 в условиях *in vitro* и *ex vitro*

	МДА, 3 сутки	МДА, 6 сутки	МДА, 9 сутки	МДА, 12 сутки	H ₂ O ₂ in vitro	H ₂ O ₂ , 3 сутки	H ₂ O ₂ , 6 сутки	H ₂ O ₂ , 9 сутки	H ₂ O ₂ , 12 сутки	МДА in vitro
МДА, 3 сутки	1	0.975	0.665	0.996	-0.973	-0.979	0.977	-0.975	0.984	1
МДА, 6 сутки	0.975	1	0.81	0.968	-0.908	-0.923	0.922	-0.914	0.928	0.975
МДА, 9 сутки	0.665	0.81	1	0.639	-0.491	-0.523	0.525	-0.504	0.535	0.665
МДА, 12 сутки	0.996	0.968	0.639	1	-0.984	-0.99	0.989	-0.986	0.991	0.996
H ₂ O ₂ in vitro	-0.973	-0.908	-0.491	-0.080	1	0.999	-0.999	1	-0.998	-0.973
H ₂ O ₂ , 3 сутки	-0.979	-0.923	-0.523	-0.99	0.999	1	-0.999	1	-0.999	-0.979
H ₂ O ₂ , 6 сутки	0.977	0.922	0.525	0.989	-0.999	-0.999	1	-0.999	0.998	0.977
H ₂ O ₂ , 9 сутки	-0.975	-0.914	-0.504	-0.986	1	1	-0.999	1	-0.999	-0.975
H ₂ O ₂ , 12 сутки	0.984	0.928	0.535	0.991	-0.998	-0.999	0.998	-0.999	1	0.984
МДА in vitro	1	0.975	0.665	0.996	-0.973	-0.979	0.977	-0.975	0.984	

Таблица 5.11.- Корреляция Пирсона между содержанием МДА и H₂O₂ в листьях и корнях у сорта Таджикистан в условиях *in vitro* и *ex vitro*

	МДА, 3 сутки	МДА, 6 сутки	МДА, 9 сутки	МДА, 12 сутки	H ₂ O ₂ in vitro	H ₂ O ₂ , 3 сутки	H ₂ O ₂ , 6 сутки	H ₂ O ₂ , 9 сутки	H ₂ O ₂ , 12 сутки	МДА in vitro
МДА, 3 сутки	1	-0.812	-0.749	-0.818	0.877	-0.84	-0.841	-0.876	-0.877	0.865
МДА, 6 сутки	-0.812	1	0.981	0.998	-0.99	0.997	0.997	0.999	0.998	-0.913
МДА, 9 сутки	-0.749	0.981	1	0.987	-0.972	0.983	0.983	0.979	0.977	-0.923
МДА, 12 сутки	-0.818	0.998	0.987	1	-0.093	0.999	0.999	0.999	0.999	-0.918
H ₂ O ₂ in vitro	0.877	-0.99	-0.972	-0.993	1	-0.997	-0.997	-0.998	-0.998	0.942
H ₂ O ₂ , 3 сутки	-0.84	0.997	0.983	0.999	-0.997	1	1	1	1	-0.928
H ₂ O ₂ , 6 сутки	-0.841	0.997	0.983	0.999	-0.997	1	1	1	1	-0.928
H ₂ O ₂ , 9 сутки	-0.876	0.999	0.979	0.999	-0.998	1	1	1	1	-0.941
H ₂ O ₂ , 12 сутки	-0.877	0.998	0.977	0.999	-0.998	1	1	1	1	-0.935
МДА in vitro	0.865	-0.913	-0.923	-0.918	0.942	-0.928	-0.928	-0.941	-0.935	

Таблица 5.12.- Корреляция Пирсона между содержанием МДА и H₂O₂ в листьях и корнях у сорта Пикассо в условиях *in vitro* и *ex vitro*

	МДА, 3 сутки	МДА, 6 сутки	МДА, 9 сутки	МДА, 12 сутки	H ₂ O ₂ <i>in vitro</i>	H ₂ O ₂ , 3 сутки	H ₂ O ₂ , 6 сутки	H ₂ O ₂ , 9 сутки	H ₂ O ₂ , 12 сутки	МДА <i>in vitro</i>
МДА, 3 сутки	1	-0.816	-0.855	-0.934	0.983	-0.971	-0.972	0.998	-0.965	0.964
МДА, 6 сутки	-0.816	1	0.997	0.968	-0.908	0.93	0.929	-0.808	0.939	-0.632
МДА, 9 сутки	-0.855	0.997	1	0.984	-0.936	0.541	0.953	-0.848	0.961	-0.686
МДА, 12 сутки	-0.934	0.968	0.984	1	-0.984	0.992	0.992	-0.929	0.995	-0.806
H ₂ O ₂ <i>in vitro</i>	0.315	-0.908	-0.936	-0.984	1	-0.998	-0.999	0.979	-0.997	0.899
H ₂ O ₂ , 3 сутки	-0.971	0.93	0.954	0.992	-0.998	1	1	-0.967	1	-0.873
H ₂ O ₂ , 6 сутки	-0.972	0.929	0.953	0.992	-0.999	1	1	-0.967	1	-0.874
H ₂ O ₂ , 9 сутки	0.578	-0.808	-0.848	-0.929	0.979	-0.967	-0.967	1	-0.96	0.965
H ₂ O ₂ , 12 сутки	-0.965	0.386	0.961	0.995	-0.997	1	1	-0.96	1	-0.861
МДА <i>in vitro</i>	0.64	-0.632	-0.686	-0.806	0.899	-0.873	-0.874	0.965	-0.861	

Однако корреляции были высоко значимыми ($P < 0,01$) для клон-гибрид №26, значимыми для сорт Таджикистан ($P < 0,05$) и незначительными для клон-гибрид № 52/6 и сорт Пикассо ($P < 0,43$). Наблюдались значительные отрицательные корреляции между содержанием МДА и концентрацией H_2O_2 для клон-гибрид 52/6 ($R = -0.080$) и сорт Пикассо ($R = -0.093$).

Коэффициент корреляция Пирсона показала, что содержание МДА и H_2O_2 *ex vitro* в листьях и корнях клон-гибрид №26 была повышена, и увеличение было более значительным и последовательным при сильном стрессе, что указывает на положительную корреляцию.

Таким образом, полученные результаты показали, что, в отличие от листьев, корневая система растений картофеля обладает низким потенциалом накопления прооксидантов. Это связано с высоким уровнем активности антиоксидантных ферментов, таких как пероксидазы, каталазы и СОД. Особое воздействие на растения оказывают абиотическими стрессами. Известно, что абиотические стрессы стимулируют выработку активных форм кислорода, вызывая эффект «окислительного стресса»: повышение уровня активных форм кислорода приводит к выработке антиоксидантных ферментов. Изучение механизмов защиты различных растений (включая картофель) от стрессовых факторов, способствуют более детальному пониманию этих механизмов, а также разработке методов повышения устойчивости экономически важных культур. В области биохимии и защиты растений от засухи и солевого стресса, которые приводят к выработке супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы и альдегидоксидазы.

ГЛАВА 6. СОДЕРЖАНИЕ ВОДЫ (ОСВ) И ПРОЛИНА В ЛИСТЬЯХ РАЗНОУСТОЙЧИВЫХ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ КАРТОФЕЛЯ *EX VITRO*

6.1. Действие полиэтиленгликоля на относительное содержание воды (осв) и пролина в листьях в *ex vitro*.

Одной из наиболее актуальных вопросов современной физиологии, биохимии и биотехнологии растений является изучения стресса и адаптации растений. Большинство сельскохозяйственных культур вынуждены постоянно испытывать воздействие ряда неблагоприятных факторов среды (стрессоров) [1]. Одним из наиболее неблагоприятных для сельскохозяйственных растений в Таджикистане является засуха, возникающая на фоне постоянной высокой температуры воздуха и периодов длительного отсутствия осадков. В условиях атмосферной, почвенной засухи и условиях засоления растения испытывают недостаток воды, что приводит к торможению метаболизма. В этих условиях окислительного стресса у растения накапливаются активные формы кислорода (АФК) в избыточных количествах [3, 5].

Полиэтиленгликоль (ПЭГ) инициирует водный дефицит у растений, а поддержание оптимального водного статуса (гомеостаза), структуры белков и нуклеиновых кислот при стрессе является важным условием выживания растений [7, 8]. При адаптации растений к водному дефициту особую роль играют низкомолекулярные осмолиты, такие как аминокислоты, сахара, бетаины [9]. Наибольшую роль у высших растений при стрессе играет свободным пролин, который обладает полифункциональным эффектом при воздействии стресса и может действовать как осморегулятор, и как антиоксидант, а также выступает в качестве химического шаперона [10].

В связи с этим, одной из задач исследования было изучение накопления свободного пролина у разных по устойчивости генотипов картофеля в условиях водного дефицита.

Для выявления различий у некоторых генотипов и сортов картофеля в ответ на водный дефицит, имитированный ПЭГ, изучили относительное содержание воды (ОСВ) как интегральный показатель водного гомеостаза растений (Рисунок 6.1).

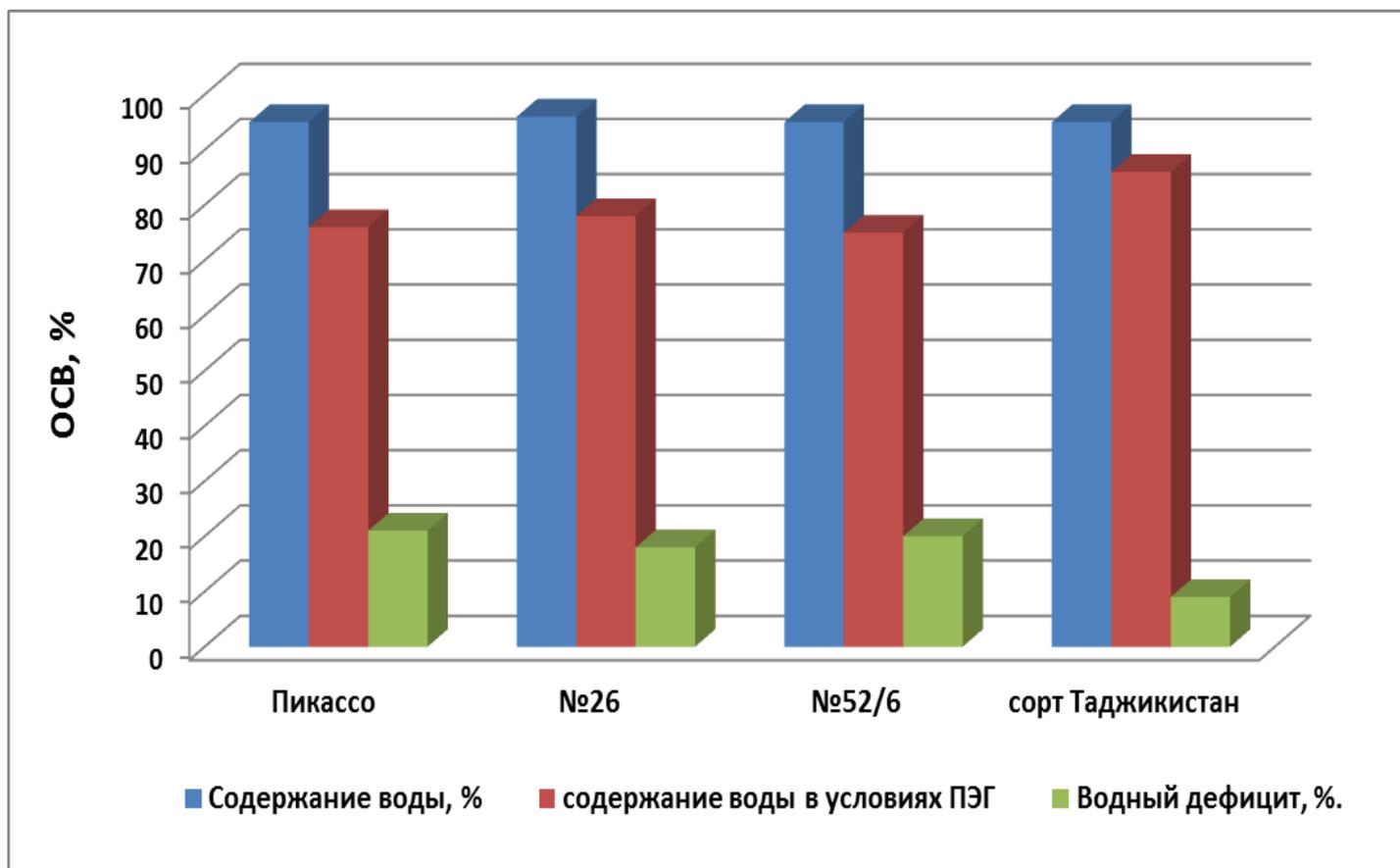


Рисунок 6.1. Действие ПЭГ на относительное содержание воды (ОСВ) в листьях растений картофеля

Из полученных данных видно, что листья сорта Пикассо и клонов №26 и 52/6, за время обезвоживания теряют воды больше, чем листья сорта Таджикистан. В процентном соотношении исследуемые генотипы имеют следующие показатели: при обезвоживании листья сорта Пикассо и клонов №26 и 52/6 имеют ОСВ на уровне 20%, сорт Таджикистан только 9%. Полученный результат позволяет заключить, что способность листьев удерживать воду зависит от генотипа и является одним из критериев засухоустойчивости. Вместе с тем, данный показатель (т.е. ОСВ)

недостаточно полно отражает засухоустойчивость растения и скорее всего характеризует механизм избегания обезвоживания, а не резистентность к нему. Возможно, уровень потери воды листьями генотипов (сорт Пикассо, клон №26, клон №52/6 и сорт Таджикистан) в ходе действия засухи связан с накоплением низкомолекулярных осмолитов: аминокислот, углеводов, фенольных соединений, белков и др. [4, 3].

