

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 581.1

doi: 10.17223/19988591/55/7

М.К. Кадырбаев¹, И.Ф. Головацкая¹, М.Ж. Сатканов²

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет,
г. Томск, Россия

²Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, г. Нур-Султан, Казахстан

Особенности морфогенеза и метаболизма регенерантов *in vitro*, полученных из разных фрагментов побега картофеля

Исследованы особенности регенерации эксплантов, полученных с разных участков побега *Solanum tuberosum* L. среднеспелого сорта Луговской *in vitro*. Определена динамика процессов ризогенеза (появление и рост адвентивных корней) и формирования побега (раскрытие почек, растяжения побега и формирование новых листьев) регенерантов из почек у микроклонов 3-го и 5-го ярусов материнских растений. Изучены ростовые и физиологические параметры регенерантов картофеля. Экспланты культивировали *in vitro* на питательной среде Мурасиге–Скуга, на свету 200–230 мкмоль м⁻²с⁻¹. Экспланты, полученные из средней части побега материнского растения, раньше восстанавливали утраченный побег за счет пробуждения почки. Экспланты, полученные из апикальной части исходного растения, активнее формировали корневую систему. На 39-е сутки регенеранты из почек апикального экспланта (AR) отличались более крупными размерами, чем регенеранты из почек среднего экспланта (MR); увеличивались объём корней, длина и количество ярусов побегов, суммарная площадь листьев. Отношение сухой массы побега к корню у AR выше по сравнению с MR. При этом в средних листьях AR обнаружено снижение интенсивности перекисного окисления липидов, уровней свободного пролина и суммы флавоноидов на 22%, 28% и 2-кратно соответственно по сравнению с MR. Обсуждается механизм регенерации микроклонов и участия в этих процессах эндогенных ауксинов, имеющих градиент в осевой части растения, и отдельных метаболитов. Использование результатов исследований позволяет разработать способы ускорения регенерации микроклонов картофеля и повышения коэффициента размножения растений.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*; регенерация; перекисное окисление липидов; антиоксиданты; фотосинтетические пигменты

Сокращения [Abbreviations]: AdR – адвентивные корни [Adventive roots]; AR – регенерант, полученный из апикального фрагмента побега [Regenerant obtained from the apical shoot fragment]; MR – регенерант, полученный из среднего фрагмента побега [Regenerant obtained from the middle shoot fragment]; MS – питательная среда Мурасиге–Скуга [Culture medium Murashige-Skuga]; IAA – индоллил-3-уксусная кислота [Indole-3-acetic acid]; Ck – цитокинины [Cytokinins]; LPO – перекисное окисление липидов

[Lipid peroxidation]; MDA – малоновый диальдегид [Malondialdehyde]; ROS – активные формы кислорода [Reactive oxygen species]; Flav – флавоноиды [Flavonoids].

Для цитирования: Кадырбаев М.К., Головацкая И.Ф., Сатканов М.Ж. Особенности морфогенеза и метаболизма регенерантов *in vitro*, полученных из разных фрагментов побега картофеля // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 55. С. 114–134. doi: 10.17223/19988591/55/7

Введение

Одним из наиболее быстрых способов размножения растений служит биотехнологический способ апикальной меристемы. Микроклональное размножение оздоровленных растений картофеля позволяет получить большое количество клонов, сохраняющих все характеристики сорта, а в последующем на основе их регенерантов получить в условиях гидропоники семенной материал (мини-клубни). Среди важных проблем микроклонального размножения растений картофеля выделяют две: скорость регенерации микроклонов (укоренение микроклонов и развитие регенерантов) *in vitro* и величину коэффициента размножения (количество ярусов). На регенерацию микроклонов растений существенное влияние оказывает фактор травмирования побега. В ответной реакции на действие этого фактора ключевую роль играют растительные гормоны [1]. Наиболее важными регуляторами роста растений служат фитогормоны ауксины и цитокинины (Ск) [2].

Ауксины представляют собой класс незаменимых фитогормонов, участвующих в многочисленных аспектах роста и развития растений. Среди представителей класса наиболее активно действующей является индолил-3-уксусная кислота (IAA) [3]. Ауксины синтезируются не только в побегах (меристема побегов, семядоли, молодые листья, обладающие наибольшей активностью клеточного деления), но и в кончиках корней [4, 5]. Ауксины, образуемые в корнях, необходимы для нормального их развития и играют одну из центральных ролей в организации окончательной архитектуры корня. Эти гормоны влияют на прохождение органогенеза, действуют как локальный индуктивный сигнал, который перепрограммирует клетки, участвующие в закладке примордиев боковых корешков [5, 6]. Наиболее хорошо охарактеризованными эффектами изменения фенотипов корней, связанными с ауксинами, являются дозозависимое увеличение длины корневых волосков эпидермального происхождения, бимодальный эффект концентрации ауксинов на длину первичного корня, дозозависимое увеличение количества зачатков боковых корней и реакция на гравитацию. Динамические изменения концентрации и потока ауксинов воздействуют на формирование апикально-базальной оси растения [7].

Активные Ск представляют собой производные аденина с изопреноидной или ароматической боковой цепью, присоединенной к положению N⁶-аденинового кольца. Ск, обнаруженные в растениях, включают изопентениладенин (*iP*), *транс*-зеатин (*tZ*), *цис*-зеатин (*cZ*) и дигидрозеатин [8]. Состав Ск в разных тканях может различаться. Так, в ксилеме доминируют *tZ* и ри-

бозид *транс*-зеатина (*tZR*), а во флоэме преобладают производные *iP*-типа [9]. Преимущество тех или иных Ск в проводящих системах растений обусловлено разной экспрессией каталитических трансмембранных белков-рецепторов Ск в органах [10]. Ген рецептора CRE1/АНК4 (Cytokinin Response 1/Arabidopsis Histidine Kinase 4) активно экспрессируется в корнях, АНК2 экспрессируется примерно в одинаковой степени в розеточных листьях и корнях [11], тогда как АНК3 – в основном в побеге и контролирует метаболические процессы в листьях [10]. Рецепторы характеризуются неодинаковым сродством к разным гормонам цитокининового ряда. Рецепторы CRE1/АНК4 и АНК2 имеют более высокое сродство к *tZ* и *iP*, тогда как АНК3 – дигидрозеатину. С помощью обмена разными Ск может осуществляться «направленное» взаимодействие между разными удаленными частями растительного организма. Совместно с ауксином Ск стимулируют деление клеток в апикальной меристеме побега, меристемах пазушных почек и камбии, но подавляют активность меристем в корне растения [9]. Ск стимулируют рост листовой пластины за счет растяжения клеток; усиливают фотосинтез за счет стимуляции дифференциации хлоропластов и открывания устьиц, а также задерживают старение листьев. Они усиливают аттрагирующую способность органов и тканей, активируют образование пигментов в клетках, вызывают формирование побегов в культуре недифференцированных тканей [9]. Ск участвуют в формировании сосудистой системы и реакциях избегания тени, влияют на циркадные (суточные) ритмы, регулируют поглощение важнейших элементов из почвы. Увеличение содержания эндогенных *iP* и *ZR* в листьях и корнях положительно влияет на регулирование осмоса, эффективное использование воды, поддержание интенсивности фотосинтеза и накопление вследствие этого больше питательных веществ [8]. Ск участвуют в защите растений от неблагоприятных абиотических и биотических факторов окружающей среды [9]. Высокие уровни Ск способствуют улавливанию ROS за счет накопления антиоксидантов и активации антиоксидантных ферментов в корнях и побегах [8]. Кроме того, высокая концентрация бензиладенина вызывает накопление осмолита пролина.

Другим фактором, регулирующим скорость регенерации микроклонов, может служить возраст исходного растения или его метамеров [1, 12]. Последовательная закладка метамеров на побеге растений определяет возраст листьев разных ярусов и их гормональный статус, обуславливая специфику их роста и метаболизма. Ранее нами показаны градиенты содержания первичных и вторичных метаболитов в листьях *Lactuca sativa* разных ярусов [12]. Остаётся до конца невыясненной зависимость регенерации фрагментов растения картофеля, полученных с разных ярусов побега, от особенностей их метаболизма.

Цель данного исследования – изучение специфики регенерации микроклонов, морфогенеза и метаболизма их регенерантов в зависимости от положения фрагментов растения *Solanum tuberosum* L. *in vitro*, взятых в качестве

эксплантов. Нами проверена гипотеза о том, что имеющийся гормональный градиент ауксинов вдоль оси стебля картофеля обуславливает изменения регенерации средних и апикальных черенков (микрклонов), а также особенности формирования их регенерантов.

Материалы и методики исследования

Объектом исследования служили растения *Solanum tuberosum* L. средне-спелого сорта Луговской. Многократное клонирование оздоровленных материнских регенерантов *S. tuberosum*, полученных из Всероссийского научно-исследовательского института картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха (п. Коренево, Россия), позволило получить экспериментальные микрклоны. В ходе эксперимента вырезали средний и апикальный фрагменты из побега 5-ярусных 21-дневных растений картофеля. Фрагменты (экспланты), взятые с 3-го и 5-го ярусов побега, состояли из междоузлия, почки и листа. В качестве опытных клонов выбраны апикальные черенки, содержащие большее количество эндогенных ауксинов, в связи с пространственным разделением места синтеза и основного действия этих гормонов в растении. В качестве контроля – черенки, вырезанные из середины побега. Микрклоны культивировали на твердой агаризованной 50%-ной безгормональной питательной среде Мурасиге–Скуга (MS) с добавлением 3% сахарозы и витаминов тиамин, никотиновой кислоты и пиридоксина [13] на свету с плотностью потока падающих фотонов ФАР – 200–230 мкмоль м⁻²с⁻¹, при 16-часовом фотопериоде и температуре воздуха 20–22 °С. В качестве источника света служили люминесцентные белые лампы TL-D 58W/54-765 G13 («Philips», Польша). Относительную интенсивность света измеряли с помощью спектрометра AvaSpec-102/256/1024/2048, версия 6.2 («Avantes BV», Нидерланды).

В течение 3 недель культивирования микрклонов описывали фенологию их регенерации (формирование корней и развитие побегов из почек). Формирование адвентивных корней (AdR) оценивали по количеству и длине зачатков AdR. Анализировали динамику ростовых параметров (количество и суммарную длину корней, количество ярусов и длину побегов) молодых растений в пробирках. В конце культивирования на 39-е сутки регенеранты извлекали из пробирок и определяли их ростовые (массу органов, объём корней, длину побега и количество ярусов, площадь листьев) и биохимические параметры. Для определения сырой и сухой биомассы регенерантов использовали гравиметрический метод. Измерение площади поверхности листьев проводили с использованием программы «Moticam 2300» (Испания) на фотографиях, сделанных с помощью цифровой камеры через микроскоп «Micros» (Австрия). В листьях средних ярусов, фиксированных жидким азотом, измеряли интенсивность перекисного окисления липидов (LPO) и содержание свободного пролина. В спиртовом экстракте определяли содержание фотосинтетических пигментов. В воздушно-сухом материале определяли суммарное содержание флавоноидов и антоцианов.

Интенсивность LPO определяли по содержанию малонового диальдегида (MDA) с помощью его реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) и образования розового хромогена [14]. Навеску растительного материала измельчали в присутствии 20%-ной трихлоруксусной кислоты, затем экстракт освобождали от нерастворимых компонентов центрифугированием на центрифуге «Centrifuge 5430R» («Eppendorf», Германия) в течение 15 мин при $g \times 12\ 000$ и температуре 4 °С. Отбирали супернатант и с его аликвотой проводили реакцию с ТБК на водяной бане в течение 30 мин при температуре 98 °С. Оптическую плотность полученных окрашенных растворов измеряли на спектрофотометре «Genesys 10S UV-Vis» («Thermo Electron», Германия) при двух длинах волн (532 и 600 нм) и рассчитывали содержание MDA.