Накопление свободного пролина играет особую роль в регуляции гомеостаза воды в растениях в условиях стрессорного воздействия, в том числе засухи (обезвоживание). На рисунке 6.2 представлены результаты действия ПЭГ на содержание свободного пролина у разных по устойчивости растений-регенерантов в условиях *ex vitro*.

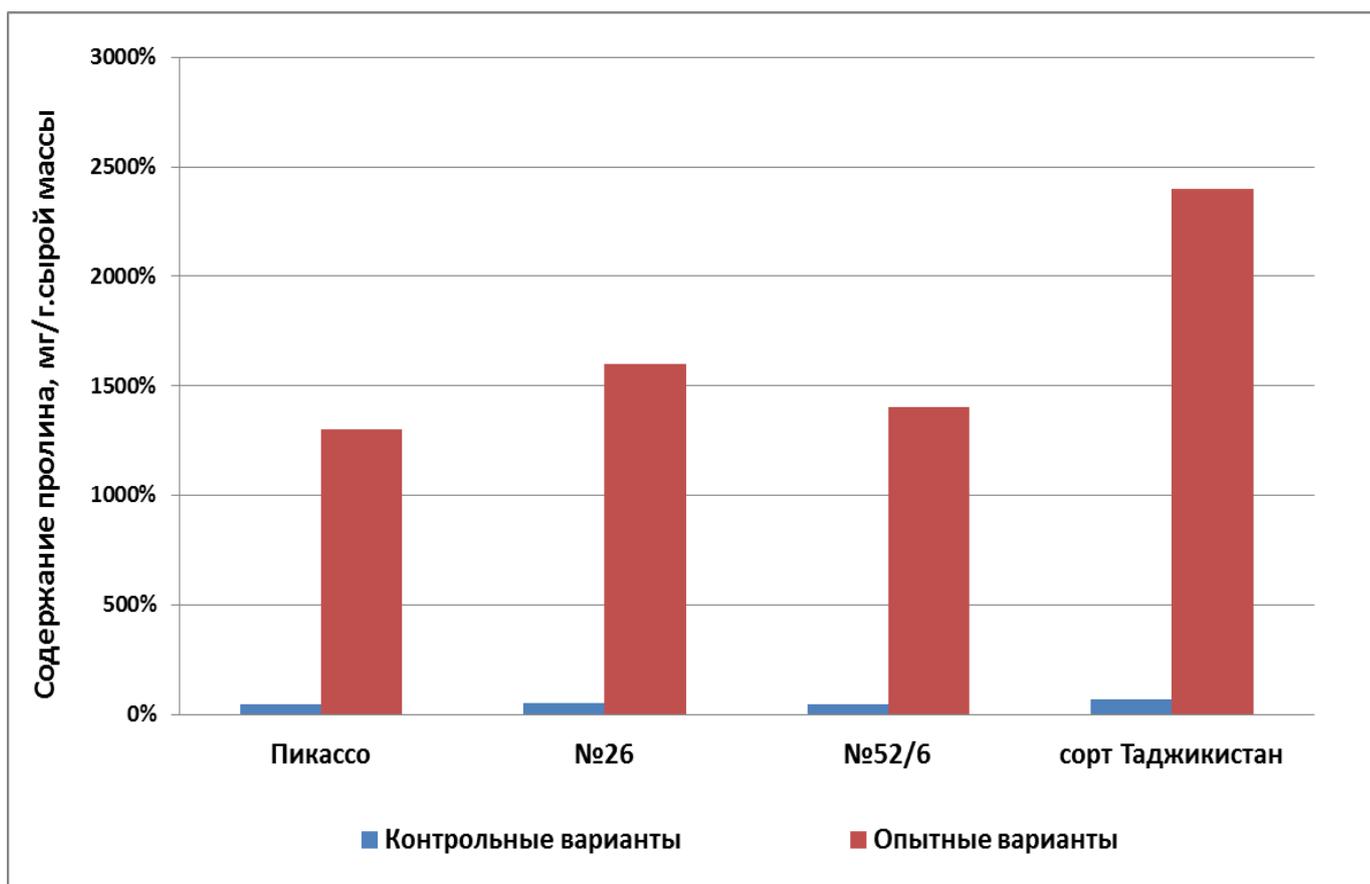


Рисунок 6.2. Действие ПЭГ на содержание свободного пролина у разных по устойчивости растений-регенерантов в условиях *ex vitro*

Обнаружено, что ПЭГ по-разному влияет на содержание свободного пролина, что у контрольных вариантов уровень свободного пролина практически одинаков у исследованных генотипов в условиях *ex vitro*. В то же время у опытных вариантов растений-регенерантов содержание свободного пролина различается. В условиях водного дефицита (вариант с ПЭГ), наибольшее накопление свободного пролина наблюдается у сорта Таджикистан, а у сорта Пикассо, клонов 26 и 52/6 уровень накопления практически одинаков, но значительно ниже, чем у сорта Таджикистан. В процентном соотношении, уровень свободного пролина в условиях стресса (ПЭГ) у сорта Пикассо составляет 46%, клона 26 – 52%, клона 52/6 – 44% от контроля. Увеличение содержания свободного пролина у сорта Таджикистана составляет 71% от контроля.

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что накопление свободного пролина в условиях стресса имеет генотипический характер и его содержание указывает на устойчивость растений к воздействию стрессоров. Это предполагает, что сорт Пикассо, клоны 26 и 52/6, а также сорт Таджикистан обладают различным уровнем адаптации в условиях засухи. Следует также отметить, что сорт Таджикистан является более устойчивым к обезвоживанию, чем другие изученные генотипы.

6.2. Влияние циклогексимида на формирование окислительных реакций и активность пероксидазы растений картофеля.

В процессе эволюции в растениях сформировалась эффективная система антиоксидантной защиты от воздействия стрессоров. Главные компоненты окислительного стресса связывают с стресс-индуцированным образованием АФК, представителями которых являются супероксид-анион радикалы кислорода (O_2^-), перекись водорода (H_2O_2), синглетный кислород (1O_2) и гидроксильные радикалы (OH^\cdot). Образование активных форм кислорода (АФК) инициирует интенсивность экспрессии определенных генов, выполняющих защитные функции [92, 83]. Одним из возможных нарушений метаболических процессов в ответ на воздействие стрессоров

связано с образованием свободно - радикальных компонентов клетки и активацией перекисного окисления липидов (ПОЛ) [10, 28]. Постоянное присутствие ПОЛ в клетках как в нормальных, так и в стрессовых условиях делает необходимым непрерывное функционирование антиоксидантной защиты и, как следствие, баланс уровня АФК, что способствует адаптивности и устойчивости растений при стрессах. В этих условиях сбалансированности метаболических процессов растений формирование защитных механизмов устойчивости связано с активацией генетического аппарата, функционированием трансляционной системы [29, 41, 70]. Трансляционная система и её роль в процессе развития оксидантной и антиоксидантной системы является одним из важнейших путей регуляции устойчивости и продуктивности растений. В данной работе мы попытались ответить на вопрос, может ли перекись водорода играть роль общего неспецифического механизма, позволившего растениям выжить в условиях кратковременного воздействия стресса. В задачу исследования входила оценка активности пероксидазы, накопление перекиси водорода при ингибировании синтеза белков циклогексимином в условиях *ex vitro*.

Было изучено влиянием циклогексимида, как ингибитора системы трансляции, на содержание перекиси водорода, для выявления различий у разнотолерантных растений картофеля, в том числе, ферментов антиоксидантной защиты. Как показывают результаты на рисунке 6.3, в первые 5 суток воздействия циклогексимида наблюдается незначительное увеличение содержания H_2O_2 у всех изученных генотипов.

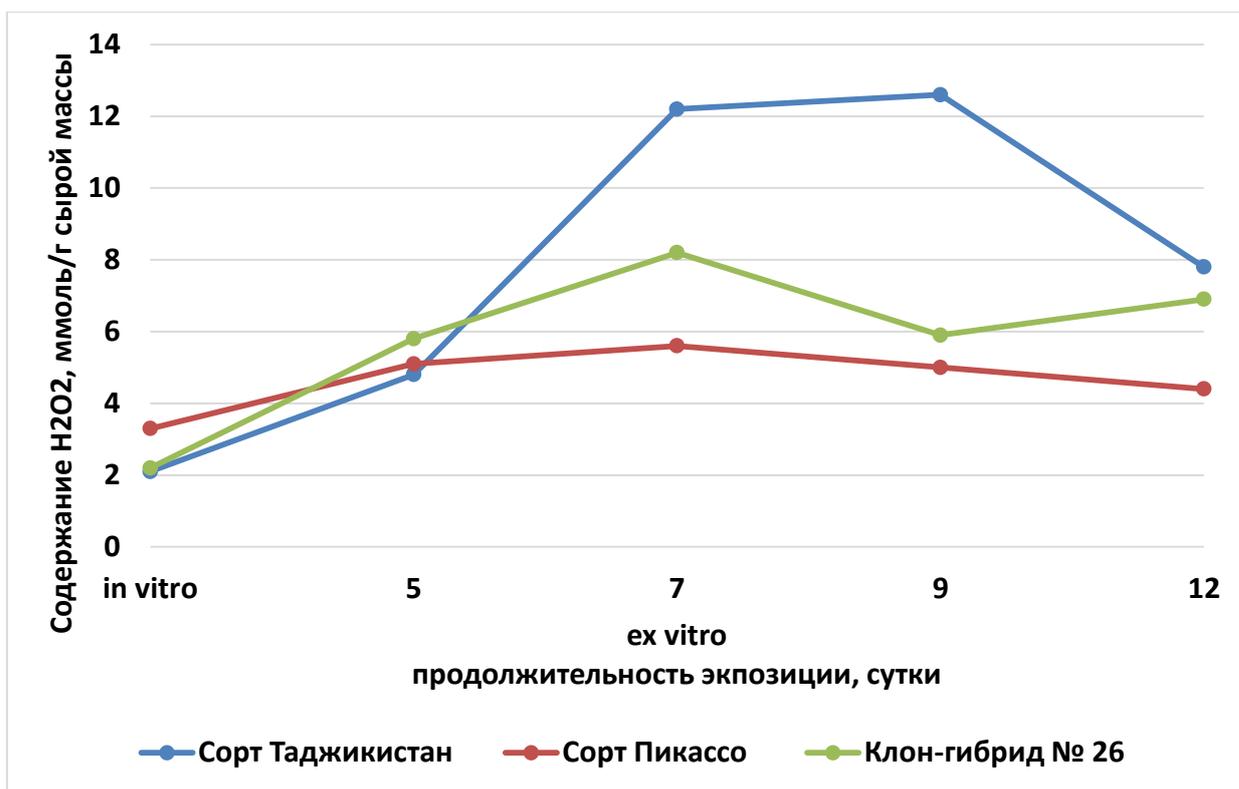


Рисунок 6.3. Содержание H_2O_2 при длительном воздействии циклогексимида в условиях *ex vitro*

Последующее воздействие (7-9 суток) оказывало существенное изменение в содержании H_2O_2 . Наивысшее накопление H_2O_2 наблюдалось у устойчивого сорта Таджикистан. Наименьшее накопление H_2O_2 во всех периодах эксперимента (5-12 суток) наблюдалось у неустойчивого сорта Пикассо. Клон №26 занимал по этим показателям (H_2O_2) промежуточное положение между сортом Таджикистан и сортом Пикассо. Важно отметить, что в этих условиях уровень МДА – продукта перекисного окисления липидов у изученных генотипов различался, был разный как при кратковременном, так и при долговременном воздействии циклогексимида (Рисунок 6.4).

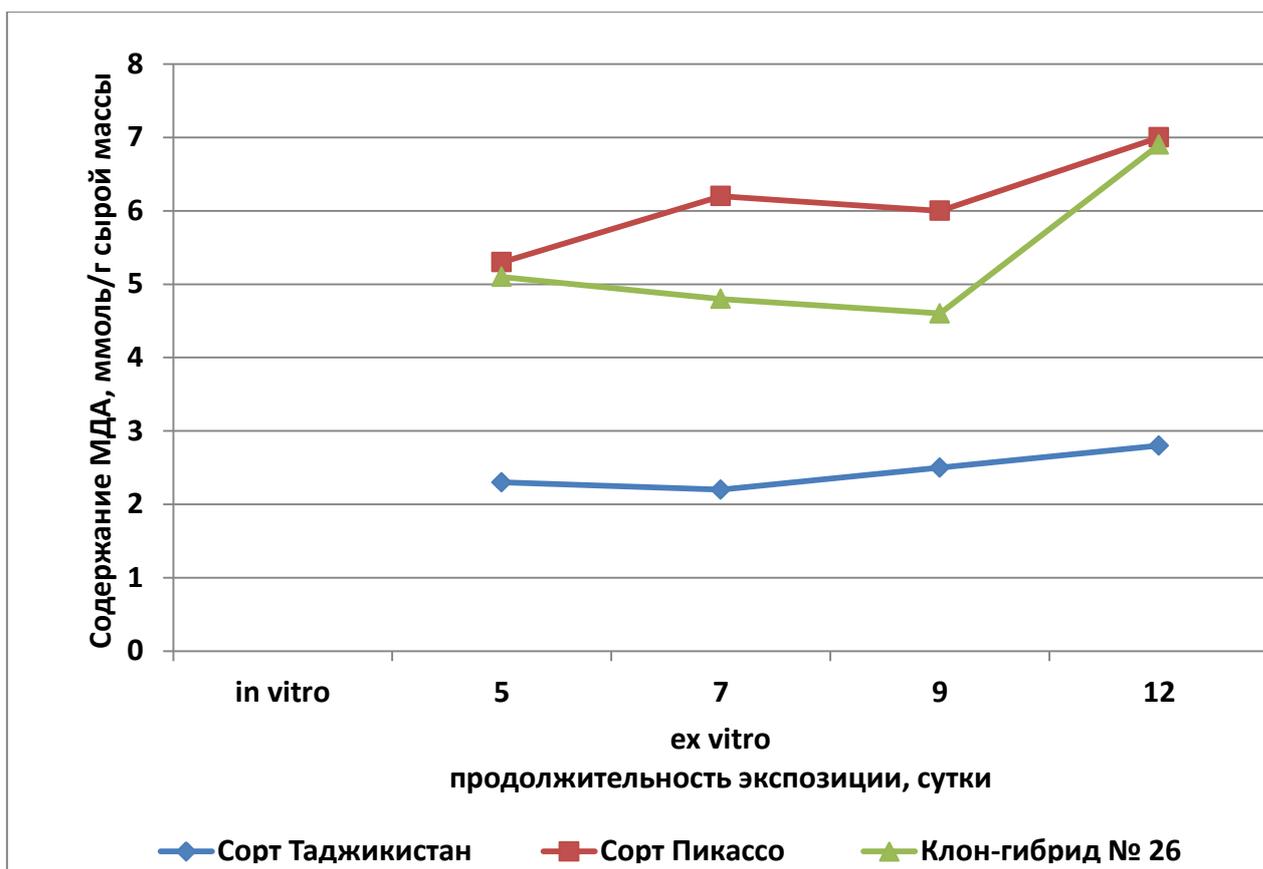


Рисунок 6.4. Действие циклогексимида на накопление МДА в условиях *ex vitro*

Как показано на рисунке 6.4, уровень накопления МДА у неустойчивого сорта Пикассо был значительно выше, чем у устойчивого сорта Таджикистан. А клон №26 занимал по накоплению МДА промежуточное положение. Увеличение содержания H_2O_2 у сорта Таджикистан сопровождалось резким уменьшением уровня МДА. Самый высокий уровень накопления МДА наблюдался у сорта Пикассо как при долговременном, так и при кратковременном воздействии циклогексимида.

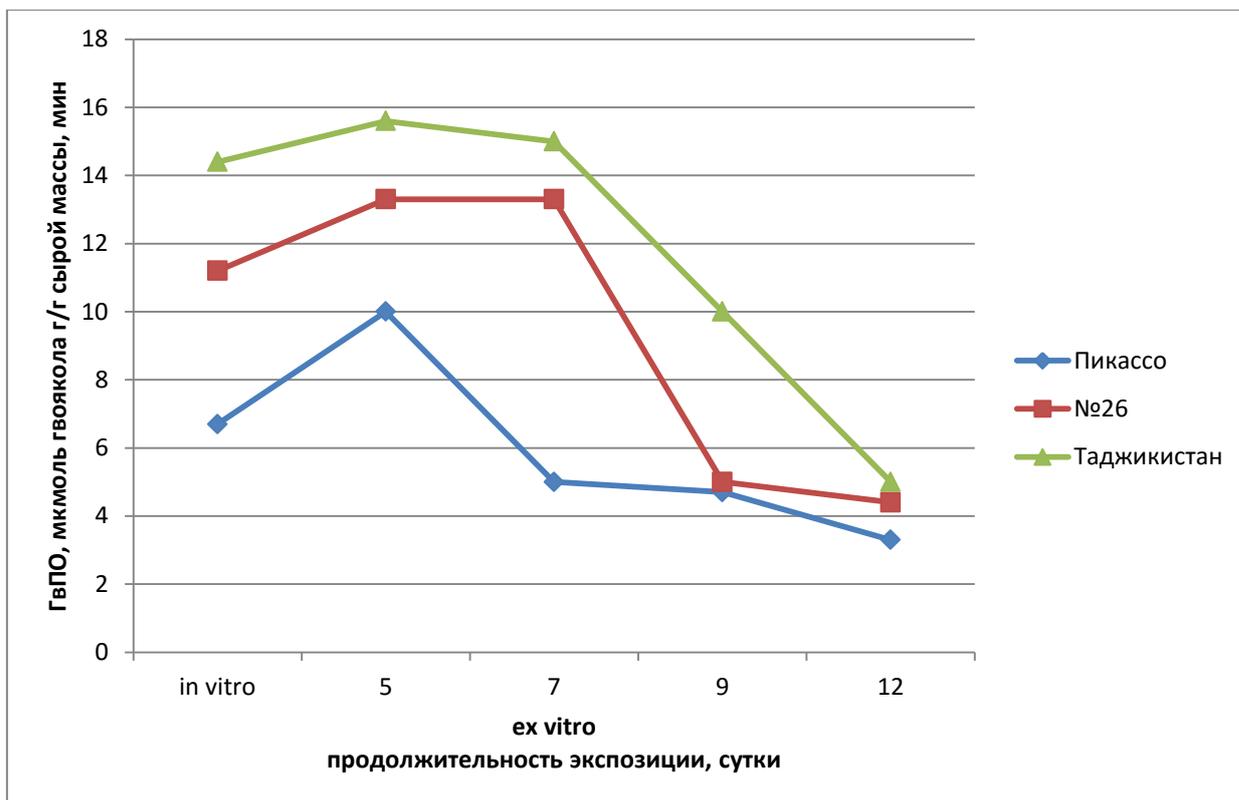


Рисунок 6.5. Активность гваяколпероксидазы при длительном воздействии циклогексимида в условиях *ex vitro*

У изученных генотипов при воздействии циклогексимида в течение 5 суток наблюдалось увеличение активности пероксидазы и далее имело место последующие снижение к 12 суткам (Рисунок 6.5). Следует отметить, что активность гваяколпероксидазы у сорта Таджикистан во всех периодах экспозиции имела высокий уровень. Активность фермента у сорта Пикассо в 2 раза была ниже по сравнению с активностью ГвПО сорта Таджикистан и клона №26.

Полученные экспериментальные данные показывают, что при блокировании синтеза белков циклогексимидом происходит увеличение содержания H_2O_2 у устойчивого сорта Таджикистан примерно в 2 раза, у клона №26 в 1-2-раза, у неустойчивого сорта Пикассо остается на уровне контроля.

Увеличение содержания H_2O_2 инициирует активность ПОЛ по-разному у контрастных по устойчивости генотипов. Во всех периодах блокировки

синтеза ферментов у сорта Таджикистан и клона №26 отмечается небольшое накопление МДА. А у других генотипов (клон №26, сорт Пикассо) наблюдается усиление образования МДА в условиях блокировки синтеза фермента циклогексимидом, особенно у неустойчивого сорта Пикассо. Различие в накоплении H_2O_2 и МДА в условиях блокировки синтеза белков у устойчивых генотипов может быть связано с наличием предсуществующих депо ферментов антиоксидантной защиты, например, гваяколпероксидазы. Возрастание генерации перекиси водорода (H_2O_2) при воздействии циклогексимида, возможно, имитирует ответную реакцию растений на стресс, т.е. является сигналом для адаптивного ответа.

Динамика накопления МДА может отражать устойчивость генотипов к стрессу. H_2O_2 является эволюционным предшественником воды, а также является поставщиком электронов в ЭТЦ фотосинтеза, т.е. вероятным агентом, стимулирующим фотохимические реакции фотосистемы. Такого не наблюдается у неустойчивых генотипов (например, сорта Пикассо), а новый перспективный клон №26 по всем изученным параметрам занимает промежуточное положение. Таким образом, устойчивые генотипы растений обладают способностью к сохранению водного гомеостаза за счёт эндогенного образования H_2O_2 , пероксидазой, что может являться одним из ранних механизмов адаптации растений к стрессовым воздействиям. H_2O_2 возможно наряду с окислительной функцией, играет важную роль в обеспечении нормального функционирования физиолого-биохимических процессов, в условиях стресса, возможно, является сигнальной молекулой активации генов посредством образования необычных азотистых оснований в молекуле ДНК.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Известно, что интенсивная селекция на продуктивность и устойчивость, в известной мере, привела к потере толерантности растений к абиотическим факторам среды. Это делает актуальным изучение физиолого-биохимических механизмов устойчивости *in vitro* и *ex vitro* генотипов картофеля, различающихся по продуктивности, что вызывает большой интерес. В связи с этим выявление и отбор генотипов, обладающих повышенной системой защиты от стрессоров, являются актуальными и перспективными. Для этого было изучено соотношение интенсивности прооксидантной и антиоксидантной системы у перспективных генотипов растений-регенерантов картофеля, различающихся по продуктивности в условиях *in vitro* (клон №26 и клон №52/6).

Полученные результаты показывают, что при переводе растений из пробирки *in vitro* в водную среду *ex vitro* происходит ряд изменений морфологических параметров, таких как высота растений, количество листьев на растение и т.д. По изученным параметрам растения клона №26 и клона №52/6 значительно отличаются. Так, длина междоузлий клона №26 значительно больше, чем клона №52/6, также имеет место отличие этих клонов по сырой массе растений и корней.

Более интенсивнее формируется корневая система в условия *ex vitro* у клона №52/6, чем у клона №26, что отражается на увеличении сырой массы корневой системы клона №52/6. Условия среды оказывают влияние на морфологические признаки и физиологические процессы растений. В этой связи исследование зелёных пигментов в зависимости от условий культивирования *in vitro* и *ex vitro* представляет определенный интерес и способствует выяснению механизмов запуска системы защиты растений как в норме, так и в условиях воздействия стрессовых факторов.