Уровень свободного пролина определяли на основе реакции с нингидрином в кислой среде [15]. Растительный материал тщательно измельчали в присутствии дистиллированной воды, центрифугировали в течение 17 мин при $g \times 10\ 000$ и температуре 4 °С. Отбирали аликвоту супернатанта, добавляли дистиллированную воду, уксусную кислоту и нингидриновый реактив. Полученную реакционную смесь инкубировали в течение 1 ч при температуре 95–100 °С, затем охлаждали в емкости со льдом. Измеряли оптическую плотность при длине волны 520 нм.

Содержание фотосинтетических пигментов определяли спектрофотометрически в экстрактах, полученных с помощью 96%-ного этилового спирта, по его оптической плотности при длинах волн 470, 644 и 662 нм и соответственно рассчитывали уровень каротиноидов, хлорофилла *b* и хлорофилла *a* по формулам, предложенным Lichtenthaler [16].

Определение содержания суммы флавоноидов (Flav) осуществляли на основе их комплексообразования с хлоридом алюминия и последующего измерения оптической плотности окрашенных растворов [17]. Навеску сухого растительного сырья трижды экстрагировали 70%-ным этиловым спиртом на кипящей водяной бане, экстракты объединяли. Аликвоту экстракта выдерживали в течение 40 мин в присутствии хлористого алюминия и уксусной кислоты. Раствор сравнения, не содержащий хлористого алюминия, готовили для каждой пробы отдельно. После прохождения реакции определяли оптическую плотность опытного раствора и стандартного раствора рутин при $\lambda=415$ нм. Вычисляли суммарное содержание Flav в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье.

Для определения содержания антоцианов навеску растительного сырья трижды экстрагировали 1%-ной соляной кислотой при температуре 40–45 °С, объединенный экстракт центрифугировали при $g \times 10\ 000$ в течение 10 мин. Оптическую плотность супернатанта измеряли на спектрофотометре при длине волны 510 нм относительно раствора сравнения – 1%-ный соляной кислоты. Сумму антоцианов вычисляли в пересчете на цианидин-3,5-дигликозид в абсолютно сухом сырье [17].

В эксперименте использовали 100 материнских растений, из которых получали по 100 апикальных и средних микроклонов. Микроклоны помещали на среду MS в пробирках и культивировали в осветительной установке. По мере культивирования отмечали состояние микроклонов и по прошествии 4 суток отбраковывали клоны, не давшие корни (10–20 клонов из разных вариантов). В дальнейшем наблюдения проводили за 40 микроклонами с близкими ростовыми реакциями. У 39-дневных регенерантов измерения ростовых параметров проводили у 20 микроклонов, другие 20 и остальные взяты для определения биохимических параметров, поскольку в эксперименте использовали только листья. Эксперимент проведен в пяти биологических повторностях, состоящих из 3–5 листьев, и в трех аналитических измерениях.

Для сравнения экспериментальных данных, подчиняющихся закону нормального распределения, использовали параметрический критерий Стьюдента. Значения *t*-критерия находили для 95%-ного уровня значимости ($p < 0,05$). На рисунках представлены средние арифметические значения (M) с доверительными интервалами ($M \pm 1,96 \text{ SEM}$) для 20–40 и 5 биологических повторностей и 3 аналитических при определении соответственно морфологических и биохимических параметров.

Результаты исследования и обсуждение

В ходе изучения регенеративных способностей микроклонов, полученных с разных ярусов картофеля сорта Луговской, использовали метод микроклонального размножения растений. Этот метод основан на активации уже существующих у растения побеговых меристем путем снятия апикального доминирования и индукции ризогенеза в результате поранения при черенковании. Корни появляются раньше, поскольку имеют важное значение для роста растений, обеспечивая функции поглощения воды и питательных веществ, а также закрепления растения в субстрате. В связи с этим корневая система растения является важным целевым признаком для улучшения урожайности.

При помещении микроклонов разных ярусов картофеля на одинаковую питательную среду (сахарозосодержащую агаризованную 50%-ную среду MS) наблюдали отличия по времени и скорости формирования адвентивных корней (AdR) и побегов (рис. 1, *A–D*). Визуализацию корней у черенков картофеля отмечали на 4–5-е сутки, что согласуется с временной шкалой формирования AdR у томатов (индукция – 0–3 дня, инициация – 3–5 дней, а растяжение AdR и выход из стебля – на 5-й день) [18]. Более активное образование корней и их растяжение происходило после 7 суток культивирования у клонов из апекса, по сравнению с клонами среднего яруса (рис. 1, *A, B*). К 10-м суткам культивирования у апикальных клонов формировалось 7 корней, тогда как у средних – 4 корня, их общая длина составила соответственно $9,04 \pm 0,36$ и $6,56 \pm 0,26$ см. Известно, что AdR формируются после

восприятия травмирующего раздражителя из клеток базального слоя перикарпика у стеблевых черенков томатов, которые сначала формируют неупорядоченный клеточный кластер, в итоге превращающийся в куполообразный примордий AdR [18]. Возможно формирование AdR и из других типов клеток и тканей в зависимости от вида растений [19]. Появление AdR на поверхности стебля сопровождается запрограммированной гибелью эпидермальных клеток [18].

У микроклонов среднего яруса раньше начинались раскрытие почек и рост первого междоузлия побега, чем у апикального микроклона (рис. 1, C, D). Согласно нашим предварительным данным по регенерации микроклонов разных ярусов, показано, что чем дальше находился микроклон от апекса, тем раньше пробуждалась у него почка (данные не приведены). Аналогичные данные получены при сравнении регенерации микроклонов, полученных с 3-го и 5-го ярусов, до 21-х суток.

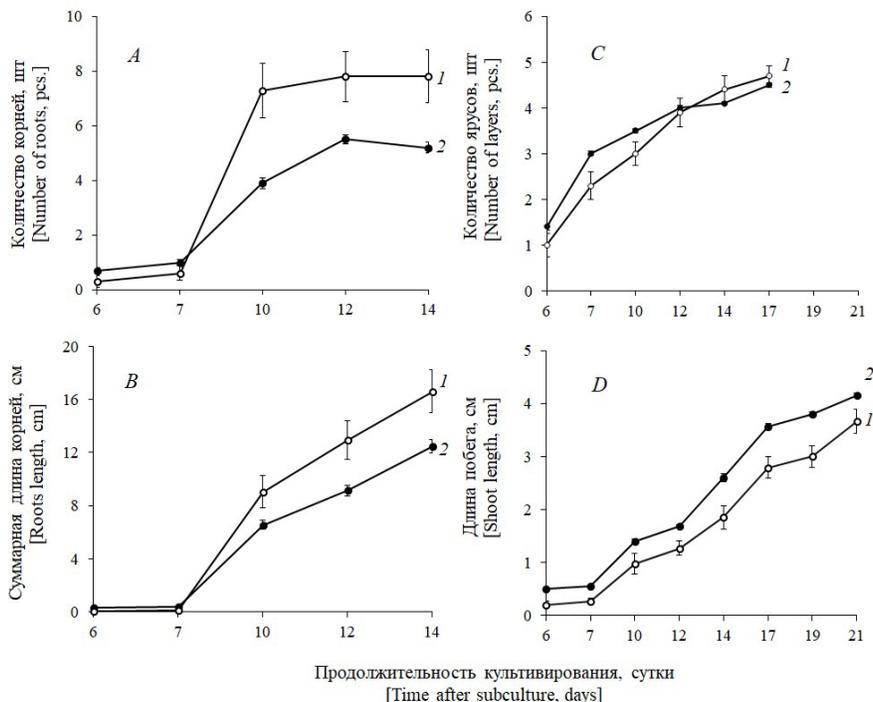


Рис. 1. Динамика ростовых параметров у апикальных (1) и средних (2) регенерантов *Solanum tuberosum* L. на начальных этапах их формирования ($M \pm 1,96$ SEM): A – количество корней, B – суммарная длина корней, C – количество ярусов, D – длина побега

[Fig. 1. Dynamics of growth parameters in apical (1) and middle (2) *Solanum tuberosum* L. regenerants at the initial stages of their formation ($M \pm 1,96$ SEM): A - Number of roots, psc.; B - Roots length, cm; C - Number of layers, psc.; D - Shoot length, cm]

Следует отметить проявление донорно-акцепторных связей между органами при формировании регенерантов. Преобладающий рост корневой системы (количество и длина корней) (см. рис. 1, *A, B*) у апикального микроклона вызывал торможение роста и развития побега (длина побега и количество ярусов) (см. рис. 1, *D, C*). В то время как у среднего микроклона происходила противоположная закономерность: преобладал рост побега при торможении роста корня.

В связи с существующим гормональным градиентом ауксинов вдоль оси стебля при клонировании материнских растений образуются метамеры с неоднородным гормональным пулом. Градиенты создаются за счёт базипетального транспорта ауксинов, синтезированных в апексе побега. Эти градиенты контролируют органогенез, поддерживая апикальное доминирование и тормозя развитие боковых почек. Известно, что действие гормонов подчиняется дозовому эффекту, что легко подтверждается эффективностью действия их различных концентраций на рост разных органов у проростков *Arabidopsis thaliana* [20]. С увеличением концентрации экзогенная IAA активировала растяжение элементов побега (гипокотилия и семядолей), но тормозила растяжение корня проростков дикого типа Col. Для определения судьбы клеток помимо концентрации также важен тип ауксина. Например, экзогенная 1-нафталинуксусная кислота (NAA) стимулирует удлинение клеток, а 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота вызывает их деление [21].

Гормональный статус клонов может влиять на их укоренение и пробуждение почки. На основе известных данных мы полагали, что если в апикальном метамере больше IAA, то, следовательно, и ризогенез будет проходить с большей скоростью, тогда как средний клон будет содержать меньше ауксинов, а следовательно, пробуждение почки будет происходить раньше и длина побега будет больше. Однако само поранение дополнительно изменяет гормональный баланс черенка. В соответствии с данными, полученными на черенках томата, гормональный баланс меняется уже через 5 ч, над местом иссечения стебля (0–0,5 см) накапливается IAA по сравнению верхним участком (2–2,5 см). В связи с этим авторы считают, что локальные максимумы ауксина способствуют образованию AdR [18]. Вслед за изменением содержания IAA показаны самые высокие уровни Z при 12 и 120 ч, что соответствовало фазам индукции и удлинения AdR соответственно. Обработка черенков экзогенной 10 мкМ IAA приводила к увеличению содержания Z в максимумах, соответствующих контролю, и наблюдались дополнительные максимумы на 36 и 72 ч, соответствующие фазе инициации AdR. При нарушении полярного транспорта (обработка NPA – 1-N-Naphthylphthalamic acid) в черенках снижен уровень Z. На основе этих данных авторы предположили, что взаимодействие ауксины–цитокинины, а не абсолютные уровни этих гормонов регулируют развитие AdR. Важную роль в образовании AdR может играть и этилен, поскольку над местом разреза у основания иссечен-

ного стебля томата IAA накапливалась аминокicloпропан-1-карбоновая кислота (предшественник этилена) [18].

Кроме того, согласно гипотезе регенерации корней *de novo* на листе [2] само поранение вызывает образование сигнала, который передается в клетки, преобразующие сигналы и активирующие синтез IAA. Этим сигнальным веществом может выступать жасминовая кислота [22]. Транспорт IAA к компетентным клеткам, обеспечивающим регенерацию, обуславливает изменения их программ развития под управлением ауксина.

В нашем случае регенерация корней картофеля происходила на уровне участка стебля, вследствие этого к предполагаемым механизмам, предложенным [2], добавляется синтез Sc и существующий базипетальный поток гормонов из осевой части микроклона и прилегающего листа [18]. Изменение во времени процессов регенерации микроклонов картофеля с разных ярусов растения могло быть связано не только с содержанием ауксинов, но и с разной скоростью транспорта IAA по разным транспортным системам, подключающимся к переносу гормона. При этом распределение ауксина с помощью полярного транспорта имеет много меньшую скорость (10 мм / ч), чем транспорт на большие расстояния с использованием флоэмы (7 см / ч в корне) [5]. За отток ауксина у томатов отвечают переносчики семейства PIN и суперсемейство АТФ-связывающих кассетных переносчиков (ABC) преимущественно В-типа (ABCB) [18]. Ряд авторов отмечают важность ABCB19 для образования AdR [18, 21]. Семейство генов *AUXIN1 / LIKE-AUX1 (AUX / LAX)* кодирует симпортеры притока ауксина. Белки PIN играют важную роль в полярном транспорте ауксина из-за их асимметричной субклеточной локализации. SIPIN3, SIPIN4 и SIPIN7 важны для индукции AdR, тогда как SIPIN2, по-видимому, важен для индукции и возникновения AdR [18]. Кроме транспорта ауксинов, для формирования органов важно высвобождение ауксинов из запасных форм, таких как индол-3-масляная кислота (IBA) или конъюгаты IAA [21].