Следует отметить, что в условиях *ex vitro*, т. е. при переводе растений-регенерантов из агаризованной в водно-солевую среду содержание

фотосинтетических пигментов несколько ниже, чем в условиях *in vitro* (пробирочная культура). Разный уровень содержания хл *a* и хл *b* и их суммы отражается на их соотношении. Низкое значение соотношения хл *a/ b* указывает на то, что, возможно, в первые часы перевода растений-регенерантов в условия *ex vitro* (вне пробирки) иницируются адаптационные механизмы, что незамедлительно сказывается на активности фотосинтетической системы растений.

Так, доля хлорофилла, входящего в состав ССК, в условиях *in vitro* и *ex vitro* у изученных генотипов резко отличается. В условиях *in vitro* доля хл *a* составила в среднем 40-43%. В условиях *ex vitro* этот показатель увеличился до 47-49% а при 3-х суточной экспозиции до 64-65%, тогда как в последующие 6-12 суток остается неизменной. Исходя из полученных данных, можно предположить, что в условиях культуры *in vitro* растения испытывают недостаток света для биосинтеза и полного функционирования фотосинтетических пигментов, и по этой причине доля хл *a* в сумме хлорофиллов значительно ниже, а в условиях *ex vitro* содержание хл *a* повышается, что указывает на относительно стабильное функционирование фотосинтетической функции хлоропластов. По всей видимости, в культуре *in vitro* на фоне повышения макро- и микроэлементов, витаминов, сахарозы и агара в комплексе происходит двоякое воздействие: с одной стороны, наблюдается рост регенерантов, а с другой – ингибирование синтеза фотосинтетических пигментов, особенно хл *a*.

Возможно, повышение содержания хл *a* по отношению к хл *b* в условиях *ex vitro* свидетельствует об увеличении количества (числа) светособирающих комплексов фотосинтетического аппарата и реакционных центров фотосистемы I и II, что может обеспечить возрастание скорости переноса электронов в электрон-транспортной системе фотосинтетического аппарата. На этом фоне очень важно понять роль оксидантных и антиоксидантных систем как в условиях *in vitro*, так и в условиях *ex vitro* и их

взаимосвязь с формированием и усилением фотосинтетической функции хлоропластов. Возможно, при переходе растений от автотрофии к фототрофии лежит дифференциальная активность биосинтеза хлорофиллов, зависящая от продолжительности нахождения растений в условиях *ex vitro*. В условиях *in vitro* и *ex vitro* содержание хлорофиллов и каротиноидов существенно отличалось и оказывало определенное влияние на сборку ССК фотосистемы. Предполагается неоднозначность роли этого комплекса в формировании и функционировании фотосинтетического аппарата, что может являться одним из показателей адаптации растений в стрессовых условиях внешней среды.

Возможно, возрастание содержания хлорофиллов (хл *a* и хл *b*) в условиях *ex vitro* свидетельствует об увеличении числа компонентов ССК и способствует более эффективной работе электрон-транспортной цепи хлоропластов, что в свою очередь может инициировать образование свободных радикалов кислорода в хлоропластах. Поэтому доля образующегося АФК в хлоропластах выше, чем в цитозоле. Кроме того, АФК образуется в эндоплазматическом ретикулуме (O_2 - и H_2O_2) в результате окисления жирных кислот под действием гликолатоксидазы и уратоксидазной активности [130]. Небольшое количество АФК образуется в ретикулине как побочный продукт процессов окисления и гидроксирования, в которых участвует цитохром P450. Флавопротеин НАДФН-цитохром P-450 редуктаза катализирует перенос электронов от НАДФН к цитохрому P-450 [118].

Активные формы кислорода (АФК) могут генерироваться в различных клеточных компартментах, таких как пероксисомы, цитозоль, на митохондриальных мембранах или на плазматической мембране. Окислительное восстановительный баланс в значительной степени поддерживается цитоплазматическим НАДФН в качестве центрального компонента. Клеточную роль активных форм кислорода (АФК), в частности

супероксида и пероксида водорода, и активных форм азота, в частности оксида азота (NO), в связи с компартиментализацией их продукции в клетках растений.

У растений АФК играют решающую роль в чувствительности к абиотическим и биотическим стрессам, интеграции различных сигналов окружающей среды и активации сетей реакции на стресс, способствуя тем самым созданию защитных механизмов и устойчивости растений [164].

На основе полученных данных можно заключить, что условия среды оказывают влияние на состояние физиологических систем растений, в том числе на пигментный аппарат. Содержание хлорофиллов и каротиноидов определяется внешними и внутренними факторами, особенно в условиях *in vitro*, действие которых интегрируется с активностью электрон-транспортной цепи хлоропластов, в результате которых образуется анион-радикал кислорода, оказывающий двойное действие: с одной стороны, он инициирует активацию стрессовых генов как мессенджер, а с другой - является сильным окислителем мембранных систем клетки, особенно в условиях стрессорных воздействий.

Характер проявления активности ферментов (гваяколпероксидазы, каталазы) при продолжительном выдерживании растений в условиях *ex vitro* существенно отличался как в листьях, так и в корнях, т.е. активность гваяколпероксидазы в корнях в течение всего эксперимента менялась неоднозначно и была ниже, чем в листьях. Активность каталазы как в листьях, так и в корнях в течение всего эксперимента менялась значительно больше, чем активность фермента гваяколпероксидазы.

Таким образом, полученные в данной работе результаты позволяют заключить, что корневая система растений картофеля обладает высоким потенциалом устойчивости в отличие от листьев. Это связано с высоким уровнем активности антиоксидантных ферментов, особенно гваяколпероксидазы.

Определение содержания воды и водного дефицита в растениях клон-гибридов картофеля в условиях кратковременной засухи (24 ч), имитируемой 6% ПЭГ-6000, показало, что в контрольном варианте содержание воды в листьях генотипов картофеля №26 и №52/6 отличается незначительно (на 2%), а водный дефицит выше на 7.8% у растений клон-гибрида №52/6. В условиях засухи у клон-гибрида №26 содержание воды снижается в меньшей степени, чем у клон-гибрида №52/6 (на 9 и 15% соответственно). Обратную картину при воздействии ПЭГ-6000 наблюдали для показателя водного дефицита. Так, водный дефицит у растений клон-гибрида №52/6 был почти в два раза выше, чем у клон-гибрида №26. На основании изучения влияния засухи, моделированной ПЭГ-6000, на показатели водного режима генотипов картофеля можно предположить, что растения картофеля клон-гибрида №52/6 обладают низким уровнем устойчивости к засухе, чем клон №26. Так, полученные результаты по накоплению МДА указывают на разный уровень устойчивости генотипов картофеля к условиям засухи (ПЭГ). Вероятно, незначительное изменение накопления МДА в листьях клон-гибрида картофеля №26 в условиях засухи обусловлено его большей устойчивостью, а клон-гибрид №52/6 обладает сниженным механизмом защиты от окислительного стресса, что может быть связано с различной активностью фермента СОД, участвующего в первой линии защиты растений в условиях стресса. По этой причине в листьях клон-гибрида картофеля №26 активность СОД в хлоропластах выше, чем в цитозоле, а в листьях клон-гибрида №52/6 активность СОД в цитозоле выше, чем в хлоропластах.

Такая закономерность наблюдалась как в контрольном, так и в опытном вариантах (в условиях засухи, моделируемой ПЭГ). Можно предположить, что высокая активность СОД в хлоропластах клон-гибрида №26 способствует сохранению уровня МДА на низком уровне у этого генотипа как в норме, так и в условиях стресса, тогда как снижение активности этого фермента в хлоропластах клон-гибрида №52/6

сопровождается более высокими значениями содержания МДА. Более высокая активность СОД в условиях засухи в хлоропластах клон-гибрида №26 свидетельствует о том, что у этого генотипа функционирует более мощная антиоксидантная система, обезвреживающая активные формы кислорода в отличие от генотипа №52/6 (Рисунок 6.6).

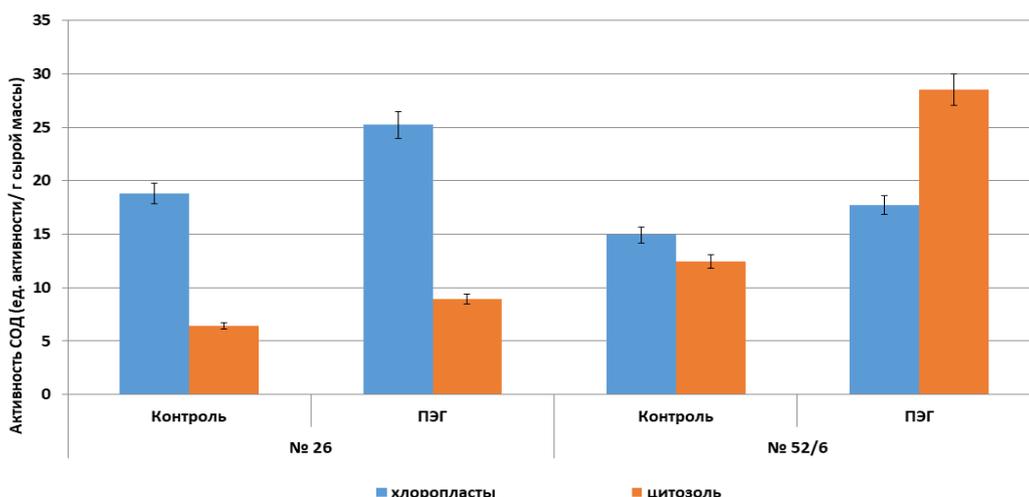


Рисунок 6.6. Активность СОД в хлоропластах и цитозоле листьев картофеля при воздействии засухи (72 ч)

Таким образом, полученные нами результаты указывают на то, что изученные в работе генотипы картофеля отличаются по интенсивности ПОЛ, активности СОД и по водному гомеостазу в условиях засухи, имитированной ПЭГ-6000. Закономерность изменчивости общей активности СОД свидетельствует о генетическом контроле синтеза фермента СОД и наличии регуляторной системы, обеспечивающей повышенный адаптационный потенциал клон-гибрида №26 в условиях воздействия стресса. Сравнительный анализ активности СОД в разных компартментах клетки (хлоропласты, цитозоль) показал, что система защиты от воздействия стрессоров в хлоропластах более высокая, чем в цитозоле, независимо от генотипов (клон №26, клон №52/6). Это явление более выражено в условиях водного дефицита.

Выдвигается концепция о роли перекиси водорода и активности пероксидазы в усилении устойчивости растений в стрессовых условиях (схема 1).

Согласно данной схеме устойчивые генотипы растений обладают способностью к сохранению водного гомеостаза за счёт эндогенного образования H_2O_2 , что может являться одним из ранних механизмов адаптации растений к стрессовым воздействиям. H_2O_2 возможно наряду с окислительной функцией, играет важную роль в обеспечении нормального функционирования физиолого-биохимических процессов, возможно, является, сигнальной молекулой активации генов посредством активации мобильных генетических элементов (плазмиды), особенно в условиях стресса.

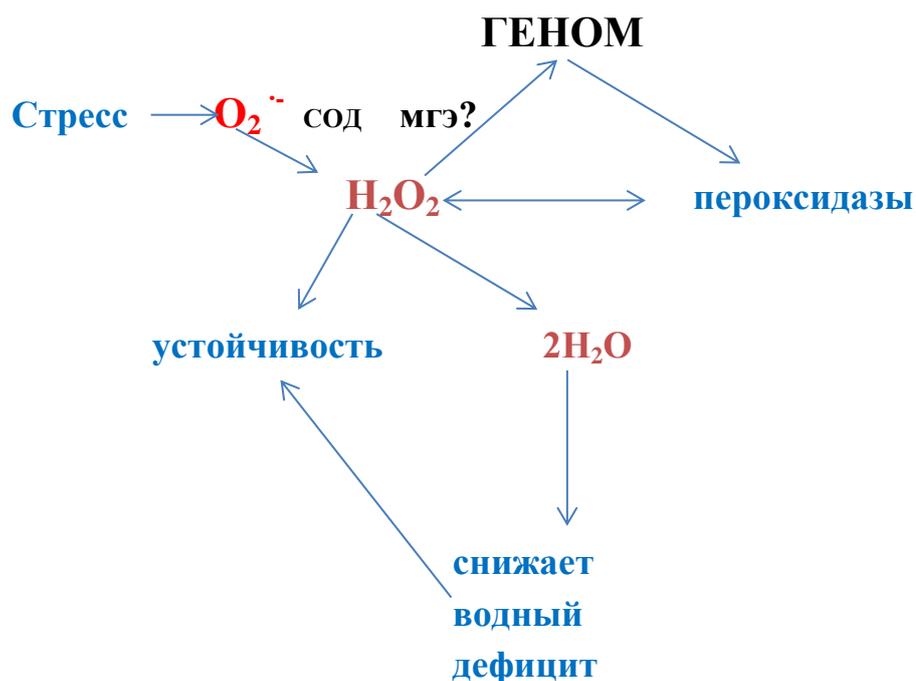


Рисунок 6.7. Роль перекиси водорода в регуляции устойчивости

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Выявлено, что растения картофеля клонов №52/6 и №26 и сортов Таджикистан и Пикассо несколько отличаются по некоторым физиолого-биохимическим параметрам в условиях *in vitro*, но общая активность антиоксидантных ферментов и системы прооксидантов находится в равновесии, которое можно назвать перекисным гомеостазом, являющимся показателем адаптации растений в условиях стрессорных воздействий [1-А].