Перед делением клеток перицикла многие гены, связанные с клеточным циклом, такие как гены циклина и циклин-зависимой киназы, экспрессируются в обработанных ауксином корнях *Arabidopsis*, что позволяет предположить, что ауксин способствует инициации AdR, по аналогии с боковым корнем, путем активации генов, связанных с клеточным циклом [5]. Вслед за изменением уровней IAA и Sc, регулирующих последующее развитие корней, стимулируются гликолиз и пентозофосфатный путь [22].

Следующее звено в механизме регенерации корней у микроклонов картофеля – с большей вероятностью влияние IAA на мобилизацию ассимилятов из верхних частей черенка (участка стебля и листа), что согласуется с данными по укоренению черенков гипокотила *Phaseolus vulgaris* [23]. Авторами установлено, что ускорение укоренения черенков заключалось в увеличении доступности сахара в месте образования корней. Источник ассимилятов – листья *P. vulgaris*, поскольку их удаление уменьшило образование корней в

гипокотиле, в то время как удаление верхушечной почки оказывало менее вредоносное влияние. Проявление эффекта IAA в индуцировании большего количества корней зависело от площади листьев и оказалось лучше, когда присутствовали все листья. ¹⁴C-ассимиляты (сахар) медленно накапливались в основании черенков в течение 4 дней после иссечения, однако экзогенный IAA значительно увеличивал это накопление к 24-часовому периоду одновременно с образованием корней [23].

В настоящее время установлено взаимодействие между путями ответа на действие глюкозы и ауксина в регуляции роста корней [24]. Только глюкоза может на уровне транскрипции регулировать 376 (62%) генов из 604 генов, на которые влияет IAA. Глюкоза может влиять на гены, кодирующие ферменты биосинтеза IAA (YUCCA), белки-переносчики ауксина PIN, рецепторы TIR1 и компоненты сигналинга IAA – AUX / IAA, GH3 и SAUR, что позволяет предполагать влияние глюкозы на рост и развитие корней растений не только как трофического вещества, но и как регулятора, взаимодействующего с передачей сигналов и транспортом ауксинов.

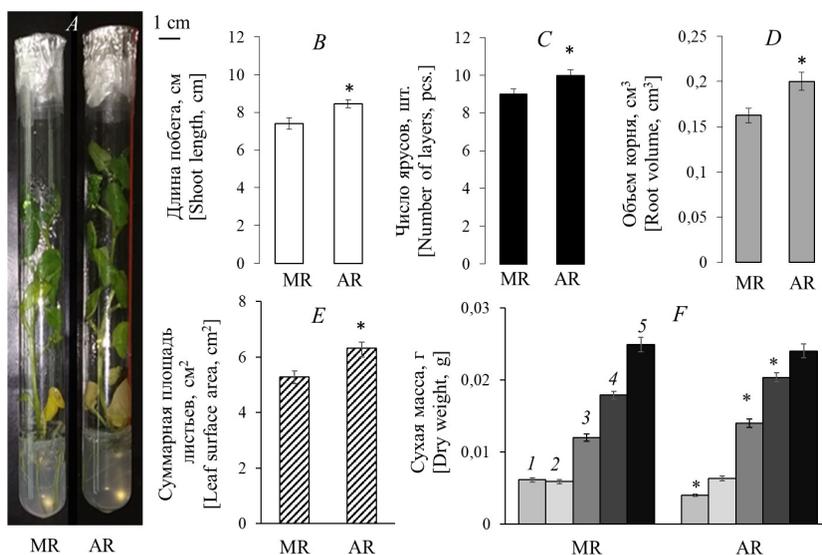


Рис. 2. Внешний вид (A) и морфологические параметры (B–F) 39-дневных средних (MR) и апикальных (AR) регенерантов *Solanum tuberosum* L. *in vitro* (M±1,96 SEM);

1 – корень, 2 – стебель, 3 – листья, 4 – побег, 5 – растение.

* – статистически значимые отличия от варианта MR ($p < 0,05$)

[Fig. 2. Appearance (A) and morphological parameters (B–F) in 39-day-old middle (MR) and apical (AR) regenerants of *Solanum tuberosum* L. *in vitro* (M±1,96 SEM):

1 - Root, 2 - Stem, 3 - Leaf, 4 - Shoot, 5 - Plant. *Statistically significant differences from MR ($p < 0.05$)]

Анализ ростовых параметров у 39-дневных регенерантов картофеля (рис. 2, A), полученных из апикальных (AR) и средних ярусов (MR) мате-

ринских 21-дневных растений картофеля, показал, что AR превосходят MR по размерам. Установлено, что у AR объём корней, длина побега, количество ярусов и суммарная площадь листьев увеличивались соответственно на 25, 14, 11 и 20% по сравнению с MR (рис. 2, В–Е).

Этому предшествовало более активное корнеобразование у AR к 10-м суткам культивирования (см. рис. 1, А, В). Увеличение размеров AR связано с изначально повышенным уровнем эндогенных ауксинов, которые в сочетании с другими гормонами играют важную роль в построении тела растения. Полученные нами данные по IAA-зависимому росту так же согласуются с данными о влиянии других эндогенных ауксинов, таких как NAA и ИВА, которые также участвуют в регуляции деления и роста клеток, развития корней, формирования листьев и апикального доминирования и дифференциации сосудистых тканей [25].

Сравнительный анализ накопления суммарной сухой массы регенерантами выявил, что при одинаковом углеводном питании (3% сахара) и доступности CO₂ регенеранты (растения, рис. 2, F) набирали близкую биомассу. Однако неоднозначно происходило перераспределение сухого вещества между органами в растении. В соответствии с данными, представленными на рис. 2, F, показано, что AR имели меньшую сухую массу корня (на 34%) относительно MR, но большую биомассу побега (на 13,4%) за счёт листовой поверхности. В результате отношение сухой массы побега к корню выше у AR по сравнению с MR.

В культуре регенерантов картофеля *in vitro* имеет место преимущественно гетеротрофный рост, поскольку низкий уровень газообмена между внешней средой и растением обеспечивает лишь 5–6% фотосинтетических потребностей пробирочного растения [26]. Подтверждением этому факту служили и наши данные. Более активный рост AR происходил на фоне низкого содержания всех групп фотосинтетических пигментов и отношения хлорофилл *a*/хлорофилл *b* (рис. 3, E). В процессе фотосинтеза регенерантов в пробирке происходит усвоение CO₂, выделяющегося при гетеротрофном росте, равно как выделяемый кислород может способствовать гетеротрофному росту. По мнению Л.Н. Цоглина с соавт., «гетеротрофный и автотрофный способы питания оказываются в значительной степени замкнутыми друг на друга и мощность фотосинтетического роста не может превышать гетеротрофный».

Изучение физиологического состояния средних листьев показало их различие у регенерантов, полученных из микроклонов разных ярусов материнских растений. У листьев AR уменьшилась на 22% интенсивность перекисного окисления липидов (содержание MDA) относительно MR, что свидетельствовало о формировании у MR большего окислительного статуса (рис. 3, A). Причиной увеличения окислительного статуса листьев могла служить интенсивность процессов, производящих активные формы кислорода (ROS). Поскольку известно, что источниками ROS служат процессы фотосинтеза и дыхания [27], то следует ожидать увеличения интенсивности этих процессов у MR.

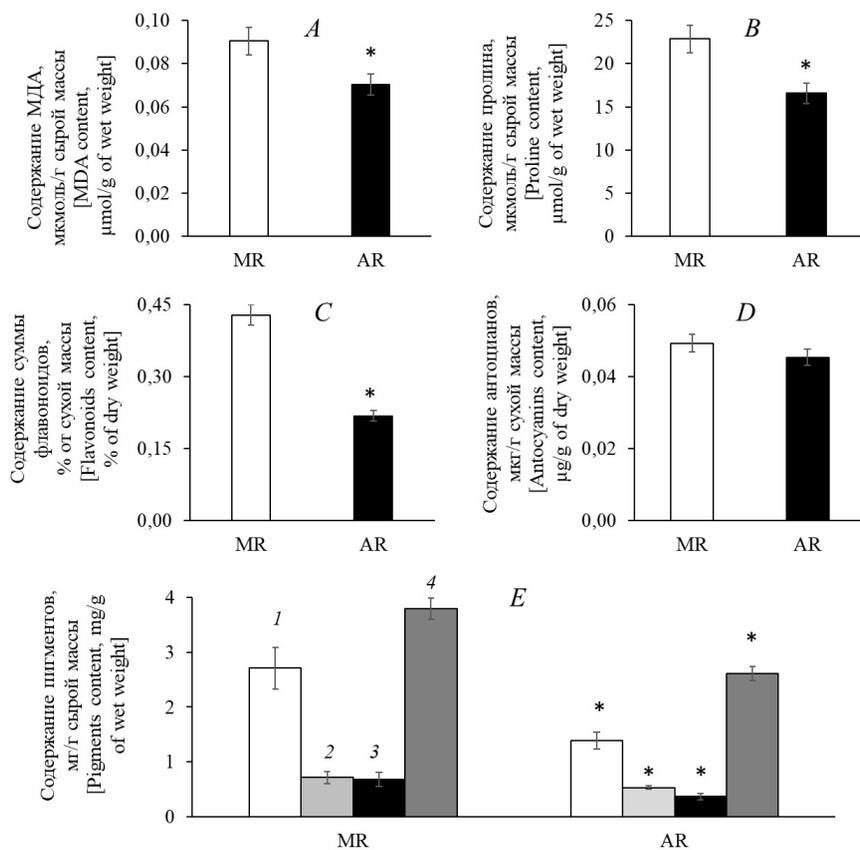


Рис. 3. Содержание метаболитов в средних (MR) и апикальных (AR) 39-дневных регенерантах *Solanum tuberosum* L. *in vitro* ($M \pm 1,96$ SEM): малоново-го диальдегида (A), свободного пролина (B), суммы флавоноидов (C), антоцианов (D) и фотосинтетических пигментов (E): 1 – хлорофилл a, 2 – хлорофилл b, 3 – каротиноиды, 4 – хлорофилл a / хлорофилл b. * – статистически значимые отличия от варианта MR ($p < 0,05$)

[Fig. 3. The content of metabolites in middle (MR) and apical (AR) 39-day-old regenerants of *Solanum tuberosum* L. *in vitro* ($M \pm 1,96$ SEM): A - Malondialdehyde; B - Free proline; C - Flavonoids; D - Anthocyanins; E - Photosynthetic pigments; 1 - Chlorophyll a; 2 - Chlorophyll b; 3 - Carotenoids; 4 - Chlorophyll a / Chlorophyll b.

*Statistically significant differences from MR ($p < 0.05$)]

О лучшем формировании фотосинтетического аппарата у MR свидетельствовало не только большее количество фотосинтетических пигментов (хлорофилл a, хлорофилл b, каротиноиды) и отношение хлорофилла a к хлорофиллу b (см. рис. 3, E), но и повышенное производство ROS (см. рис. 3, A). ROS обладают высокой окислительной способностью и в случае чрезмерного образования повреждают компоненты клетки, в том числе и липиды. Однако в норме растительная клетка способна контролировать уровень ROS,

которые могут взаимодействовать с эпигенетическими модификаторами и гормонами в регуляции процессов развития растений [28]. Считается, что ROS выступают как важные и необходимые факторы для пролиферации и дифференцировки клеток [28]. В настоящее время развиваются представления о физиологических и молекулярных взаимодействиях ауксинов и ROS [29]. Прежде всего, показана способность ауксинов регулировать уровни ROS, обусловленная повышением экспрессии множества генов, связанных с абиотическим стрессом (*RAB18*, *RD22*, *RD29A*, *RD29B*, *DREB2A* и *DREB2B*), и положительным влиянием на активность антиоксидантных ферментов [8].