2. Показано, что в условиях *in vitro* и *ex vitro* содержание хлорофиллов и каротиноидов существенно отличалось и оказывало определенное влияние на сборку светособирающих комплексов фотосистемы (ССК). Возрастание содержания хлорофиллов (хл *a* и хл *b*) в условиях *ex vitro* свидетельствует об увеличении числа компонентов ССК, и это способствует более эффективной работе электрон-транспортной цепи хлоропластов, что в свою очередь может инициировать образование свободных радикалов кислорода в хлоропластах [2-А, 6-А].

3. Установлено, что растения клонов №26 и №52/6 и сортов Таджикистан и Пикассо имели неодинаковую скорость генерации супероксидного анион-радикала кислорода, который является наиболее опасной формой АФК. У растений клона №52/6 уровень накопления АФК несколько выше, чем у клона №26, что свидетельствует о слабом развитии или меньшей эффективности системы защиты у этого клона [1-А, 4-А].

4. Показано, что в условиях *in vitro* наблюдалось низкое содержание МДА как в листьях, так и в корнях. При переводе растений-регенерантов в условия *ex vitro* происходило быстрое накопление МДА, увеличивающееся в течение последующего выращивания регенерантов картофеля в водно-минеральной смеси МС (*ex vitro*) [4-А, 7-А].

5. Установлено существование двух фаз стресса: чувствительная, кратковременная (до 3-х суток) и продолжительная, специфическая (от 6-ти до 12 суток). Эти фазы в листьях и корнях отличаются по уровню накопления

МДА и H_2O_2 . Чувствительная фаза и в листьях, и в корнях характеризуется повышением содержания H_2O_2 и интенсивным образованием МДА. А во второй фазе (от 6-ти до 12 суток) оба эти показателя были одинаковыми и переходили на стационарный уровень, что незамедлительно отражалось на активности антиоксидантных ферментов [3-А].

6. Нами впервые выявлено, что корневая система растений обладает высоким потенциалом устойчивости в отличие от листьев. Это связано с высоким уровнем активности антиоксидантных ферментов, особенно гваяколпероксидазы, свидетельствующим о существовании органоспецифичности локализации антиоксидантных ферментов [3-А, 5-А]

7. Более высокая активность СОД в условиях засухи в хлоропластах клон-гибрида №26 свидетельствует о том, что у этого генотипа функционирует более мощная антиоксидантная система, обезвреживающая активные формы кислорода, в отличие от генотипа №52/6 [1-А, 3-А, 4-А, 5-А].

8. Показано что у устойчивого генотипа (сорт Таджикистана) при блокировании синтеза белков – ферментов резко увеличивалось содержание H_2O_2 и активность фермента пероксидазы. Такого не наблюдалось у стресс неустойчивого генотипа (сорта Пикассо), а новый перспективный клон №26 имеет по всем этим параметрам занимает промежуточное положение [6-А].

Рекомендации по практическому использованию результатов исследования

Выявленные в работе функциональные различия ферментов антиоксидантной системы листьев и корней картофеля можно использовать для ранней диагностики адаптивности и продуктивности в меняющихся условиях среды. Корневая система является органом, определяющим устойчивость растений. Полученный экспериментальный результат можно использовать при чтении курсов по молекулярным основам устойчивости для Вузов Таджикистана. Выявленный клон №26 можно рекомендовать для производственного испытания в картофелеводческих регионах Таджикистана.

Список литературы

- [1]. Аббасова, З.И. Конформационные изменения митохондрий при солевом стрессе [Текст] / З.И.Аббасова, С.Р. Алахвердиев, Э.М.Зейналов, и др.// Материалы III съезда Всерос. общества физиологов растений. – СПб., 1993. – 464 с.
- [2]. Азаренко, Ю.А. Закономерности содержания, распределения, взаимосвязей микроэлементов в системе почва-растение в условиях Западной Сибири [Текст]/ Ю.А. Азаренко // Вариант-Омск. – 2013. – С. 232.
- [3]. Алиев, К. Биотехнология растений: клеточно-молекулярные основы[Текст] / К.А. Алиев // Из-во «Ирфон», Душанбе. – 2012. – С.185.
- [4]. Алиев, К.А., Испытание гибридов картофеля на устойчивость к NaCl и регенерация солеустойчивых гибридов *in vitro* [Текст] / К.А. Алиев, Карли Карло, М.Л. Азимов и др. // Доклады АН РТ. Отд. биол. и мед.наук. - 2007. - №8. - С. 716-721.
- [5]. Алиев, К.А. Ферменты антиоксидантной системы клетки в условиях засухи [Текст] / К.А. Алиев, А.К. Мирзорахимов, Р.С. Бобохонов и др.// Доклады АН РТ. – 2016. - Т.59 № 7-8. - С. 350-354.
- [6]. Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавлиренко В.Ф., Жигалова Т.В., Мейчик Н.Р., Носов А.М., Полесская О.Г., Харитонашвили Е.В., Чуб В.В. Физиология растений. М.: Академия, 2005. 640 с.
- [7]. Аронова, Е.Е. Индукция кадаверином экспрессии гена супероксиддисмутазы у растений *Mesembryanthemum crystallinum*L [Текст] / Е.Е. Аронова, Н.И. Шевякова, Л.А. Стеценко и др. // Докл. АН. - 2005. - Т. 403. - С. 257-260.
- [8]. Артемьева, Т А. Сравнение методов ИФА и ПЦР анализа при определении вирусной патологии у растений картофеля [Текст] / Т А. Артемьева, М.Ю. Карпухин // Молодежь и наука. – 2019. - №7-8. – С.35.
- [9]. Балнокин, Ю.В. Растения в условиях стресса [Текст] / Ю.В. Балнокин // Физиология растений. - 2005. – С. 636.

[10]. Барабой, В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов [Текст] / В.А. Барабой // Успехи современной биологии. -1991. Т. 111. Вып. 6. С. 923–932.

[11]. Бараненко, В.В. Супероксиддисмутаза в клетках растений [Текст] / В.В. Бараненко // Цитология. - 2006. - Т. 48. - №6. - С. 465-474.

[12]. Баратова, Н.Г. Перекисное окисление липидов у растений *Ipomoea batatas* L. при хлоридном засолении [Текст] / Н.Г. Баратова, З.Б. Давлятназарова, И. Абдулсамад и др. // Известия Академии наук Республики Таджикистан. Отделение биологических и медицинских наук. - 2019. № 2 (205). С. 40-45.

[13]. Борисова, Г.Г. Методы оценки антиоксидантного статуса растений [Текст] / Г.Г. Борисова, М.Г. Мадева, Г.Ф. Некрасова и др. // Екатеринбург. – 2012. – С.72.

[14]. Войников, В.К., Константинов Ю.М., Негрук В.И. Генетические функции митохондрий растений [Текст] / В.К. Войников, Ю.М. Константинов, В.И. Негрук // Новосибирск: Наука. - 1991. – С. 183.

[15]. Гарифзянов, А.Р. Исследование антиоксидантной системы древесных растений в условиях промышленного загрязнения: дис. ... канд. биол. наук [Текст] / А.Р. Гарифзянов – Тула, 2011. – 186 с.

[16]. Гарифзянов, А.Р.. Образование и физиологические реакции активных форм кислорода в клетках растений [Текст] / А.Р. Гарифзянов, Н.Н. Жуков, В.В. Иванищев // Современные проблемы науки и образования, 2011, № 2, с. 1–21.

[17]. Гончарик, М.Н. Физиологическое влияние ионов хлора на растения [Текст] / М.Н. Гончарик // Наука и техника. – Минск. - 1968. – С.251.

[18]. Гулиев, А.Г. Засоление – глобальная экологическая проблема в орошаемом земледелии [Текст] / А.Г. Гулиев, И.А. Самофалова, Н.М. Мудрых // Пермский аграрный вестник. – 2014. -№4 (8). – С. 32-43.

[19]. Давлятназарова, З.Б. Регуляция клубнеобразования *in vitro* [Текст] / З.Б. Давлятназарова, Б.К. Каримов, Х.Х. Авганова и др. // Актуальные проблемы и перспективы развития физиологии растений. Душанбе. - 2004. - С. 62-63.

[20]. Давлятназарова, З.Б. Рост и клубнеобразование регенерантов картофеля в зависимости от условий выращивания *in vitro* [Текст] / З.Б. Давлятназарова, Н.Н. Назарова, Г.О. Мирзохонова и др. // Докл. АН РТ. – 2004. –№11-12. – С.79-92.

[21]. Давлятназарова, З.Б. Биохимические аспекты устойчивости разночувствительных генотипов картофеля к солевому стрессу [Текст] / З.Б. Давлятназарова, З.С. Киёмова, У.К. Алиев и др.//Известия АН РТ. Отд. биол. и мед. наук. –2012. –№ 3 (180). – С. 43-49.

[22]. Давлятназарова, З.Б. Влияние засоления и засухи на про- и антиоксиданты хлоропластов растений картофеля [Текст] / З.Б. Давлятназарова, З.С. Киёмова, Н.Х. Норкулов, С.Х. Ашуров, К. А. Алиев // Докл. АН РТ. –2013. –№ 9. – С.745- 749.

[23]. Диловарова, Н.С. Индукция антиоксидантной системы растений картофеля *Solanum tuberosum* L. в условиях засухи [Текст] / Н.С.Диловарова, Н.Х. Норкулов, З.Б. Давлятназарова и др. //Известия АН РТ. Отд. биол. и мед. наук. – 2020, № 2 (209), с. 38-45.

[24]. Долгих, Ю.И. Селекция на осмоустойчивость кукурузы *in vitro* и характеристика растений регенерантов [Текст] / Ю.И. Долгих, С.Н.Ларина, З.Б. Шамина // Физиол. раст. –1994. –Т.41, №1. – С.114-117.

[25]. Дымова О.В. Состояние пигментного аппарата растений живучки ползучей в связи с адаптацией к световым условиям произрастания [Текст] / О.В. Дымова, Т.К. Головки // Физиология растений. - 2007. Т. 54, № 1. С. 47–53.

[26]. Ефимова, М. В. Защитная роль brassinosteroidов при засолении проростков *Brassica napus* L. [Текст] / М. В.Ефимова, А. В. Мануйлова, М. К.

Малофий и др. // Вестник Томского государственного университета. Биология.- 2013. № 1(21). - С. 118-129.

[27]. Ефимова, М. В. Физиологические механизмы повышения солеустойчивой растений рапса брассиностероидами [Текст] / М. В. Ефимова, А. Л. Савчук, Дж. А. Хасан и др. // Физиология растений. - 2014. Т. 61. С. 778-789.

[28]. Ефимова, М.В. Физиологические механизмы устойчивости растений *Solanum tuberosum* L. к хлоридному засолению [Текст] / М.В. Ефимова, Л.В. Коломейчук, Е.В. Бойко и др. // Физиология растений. – 2018. - Т.65. - №3. - С. 196-206.

[29]. Жиров, В.К. Перекисное окисление мембранных липидов холодостойких растений при повреждении отрицательными температурами [Текст] / В.К. Жиров, М.Н. Мерзляк, Л.В. Кузнецов // Физиология растений. - 1982. - Т. 29. - С. 1045–1052.