Уменьшение интенсивности LPO у активно растущих AR могло свидетельствовать о повышении ауксинами активности неферментативных и ферментативных антиоксидантов. Это предположение согласуется с результатами исследований А. Piotrowska-Niczyporuk и А. Wajguz, в которых показано влияние экзогенных природных ауксинов на метаболизм зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris*, что выражалось в повышении уровней аскорбата, глутатиона, супероксиддисмутазы, аскорбатпероксидазы и каталазы [25].

Анализ содержания свободного пролина у регенерантов картофеля, полученных из микроклонов разных ярусов, показал, что у AR происходило снижение аккумуляции свободного пролина на 28% относительно MR (см. рис. 3, В). Можно предположить, что истощение уровня свободного пролина происходило в процессе удаления ROS или активации ряда ферментов, связанной с выполнением пролином функции шаперона, который взаимодействовал с белками и поддерживал их функциональную конформацию [30]. В то же время более активный рост AR картофеля мог сопровождаться и большим использованием пролина в качестве источника азота, чем MR. На подобное явление указывают и другие авторы, в исследованиях которых уровень пролина снизился в ответ на дефицит азота в *P. vulgaris* из-за стимуляции пролиндегидрогеназы [31]. Известно, что экзогенный пролин действует как источник азота для различных морфогенетических процессов, таких как эмбриогенез и органогенез, различающихся по потребности в азоте (особенно в форме пролина), который также действует как осморегулятор [31].

Среди вторичных метаболитов, играющих важную роль в качестве антиоксидантов, можно назвать флавоноиды (Flav). Сравнительный анализ показал, что по суммарному содержанию Flav MR двукратно превышали AR (см. рис. 3, С). Это могло свидетельствовать о разном возрасте метамеров, взятых для микроклонального размножения, или интенсивности их ростовых процессов. В нашем раннем исследовании установлена возрастная зависимость аккумуляции Flav в листьях *L. sativa* [12]. Содержание Flav выше во взрослых и стареющих листьях по сравнению с молодыми листьями. Эти данные свидетельствовали об усилении вторичного метаболизма с завершением активного роста листа. Показано также, что по мере старения растений регенерационная способность корней постепенно снижается. У молодых растений факторы транскрипции AP2 / ERF (*APETALA2* / *ETHYLENE*

RESPONSE FACTOR), включая ABSCISIC ACID REPRESSOR1 и ERF109, быстро индуцируются раной и служат сигналами, вызывающими биосинтез ауксина [1], в то время как у старых растений SPL2, SPL10 и SPL11 напрямую связываются с промоторами *AP2 / ERF* и ослабляют их индукцию, тем самым подавляя накопление ауксина в ране [1].

По уровню антоцианов листья среднего яруса у MR и AR картофеля не отличались, что можно объяснить одинаковой доступностью сахаров из питательной среды (см. рис. 3, D) и одинаковыми условиями освещения. Для сахарозы показана не только субстратная роль в синтезе антоцианов, но и регуляторная, поскольку она активирует ген *PAP1* (*Production of Anthocyanin Pigmentation 1*) через сахарозоспецифический сигнальный путь [31], а также экспрессию кодирующих ферменты синтеза антоцианов генов *DFR* (*Dihydroflavonol-4-Reductase*), *LDOX* (*Leucoanthocyanidin Dioxygenase*) и *UF3GT* (*UDP-Glucose: Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase*).

Полученные данные показывают возможность исходного гормонального статуса микроклонов изменять последовательность и интенсивность процессов их регенерации, включая органогенез, интенсивность роста и метаболизма растений. Использование апикальных микроклонов особенно важно при необходимости повышения коэффициента размножения растений.

Предполагается изучение количественного изменения эндогенного гормонального статуса средних и апикальных микроклонов растений картофеля под действием экзогенной IAA.

Заключение

В процессе исследования установлены специфика регенерации микроклонов, полученных из разных фрагментов побега материнского растения, а также особенности морфогенеза и метаболизма регенерантов *S. tuberosum* L., полученных из этих микроклонов. Клоны, полученные из средней части побега материнского растения, раньше восстанавливали утраченный побег за счет пробуждения почки. Клоны, полученные из апикальной части исходного растения, активнее формировали корневую систему, что в последующем отразилось на формировании регенерантов с большими ростовыми параметрами относительно клонов из средних ярусов. Повышенный уровень эндогенной IAA в апикальной части побега активировал ризогенез клонов на начальном этапе их регенерации, а также влиял на снижение интенсивности LPO, уменьшение содержания свободного пролина и флавоноидов на поздних этапах развития регенерантов. Обсуждаются механизмы, лежащие в основе различной скорости регенерации микрочеренков, взятых с разных ярусов побега *S. tuberosum*.