[30]. Жученко, А. А. Стратегия адаптивной интенсификации растениеводства [Текст] / А. А. Жученко // Докл. РАСХН. - 1999. – Т. 2. - С. 5-11.

[31]. Зауралов, О.А. Последствие пониженных температур на дыхание теплолюбивых растений [Текст] / О.А. Зауралов, Ф.С. Лукаткин // Физиология растений. –1997. –Т. 44, №5. – С. 736-741.

[32]. Караев, С.Ф. Роль фитогормонов в развитии и продуктивности длительно - культивируемых растений в *in vitro* [Текст] / С.Ф. Караев, З.С. Киёмова, Н.Х. Норкулов и др. // Ж. Земледелец (Кишоварз). - Душанбе. - 2018. - № 3. - С. 24-26.

[33]. Киёмова, З.С. Накопление активных форм кислорода и перекиси водорода в разнотолерантных растениях картофеля [Текст] / З.С. Киёмова, Н.Х. Норкулов, З.Б. Давлятназарова и др. // Известия АН Республики Таджикистан. Отд. биол. и мед. Наук. – 2012. - № 2. - С. 52-58.

[34]. Киёмова, З.С. Активность супероксиддисмутазы у разнотолерантных растений-регенерантов картофеля в условиях солевого

стресса [Текст] / З.С. Киёмова, З.Б. Давлятназарова, М.Х. Шукурова и др. //Известия АН РТ. Отд. биол. и мед.наук. – 2013. – № 1 (182). – С. 40-46.

[35]. Киёмова, З.С. Биохимические особенности антиоксидантных систем разнотолерантных к соли генотипов картофеля *in vitro*: дис. ... канд. биол. наук [Текст] / З.С. Киёмова. – Душанбе, 2013. – 98с.

[36]. Колупаев, Ю.Е. Антиоксидантная система и устойчивость растений к недостатку влаги [Текст] / Ю.Е. Колупаев, А.И. Кокорев // Физиология растений и генетика. - 2019, т. 51 (1), с. 28–54.

[37]. Королева, Н.Ю. Динамика изменения содержания хлорофилла а и b в листьях сирени обыкновенной и клюквы крупноплодной при адаптации *ex vitro* / Н.Ю. Королева, В.Л. Филипня, Е.А. Попович // Современные научные исследования в садоводстве. – Ялта, 2000. – Ч. 1. – С. 92-95.

[38]. Креславский В.Д. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений / В.Д. Креславский, Д.А. Лось, С.И. Аллахвердиев, Вл.В. Кузнецов // Физиология растений. 2012. Т. 59. С. 1–16.

[39]. Кристина, Т. Опыт и наилучшие практики биоземледелия на засоленных почвах в Центральной Азии и Южном Кавказе [Текст] / Т. Кристина, В. Попова, Т. Хужаназаров и др. //Ташкент. – 2016. – 35 с.

[40]. Кузнецов, Вл.В. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм и регуляция [Текст] / Вл.В. Кузнецов, Н.И. Шевякова //Физиол. Растений. – 1999. – Т.46, вып. 2.– с. 305-320.

[41]. Кузнецов, Вл. В. Стрессовые белки и фитогормоны при адаптации растений *Cucumis sativus* к почвенной засухе [Текст] /В. В. Кузнецов, 222 Т. Н. Пустовойтова, И. А. Яценко и др. // Докл. АН СССР. – 1992. – Т. 32. – С. 204-207.

[42]. Кузнецов, С.В. Быстрые температурные колебания как фактор синхронизации процессов спонтанного возбуждения у крысят [Текст] / С.В. Кузнецов. - Журнал эволюционной биохимии и физиологии. - 1999. - Т. 35. - 376 с.

[43]. Кумаков, В. А. Засуха и продукционный процесс в посевах яровой пшеницы [Текст] / В. А. Кумаков, А.П. Илюшин, О.А. Евдокимова // С. - х. биол. 1994.- №3.- С. 105-114.

[44]. Ланкин, В.З. Исследование антиоксидантных свойств цитопротекторного препарата триметазидина (предуктала) *in vitro* и *in vivo* [Текст] / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Е.А.Жарова и др. // - Кардиология. - 2001. - Т. 41. № 3. – 2128 с.

[45]. Ланкин, В.З. Антиоксиданты в комплексной терапии атеросклероза: *pro et contra* [Текст] / В.З. Ланкин, А.К. Тихадзе, Ю.Н. Беленков //Кардиология. –2004. – №2. – С.72-81.

[46]. Лукаткин, А.С. Интенсивность перекисного окисления липидов в охлажденных листьях теплолюбивых растений [Текст] / А.С. Лукаткин, В.С. Голованова //Физиология растений. 1988. Т. 35. Вып. 4. С. 773-780.

[47]. Лукаткин, А.С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс [Текст] / А.С. Лукаткин // Саранск: Изд-во Мордов. - 2002, 208 с.

[48]. Меньщикова, Е.Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты [Текст] / Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков. - М.: Издательский дом «Слово». – 2006. - С.- 115.

[49]. Мерзляк, М. Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительных клеток [Текст] / М. Н. Мерзляк //Итоги науки и техники. Сер. «Физиология растений». – М: ВИНТИ, 1989. – Т.6. – 168 с.

[50]. Мерзляк, М.Н. Активированный кислород и жизнедеятельность растений [Текст] /М.Н. Мерзляк // Соросовский образовательный журнал. - 1999. - № 9. – С. 20 - 26.

[51]. Мирзохонова, Г.О. Влияние фитогормонов и водного дефицита на инициацию, рост клубней и активность белоксинтезирующей системы растений-регенерантов картофеля *in vitro*: дис... канд. биол. наук [Текст] / Г.О. Мирзохонова. – Душанбе, 2006. – 129 с.

[52]. Мирзохонова, Г.О. Действие водного стресса на содержание полирибосом растений-регенерантов картофеля [Текст] / Г.О.Мирзохонова, Н.Н.Назарова, З.Б.Давлятназарова, К.А.Алиев // Известия АН РТ. Отд. биол. и мед. наук. – 2005. – № 6. – С. 40-44.

[53]. Назарова, Н.Н. Культура столонов и регуляция роста растений и клубнеобразования картофеля *in vitro*: автореф. дис. канд. биол. наук [Текст] / Н.Н. Назарова. – Душанбе, 2006. – 23 с.

[54]. Назарова, Н.Н. Интенсификация производства оздоровленного картофеля с применением биотехнологии столоновых культур: дис. ... д-ра сельхоз. наук [Текст] / Н.Н. Назарова. – Душанбе. 2015. – 210 с.

[55]. Назарова, Н.Н. Технологический процесс воспроизводства исходного семенного материала на основе столоновых культур[Текст] / Н.Н.Назарова, А.Ф. Салимов, Т.Х. Яхёева // Защита картофеля.- 2014. № 1. С. 3-4.

[56]. Насыров, Ю.С. Физиологическая стратегия селекции растений [Текст] /Ю.С. Насыров // Селекция продуктивных сортов. Знание. Новое в жизни, науке, технике. М. - 1986. - №12. - С. 31-43.

[57]. Ничипорович, А. А. Фотосинтетическая деятельность растений как основа их продуктивности в биосфере и земледелии [Текст] / А. А. Ничипорович // Фотосинтез и продуктивный процесс. М. - 1988. - С. 5-28.

[58]. Норкулов, Н.Х. Показатели водного режима и засухоустойчивость генотипов растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) [Текст] / Н.Х. Норкулов, З.Б. Давлятназарова, С.Х. Ашуров, Н.Н. Назарова, К.А. Алиев // Вестник Таджикского национального университета. Серия естественных наук. – 2014. – № 1–3 (134). – С. 160–164.

[59]. Норкулов, Н.Х. Роль антиоксидантных ферментов в развитии устойчивости растений к стрессорному воздействию [Текст] / Н.Х. Норкулов, З.Б. Давлятназарова, М.Л. Азимов, З. Киёмова, К. Алиев // Вестник Таджикского национального университета. Серия естественных наук. – 2014.– № 1–2 (130). – С. 167–173.

[60]. Норкулов. Н.Х. Биохимические показатели разнотолерантных генотипов картофеля при воздействии стрессоров: автореф. дис. ... канд. биол. наук: [Текст] / Н.Х. Норкулов. – Душанбе, 2017. – 40 с.

[61]. Полесская, О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода [Текст] / О.Г. Полесская. – М.: КДУ, 2007. – 140 с.

[62]. Полесская, О.Г. Изменение активности антиоксидантных ферментов в листьях и корнях пшеницы в зависимости от формы и дозы азота в среде / О.Г.Полесская, Е.И.Каширина, Н.Д. Алехина// Физиол. растений. -2004.-С.686-691.

[63]. Полесская, О.Г. Влияние солевого стресса на антиоксидантную систему растений в зависимости от условий азотного питания [Текст] / О.Г. Полесская, Е.И. Каширина, Н.Д. Алехина // Физиология растений. - 2006. - Т.53. - С. 207-214.

[64]. Сидоров, В.А. Соматическая гибридизация пасленовых [Текст] / В.А. Сидоров, Н.М. Пивень, Ю.Ю. Глеба и др. // Наук, думка. Киев.- 1985.- С.130.

[65]. Сидоров, В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция [Текст] / В.А. Сидоров // Наук, думка. Киев.- 1990.- С.280.

[66]. Сидоров, В.А. Клеточная селекция [Текст] /В.А. Сидоров. - Киев: Наукова Думка, 1990. - 280 с.

[67]. Синкевич, М.С. Процессы, препятствующие повышению интенсивности перекисного окисления липидов у холодостойких растений при гипертермии [Текст] / М.С. Синкевич, Н.В. Нарайкина, Т.И. Трунова // Физиология растений. - 2011. -Т.58. - №6. - С. 875-882.

[68]. Тарчевский, И.А Метаболизм растений при стрессе [Текст] / И.А. Тарчевский // Казань: ФЭН – 2001. – 448 с.

[69]. Файзиева, С. А. Регенерационная активность разных генотипов пшеницы и эгилопса в культуре *in vitro*. дис... канд. биол. наук [Текст] / С. А. Файзиева– Душанбе, 2009. – 120 с.

[70]. Часов, А.В. Peroксидаза клеточной поверхности –генератор супероксид-аниона в корнях клеток пшеницы при раневом стрессе [Текст] / А.В. Часов, Л.Х. Гордон, О.Н Колесников и др.// Цитология. – 2002- Т.44 -С. 691-696.

[71]. Электронный источник: <http://nashkartofel.ru/>

[72]. Электронный источник:
<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8908>

[73]. Электронный источник: <http://www.fao.org/ag/agagl/spush>

[74]. Электронный источник: <https://propozitsiya.com/virusnye-bolezni-kartofelya-i-borba-s-nimi>

[75]. Abo El-Nil, M.M. Differentiation of virus-symptomless geranium plants from anther callus/ M.M Abo El-Nil, A.C. Hildebrandt // Plant Dis. Repr.- 1971.- P. 1017-1020.

[76]. Abogadallah, G. M. Antioxidative defense under salt stress [Text] / G. M. Abogadallah // Plant Signal Behav. – 2010. – Vol.5. – P. 369-74.

[77]. Aebi, H. Catalase in vitro. B. Isolation, purification, characterization, and assay of antioxygenic enzymes [Text]/ H.Aebi //Methods in Enzymology. – 1984. – V. 105. – P. 121-126.

[78]. Alscher, R.G. Role of Superoxide Dismutase in Controlling Oxidative Stress in Plants [Text] / R.G. Alscher, N. Erturk, L.S. Heath //J. Exp. Bot. - 2002. - V. 53. - P. 1331-1342.

[79]. Al-Zahim, M. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis [Text]/M. Al-Zahim, B.Ford-Lloyd, H. Newbury// Plant Cell Reports.-1999.-P. 473-477.

[80]. Amato, D. Nuclear cytology in relation to development [Text] / D.Amato //Cambridge: Univ. press. - 1977.

[81]. Bannaceur, S.A. Genetic diversity of the date palm (*Phoenix dactylifera*) from Algeria revealed by enzyme markers [Text]/ S.A. Bannaceur, C. Lanaud, H. Chvallier, N. Bounaga // Plant Breed. -1991.-P. 56-69.

[82]. Bartosz, G. Oxidative Stress in Plants [Text]/G. Bartosz // Acta Physiol Plant.- 1997.- P.47-64.

[83]. Beauchamp, C. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels [Text] / C. Beauchamp, I. Fridovich// Anal. Biochem.- 1971.-P.276-287.

[84]. Bellincampi, D. Extracellular H₂O₂ induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the Auxin-Regulated rolB gene expression in tobacco leaf explants[Text]/ D. Bellincampi et al// Plant physiology.-2000.-P.1379-1385.

[85]. Benson, E.E. Free radical damage in stored plant germplasm [Text] / E. E. Benson //International Board for Plant Genetic Resources.- 1990.- P. 32-67.

[86]. Brennan, T. Involvement hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear [Text] / T.Brennan, C. Frenkel // Plant physiol. – 1997-V.59. - P. 411-416.

[87]. Brown, R. K. Peroxides and other products. In “Free Radicals - A practical approach”/ R.K. Brown, F. J. Kelly [Text] // Pun chard, N. A. Kelly, F. J. et al. //IRL Press at Oxford University Press, Oxford. - 1996.

[88]. Chawla, S. Salinity induced oxidative stress and antioxidant system in salt – tolerant and salt-sensitive cultivars of rice (*Oryza sativa* L.) [Text] / S. Chawla, S. Jain, V.J. Jain //Plant Biochem. Biotechnol. - 2013.- V. 22. - P. 27-34.

[89]. Cheeseman, K.H. Initiation and Pathobiological consequences of lipid peroxidation in free Radicals in the Environment, Medicine, and Toxicology. Nohl,H., Esterbauer,H., Rice-Evans, C. eds [Text] /K.H. Cheeseman //Richelieu Press, London. -1994.

[90]. Corpas, F.J. Impact of nitric oxide (NO) on the ROS metabolism of peroxisomes [Text] / F.J. Corpas, L.A. Del Río, J.M. Palma // Plants.- 2019.- V. 8, 37.-P.1-10.

[91]. Cutler, A. J. Role of oxidative stress in cereal protoplast recalcitrance [Text] / A. J. Cutler, M. Saleem, M.A. Coffey, M. K. Loewen // Plant Cell Tiss. Org. Cult. -1989.-P.113- 127.

[92]. Dietz, K.J. Thiol-based peroxidases and ascorbate peroxidases: Why plants rely on multiple peroxidase systems in the photosynthesizing chloroplast? [Text] / K.J. Dietz // Mol. Cells.- 2016.-V. 39.- P. 20.

[93]. Ehsanpour, A.A. Detection of somaclonal variation in potato callus induced by UV-C radiation using RAPD – PCR [Text] / A.A. Ehsanpour, S.Madani, M. Hoseini M. K.// Gen. Appl. Plant Phys. -2007.-P. 3–11.

[94]. Esterbauer, H. Estimation of peroxidative damage [Text]/ H. Esterbauer // Path. Biol. 1996. 44:25-28.

[95]. Evans, D.A. Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. [Text]/ D.A. Evans W.R. Sharp //Science.- 1983.-V. 221.-P. 949-951.

[96]. Evans, D.A. Somaclonal and gametoclonal variation/ D.A. Evans, W.R. Sharp, H.P. Medina-Filho // Amer. Jour. Bot. - 1984. - P. 759-774.

[97]. Farahani, F. Somaclonal variation in Dezful cultivar of olive (*Olea europaea* subsp. *europaea*) [Text] / F. Farahani, R. Yari, S.Masoud // Gene Conserve. - 2011.V. 10. - P.216–221

[98]. Faried, H. F. Salinity impacts ionic, physiological and biochemical attributes in potato [Text] / H. F. Faried, C. M. Ayyub, M. Amjad et al // Pak. J. Agri. Sci. - 2016.- V. 53.- P. 17-25.

[99]. Foyer, C. H. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling [Text] /C.H. Foyer, L. Lopez-Delgado, J.F. Dat, I.M. Scott // Physiol. Plant.- 1997.-P. 241-254.

[100]. Foyer, C.H. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling [Text] / C.H. Foyer, G. Noctor //New physiol. – 2000. –Vol. 146. – P. 359- 388.

[101]. Foyer, C.H. Redox regulation in photosynthetic organisms: Signaling, acclimation, and practical implications. [Text] / C.H. Foyer, G. Noctor // Antioxid and redox signaling. – 2009. –Vol. 11. – P. 861- 905.

[102]. Frank, T. Reducing properties, and markers of lipid peroxidation in normal and hyperhydrating shoots of *Prunus avium* L. [Text] / T. Frank, C. Kevers, C. Penel, H. Greppin et al. // *J. Plant Physiol.*- 1998.-P.339-346.

[103]. Gannopolitis, G. N. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants [Text] / G. N. Gannopolitis, S. K. Ries // *Plant Physiol.* - 1977.-P.309-314.

[104]. Gengenbach, B.G. Inheritance of selected pathotoxin resistance in maize plants regenerated from cell cultures [Text] / B.G. Gengenbach, C.E. Green, CM Donovas//*Proc. Nat. Acad. Sci.* -1977.-P. 5113-5117.

[105]. Gupta, B. Mechanisms of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization [Text] / B.Gupta, B. Huang // *Int. J. Genom.* -2014. - P. 1-18.

[106]. Haritha, H. Evaluation of Salinity and Water Stress Tolerance in Potato Genotypes: Biochemical Characterization of the Tolerance Response [Text] / H. Haritha // University of Agricultural Sciences GKVK: Bengaluru, India, 2017.

[107]. Hartmann, H.T. Plant propagation/ H.T.Hartmann, D. E. Kester // Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.-1983.

[108]. Hasanuzzaman, M. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator [Text] / M. Hasanuzzaman, M.H. Bhuyan, F. Zulfiqar et al // *Antioxidants.*- 2020. V. 9.-P. 681.

[109]. Hasanuzzaman, M. Regulation of ROS metabolism in plants under environmental stress: A review of recent experimental evidence [Text] / M. Hasanuzzaman, M.H. Bhuyan, K. Parvin et al // *Int. J. Mol. Sci.* - 2020. V. 21.-P. 8695.

[110]. Heinz, D.J. Sugarcane improvement through induced mutations using vegetative propagules and cell culture techniques. In: Induced mutations in vegetatively propagated plants [Text] /D.J. Heinz // *Proc. of a Panel, Intern. Atomic Energy Agency, Vienna.*-1973.-P. 53-59.

[111]. Hodges, D. M. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substance assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and

other interfering compounds [Text] / D. M. Hodges, J.M. Delong, C.F. Forney et al // *Planta*. -1999. -V. 207. -P. 604-611.

[112]. Huang, S. The roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signaling and stress responses in plants [Text] / S. Huang, O. VanAken, M. Schwarzländer et al // *Plant Physiol.* – 2016.- V. 171-P. 1551–1559.

[113]. Hung, K. T. Lipid peroxidation in relation to senescence of maize leaves [Text] /K.T. Hung, C.H. Kao // *J. Plant Physiol.*- 1997.-P.283-286.

[114]. Ishii, S. Factors influencing protoplast viability of suspension-cultures rice cells during isolation process [Text] / S. Ishii // *Plant Physiol.* - 1988.-P.26-29.

[115].Jaarsma, R. Effect of salt stress on growth, Na⁺ accumulation and proline metabolism in potato (*Solanum tuberosum*) cultivar [Text] / R. Jaarsma, R. S. De Vries M., A. H. De Boer // *PLOS ONE*. - 2013. - V. 8. –P. 183.

[116]. Jackson, J.A. Habituation: Cultural curiosity or developmental determinant [Text] / J.A. Jackson, R.F. Lyndon / / *Physiol Planta*.-1990.-P.579–583.

[117]. Jagtap, V. Variation in the antioxidant metabolisms of drought tolerant and drought susceptible varieties of *Sorghum Bicolor* (L.) Moench. Exposed to high light, low water and high temperature stress [Text] / V. Jagtap, S. Bhargava // *J. Plant Physiol.* – 1995.-P.195-197.

[118]. Jank, U. M. On the origin and fate of reactive oxygen species in plant cell compartments [Text] / U. M. Jank, L. Luhová, M. Petřivalský // *Antioxidants*. - 2019. - P. 8-12.

[119]. Jiang, C. Regenerant *Arabidopsis* lineages display a distinct genome-wide spectrum of mutations conferring variant phenotypes [Text] / C. Jiang , A. Mithani , X. Gan, et al.// *Curr Biol* . – 2011. - P. 1385–1390.

[120]. Joy, R. W. Ascorbic acid enhancement of organogenesis in tobacco callus. *Plant Cell Org* [Text] / R.W. Joy, K. R. Patel, T. A. Thorpe// *Tiss. Cult.*- 1988.-P. 219-228.

[121]. Kaeppler, S.M. DNA methylation and tissue culture-induced variation in plants [Text] /S.M. Kaeppler, R.L. Phillips// In Vitro Cell Dev. Biol. - 1993.-P. 125–130.

[122]. Karp, A. On the current understanding of somaclonal variation. In: Miflin B J (ed.) [Text] / A. Karp // Surveys of Plant Molecular and Cell Biology, Oxford University Press.-1982.-P. 1-58.

[123]. Kerchev, P. Lack of glycolate oxidase1, but not glycolate oxidase2, attenuates the photorespiratory phenotype of catalase2- deficient Arabidopsis [Text] / P. Kerchev, C. Waszczak, A. Lewandowska et al //Plant Physiol. -2016. V. 171. - P. 1704–1719.

[124]. Khan, S.J. Somaclonal variation in sugarcane through tissue culture and subsequent screening for salt tolerance [Text] / S.J. Khan, M.A. Khan, H.K. Ahmad, R.D. Khan, Y. Zafar // Asian J. Plant Sci.-2004.-P. 330-334.

[125]. Khatab. I.A. Detection of somaclonal variations in potato using RAPD markers[Text] / I.A. Khatab IA, N. El-Banna Antar.// Egypt. J. Genet. Cytol .- 2011.P. 227-238.

[126]. Kohli, S.K. Assessment of subcellular ROS and NO metabolism in higher plants: Multifunctional signaling molecules [Text] / S.K. Kohli, K. Khanna, R. Bhardwaj et al // Antioxidants. - 2019. - P. 641.

[127]. Krishna, H. Mango explants browning: effect of ontogenic age: mycorrhization and pre-treatments [Text] / H Krishna, R.K. Sairam, S.K. Singh et al // Sci Hortic. -2008.- V. 118. – P.132–138.

[128]. Krishnamurthi, M. Notes on disease resistance of tissue culture sub-clones and fusion of sugarcane protoplasts [Text] / M.Krishnamurthi, J. Tlaskal // Sugarcane Breeder's Newslett. -1974.-P.35: 24-26.

[129]. Kumar, GNM. Involvement of auxin in the loss of apical dominance and plant growth potential accompanying aging of potato seed-tubers[Text] / G.N.M. Kumar, N.R. Knowles //Can J Bot.- 1993.

[130]. Kumar, S. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview [Text] / S. Kumar, A. K. Pandey // The Scientific World Journal. – 2013. - Vol. 10.–P. 1155.

[131]. Larkin, P. Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement[Text] / P. Larkin, W. Scowcroft // Theor Appl Genet. - 1981.-P.197–214.

[132]. Le Dily, F. Does altered nitrogen metabolism and H₂O₂ accumulation explain the vitrified status of the fully habituated callus of *Beta vulgaris* L. [Text] / F.Le Dily, C. Huault, T. Gaspar, J.P. Billard // Plant Tiss. Org. Cult.-1993.-P.69-74.

[133]. Levine, A. Oxidative stresses as a regulator of environmental responses in plants [Text] / A. Levine, H.R. Lerner, (ed.) // Plant Responses to Environmental Stresses. From Phytohormones to Genome Reorganization.-199. - P. 247-264.

[134]. Lichtenthaler, H.K. Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthetic biomembranes [Text] / H.K. Lichtenthaler // Method. Enzymol. - 1987. -V. 148. - P. 350–382.

[135]. May, M. J. Involvement of reactive oxygen species, glutathione metabolism in the C/-gene-dependant defense response of tomato cotyledons induced by race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* [Text] / M.J. May, K.E. Hammond-Kosack, J.D.G. Jones // Plant Physiol.- 1996.-P.1367-1379.

[136]. Miller, G. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses [Text] / G. Miller, N. Suzuki, S. Ciftci-Yilmaz et al // Plant Cell Environ. -2010. -V. 33. - P. 453–467.

[137]. Muller, E. DNAvariation in tissue-culture-derived rice plants[Text] / E. Muller, P.Th.Brown, S. Hartke, H.T. Lorz // Theor Appl Genet . – 1990.-P. 673–679.

[138]. Munns, R. Mechanisms of Salinity Tolerance [Text] / R. Munns, M. Tester // Annual Review of Plant Biology. - 2008. -Vol. 59. - P. 651 -681.

[139]. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [Text] / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962.–P.473-497.

[140]. Nakano, Y. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific in spinach chloroplasts [Text] / Y.Nakano, K. Asada // *Plant cell physiol.* – 1981. – V. 22. – P. 867 – 880.

[141]. Poljsak, B. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress [Text] / B. Poljsak // *Oxidative medicine and cellular longevity* // Hindawi Pub. Corp. – 2011. – Vol. 2011. – P. 1-15.

[142]. Poljsak, B. The Neglected Significance of “Antioxidative Stress” [Text] / B. Poljsak, I. Milisav // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* – 2012. – Vol.10. P. 1155.

[143]. Rai, M.K. Developing Stress Tolerant Plants through in Vitro Selection—An Overview of the Recent Progress [Text] / M.K. Rai, R.K. Kalia, R. Singh, M.P. Gangola, A.K. Dhawan // *Environ. Exp. Bot.* 2011, 71, 89–98. [CrossRef]

[144]. Ramos, M. A. Effect of DS toxin upon the permeability of sugarcane leaf and callus tissue [Text] / M.A.Ramos, I. Ruiz , Sandoval R.H. Maribona // *Plant Breeding.* – 1991.-P. 242-247.

[145]. Rani, V. Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: a critical reappraisal [Text] / V. Rani, S. Raina // *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant.*-2000.-P. 319-330.

[146]. Reumann, S. Characterization, prediction and evolution of plant peroxisomal targeting signals type 1 (PTS1s) [Text] / S. Reumann, G. Chowdhary, T. Lingner. *Biochim. Biophys. Acta.* - 2016. V. 1863.-P. 790–803.

[147]. Rosenberg, V. Somaclonal variation in potato meristem culture and possibility to use this phenomenon in seed potato production and breeding [Text] / V.Rosenberg , A.Tsahkna, K.Kotkas et al.// *Agronomy Research* 8 (Special Issue III).-2010.-P. 697–704.

[148]. Salin, M.L. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast [Text] / M.L. Salin // *Physiol. Plant.* - 1987. -P.681-689.

[149]. Saravanan, S. Identification of DNA elements involved in somaclonal variants of *Rauvolfia serpentina* (L.) arising from indirect organogenesis as evaluated by ISSR analysis [Text] / S. Saravanan , R. Sarvesan , M.S. Vinod // *Indian J Sci Technol .* - 2011. - V.4. - P.1241–1245

[150]. Scandalios, J. G. Response of plant, antioxidant defense genes to environmental stress. In “Advances in Genetics” [Text] / J.G. Scandalios, T.R. Wright // Academic press Inc, USA. - 1990.

[151]. Shahid S.A. Soil salinity development, classification, assessment, and management in irrigated agriculture [Text] / S.A. Shahid, K. Rahman // *Handbook of Plant and Crop Stress* /Ed. Pessarakli M. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group. - 2011. - P. 23-38.

[152]. Shakirova, F.M. Salicylic acid induced protection against cadmium toxicity in wheat plants [Text] / F.M. Shakirova, C.R. Allagulova, D.R. Maslennikova et al // *Environ. Exp. Bot.* – 2016. V. 122.-P. 19–28.

[153]. Sharma, A. Correlation and heat susceptibility index analysis for terminal heat tolerance in bread wheat [Text] / A. Sharma, R.S. Rawat, J.S. Verma, J.P. Jaiswal // *J Central Eur Agri.* - 2013- P.57–66. doi:10.5513/JCEA01/14.2.1233

[154]. Sharma, P. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions [Text] / P. Sharma, A.B. Jha, R.S. Dubey et al // *J. Bot.* – 2012.- P.- 217037.

[155]. Shepard, J.F. Potato protoplasts in crop improvement [Text] / J.F. Shepard, D. Bidney, E. Shahin// *Science.* – 1980.-P.17-24

[156]. Singh, A. Reactive oxygen species-mediated signaling during abiotic stress [Text] / A. Singh, A. Kumar, S. Yadav, et al // *Plant Gene* 2019, 18, 100–173.

[157]. Smulders, M. Epigenetics in plant tissue culture [Text] / M. Smulders, G. De Klerk // *Plant Growth Regul.*-2011. - V.63. P.137–146.

[158]. Swartz, H.J. Field performance and phenotypic stability of tissue culture-propagated strawberries/ H.J. Swartz, G.H. Galletta, R.H. Zimmerman // J. Amer. Soc. Hort. Sci.- 1981. –P. 667-673.

[159]. Taylor, C.B. Proline and water deficit: ups, down, ins and outs [Text] / C.B. Taylor // Plant Cell. - 1996. - Vol.8. - P. 1221-1224.

[160]. Teixeira, J. High Salinity and Drought Act on an Organ-Dependent Manner on Potato Glutamine Synthetase Expression and Accumulation [Text] / J. Teixeira, S. Pereira // Environ. Exp. Bot. 2007, 60, 121–126. [CrossRef]

[161]. Tichá, I. Culture on sugar medium enhances photosynthetic capacity and high light resistance of plantlets grown in vitro [Text]/ I. Tichá, F. Čáp, D. Pacovská, P. Hofman et al. // Physiol. Plant. – 1998. - V.-102. -P. 155-162.

[162]. Turton, H. E. *Saccharomyces cerevisiae* exhibits a γ AP-1 -mediated adaptive response to malondialdehyde [Text] /H.E. Turton, I.W. Dawes, C.M. Grant // J. Bacteriol.-1997.-P.1096-1101.

[163]. Va'zquez, A.M. Insight into somaclonal variation [Text] / A.M. Va'zquez // Plant Biosyst. -2001. - V. 135. –P.57–62.

[164]. Van Breusegem, F. Unraveling the tapestry of networks involving reactive oxygen species in plants [Text]/ F. Van Breusegem, J. Bailey-Serres, R. Mittler // Plant Physiol. – 2008. V. 147. - P. 978–984.

[165]. Van Huylenbroeck. The evolution of photosynthetic capacity and the antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated *Calathea* plants [Text] /J.M. Van Huylenbroeck, A. Piqueras, P.C. Debergh, // Plant Sci.- 2000. -P. 59-66.

[166]. Verma, S. Yeast Toxicity induces Lipid peroxidation and alter the activities of antioxidant in growing rice plant [Text] / S. Verma, R.S. Dubey // Plant Sci. – 2003. - V.64. - P. 645-655.

[167]. Vuylsteke, D. Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm. Practical manuals for handling crop germplasm in vitro [Text]/D. Vuylsteke D// International Board for Plant Genetic Resources (IPGRI), Rome. - 1989.

[168]. Xinwen, Liang. Proline Mechanisms of Stress Survival [Text] / X. Liang, L. Zhang, S. K. Natarajan et al. – 2013. –V. 19(9). P. 998–1011.

[169]. Yang, H. Detection of somaclonal variation in cultured rice cells using digoxigenin-based random amplified polymorphic DNA [Text] / H. Yang, Y. Tabei, H. Kamada, T. Kayano, F. Takaiwa // Plant Cell Rep. - 1999. -P.520–526.

[170]. Zhang, J.L. Physiological and molecular mechanisms of plant salt tolerance. – Photosynth [Text]/ J.L.Zhang, H. Shi // Res. - 2013. V. 115.-P. 1-22.

[171]. Zhu, J.-K. Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. [Text]/ J.-K. Zhu // Annu. Rev. Plant Biol. - 2002.-P. 247–273.]

[172]. Zollner, H. Biological activities of 4- hydroxynonenal. In “Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants” [Text]/ H. Zollner, R.J. Schaur, H. Esterbauer // Academic Press.-1991. - P. 23-67.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в рецензируемых журналах:

[1-А]. Диловарова Н.С. Индукция антиоксидантной системы растений картофеля *Solanum tuberosum* [Текст] / Н.С. Диловарова, . Н.Х. Норкулов, З.Б. Давлятназарова, И.С. Каспарова, М. Садриддинов, К.А. Алиев А.К // Известия АН РТ. Отделение биол. и мед.наук. – 2020. – №2 (209). – С. 38– 45.

[2-А]. Диловарова Н.С. Формирование содержание фотосинтетических пигментов в условиях *in vitro* и *ex vitro* у растений регенерантов картофеля *Solanum tuberosum* [Текст] / Н.С. Диловарова, Н.Х. Норкулов, У.К. Алиев, М.Х. Шукурова, К.А. Алиев // Известия АН РТ. Отделение биол. и мед.наук. – 2021. – №1(212). – С.74–81.

[3-А]. Диловарова Н.С. Органоспецифичность при –и антиоксидантной системы в условиях *in vitro* и *ex vitro* у картофеля [Текст] / Н.С. Диловарова, К.А. Алиев, Н.Х. Норкулов, М.Х. Шукурова, З.Х. Норкулова // Докл. АН РТ, 2021, Т. 64, № 5- 6. С. 341-345.

[4-А]. Диловарова Н.С. Функционирование про-и антиоксидантной системы у растений картофеля *in vitro* [Текст] / Н.С. Диловарова, Н.Х. Норкулов, М. Садриддинов, К.А. Алиев // Известия АН РТ. Отделение биол. и мед.наук. – 2021. – №2(213). – С.37–43.

[5-А]. Диловарова Н.С. Перекисное окисление липидов у растений *Solanum tuberosum* L. в условиях *ex vitro* [Текст] / Н.С. Диловарова // Докл. АН РТ, 2022, Т. 65, № 1- 2. С. 128-131.

Статьи и тезисы в сборниках конференций:

[6-А]. Диловарова Н.С. Морфофизиологические и биохимические основы устойчивости растений картофеля *in vitro*. //Н.С. Диловарова, М.Ш. Гафурова, О.А. Рахимов.//Сборник научных статей. Республиканская научно –практическая конференция студентов, магистров, докторантов на тему «Вклад молодежи в применение современных инновационных технологий в науке и сельскохозяйственном производстве» Душанбе 2022. С 10-14.

[7–А]. Диловарова Н.С. Фотосинтетические пигменты генотипов картофеля в условиях водно-солевого стресса *in vitro* и *ex vitro* [Текст] / Н.С. Диловарова, З.Х. Норкулова, К.А.Алиев // Материалы Республиканской научно-практической конференции «Биоразнообразии горных экосистем Памира в связи с изменением климата» г. Хорог 2021. С. 151-153.

[8–А]. Диловарова Н.С. Ориганоспецифичность антиоксидантной системы защиты картофеля [Текст] / Н.С. Диловарова, Н.Х. Норкулова, М.Х. Шукурова, З.Х. Норкулова, // Республиканской научно-практической конференции «Биоразнообразии горных экосистем Памира в связи с изменением климата» Душанбе 2021. С. 153-154.

[9-А] Диловарова Н.С. Действие полиэтиленгликоля на содержание воды и пролина в листьях разно-устойчивых растений- регенерантов картофеля *ex vitro* [Текст] / Н.С. Диловарова, З.Б. Давлятназарова, М.Х. Шукурова, К.А. Алиев // International scientific and theoretical conference on the topic. “Use of innovative methods in increase of productivity of fruit trees, grapes, vegetable crops and poteto” Душанбе 2022. С .185-188.

[10-А] Диловарова Н.С. Ориганоспецифичность системы защиты растений картофеля в условиях стресса[Текст] / Н.С. Диловарова, З.Х. Норкулова, К.А. Алиев //Международной научной конференции. «Становление и развитие экспериментальной биологии в Таджикистане» Душанбе 2022. С 52-53.

[11–А]. Диловарова Н.С. Особенности накопления антиоксидантных ферментов у картофеля *Solanum tuberosum* L. в условиях *in vitro* и *ex vitro*. // XV Международной научно-практической конференции «Образование и наука для устойчивого развития», посвящённой Международному году фундаментальных наук в интересах устойчивого развития. – М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева Москва 2023. С.43-45.