Литература

1. Ye B.-B., Shang G.-D., Pan Y., Xu Z.-G., Zhou C.-M., Mao Y.-B., Bao N., Sun L., Xu T., Wang J.-W. AP2/ERF transcription factors integrate age and wound signals for root regeneration // *The Plant Cell*. 2020. Vol. 32. PP. 226–241. doi: [10.1105/tpc.19.00378](https://doi.org/10.1105/tpc.19.00378)
2. Xu L. *De novo* root regeneration from leaf explants: wounding, auxin, and cell fate transition // *Current Opinion in Plant Biology*. 2018. Vol. 41. PP. 39–45. doi: [10.1016/j.pbi.2017.08.004](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.08.004)
3. Finet C., Jaillais Y. Auxology: when auxin meets plant evo-devo // *Developmental biology*. 2012. Vol. 369, № 1. PP. 19–31. doi: [10.1016/j.ydbio.2012.05.039](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.05.039)
4. Ljung K., Bhalerao R.P., Sandberg G. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth // *Plant Journal*. 2001. Vol. 28, № 4. PP. 465–474. doi: [10.1046/j.1365-3113x.2001.01173.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.2001.01173.x)
5. Overvoorde P., Fukaki H., Beeckman T. Auxin control of root development // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010. Vol. 2(6): a001537. doi: [10.1101/cshperspect.a001537](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001537)
6. Swarup K., Benkova E., Swarup R., Casimiro I., Peret B., Yang Y., Parry G., Nielsen E., De Smet I., Vanneste S., Levesque M.P., Carrier D., James N., Calvo V., Ljung K., Kramer E., Roberts R., Graham N., Marillonnet S., Patel K., Jones J.D. et al. Bennett the auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence // *Nature Cell Biology*. 2008. Vol. 10. PP. 946–954. doi: [10.1038/ncb1754](https://doi.org/10.1038/ncb1754)
7. Bowman J.L., Floyd S.K. Patterning and polarity in seed plant shoots // *Annual Review of Plant Science*. 2008. Vol. 59. PP. 67–88. doi: [10.1146/annurev.arplant.57.032905.105356](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105356)
8. Bielach A., Hartyan M., Tognetti V.B. Plants under stress: involvement of auxin and cytokinin // *International Journal of Molecular Sciences*. 2017. Vol. 18, № 7. PP. 1427. doi: [10.3390/ijms18071427](https://doi.org/10.3390/ijms18071427)
9. Ощепков М.С., Калистратова А.В., Савельева Е.М., Романов Г.А., Быстрова Н.А., Кочетков К.А. Природные и синтетические цитокинины и их применение в биотехнологии, агрохимии и медицине // *Успехи химии*. 2020. Т. 89, № 8. С. 787–810. doi: [10.1070/RCR4921](https://doi.org/10.1070/RCR4921)
10. Ломин С.Н., Кривошеев Д.М., Стеклов М.Ю., Осолодкин Д.И., Романов Г.А. Свойства рецепторов и особенности сигналинга цитокининов // *Acta Naturae*. 2012. Т. 4, № 3 (14) С. 34–48. doi: [10.32607/20758251-2012-4-3-31-45](https://doi.org/10.32607/20758251-2012-4-3-31-45)
11. Higuchi M., Pischke M.S., Mahonen A.P., Miyawaki K., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., Helariutta Y., Sussman M.R., Kakimoto T. In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004. Vol. 101, № 23. PP. 8821–8826. doi: [10.1073/pnas.0402887101](https://doi.org/10.1073/pnas.0402887101)
12. Головацкая И.Ф., Бойко Е.В., Видершпан А.Н., Лаптев Н.И. Возрастные морфофизиологические и биохимические изменения у растений *Lactuca sativa* L. под влиянием селена и света разной интенсивности // *Сельскохозяйственная биология*. 2018. Т. 53, № 5. С. 1025–1036. doi: [10.15389/agrobiology.2018.5.1025rus](https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.5.1025rus)
13. Головацкая И.Ф., Кадырбаев М.К., Сатканов М.Ж., Плюснин И.Н. Специфика действия 24-эпибрассинолида на морфофизиологические реакции регенерантов картофеля с разным уровнем ИУК *in vitro* // *Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования: сборник научных трудов по материалам XIII Международного симпозиума*. М.: РУДН, 2019. С. 59–61. doi: [10.22363/09509-2019-59-61](https://doi.org/10.22363/09509-2019-59-61)
14. Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation // *Methods in Enzymology*. 1978. Vol. 52. PP. 302–310. doi: [10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6)
15. Bates L.S., Waldran R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies // *Plant and Soil*. 1973. Vol. 39. PP. 205–212. doi: [10.1007/BF00018060](https://doi.org/10.1007/BF00018060)

16. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // *Methods in Enzymology*. 1987. Vol. 148. PP. 350–382. doi: [10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
17. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. 11-е изд. / отв. ред. М.Д. Машковский. М.: Медицина, 1989. 400 с.
18. Guan L., Tayengwa R., Cheng Z. (Max), Peer W.A., Murphy A.S., Zhao M. Auxin regulates adventitious root formation in tomato cuttings // *BMC Plant Biology*. 2019. Vol. 19(1). PP. 435. doi: [10.1186/s12870-019-2002-9](https://doi.org/10.1186/s12870-019-2002-9)
19. Lakehal A., Bellini C. Control of adventitious root formation: Insights into synergistic and antagonistic hormonal interactions // *Physiologia Plantarum*. 2019. Vol. 165. PP. 90–100. doi: [10.1111/ppl.12823](https://doi.org/10.1111/ppl.12823)
20. Головацкая И.Ф., Бойко Е.В., Карначук Р.А. Роль мелатонина в регуляции ИУК-зависимых реакций растений в разных условиях освещения // *Вестник Томского государственного университета. Биология*. 2017. № 37. С. 144–160. doi: [10.17223/19988591/37/8](https://doi.org/10.17223/19988591/37/8)
21. Verstraeten I., Schotte S., Geelen D. Hypocotyl adventitious root organogenesis differs from lateral root development // *Frontiers in Plant Science*. 2014. Vol. 5. P. 495. doi: [10.3389/fpls.2014.00495](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00495)
22. Ahkami A.H., Melzer M., Ghaffari M.R., Pollmann S., Javid M.G., Shahinnia F., Hajirezaei M.R., Druge U. Distribution of indole-3-acetic acid in *Petunia hybrid* shoot tip cuttings and relationship between auxin transport, carbohydrate metabolism and adventitious root formation // *Planta*. 2013. Vol. 238. PP. 499–517. doi: [10.1007/s00425-013-1907-z](https://doi.org/10.1007/s00425-013-1907-z)
23. Altman A., Wareing P.F. The effect of IAA on sugar accumulation and basipetal transport of ¹⁴C-labelled assimilates in relation to root formation in *Phaseolus vulgaris* cuttings // *Physiologia Plantarum*. 1975. Vol. 33. PP. 32–38. doi: [10.1111/j.1399-3054.1975.tb03760.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1975.tb03760.x)
24. Mishra B.S., Singh M., Aggrawal P., Laxm A. Glucose and auxin signaling interaction in controlling *Arabidopsis thaliana* seedlings root growth and development // *PLoS ONE*. 2009. Vol. 4, Iss. 2. e4502. doi: [10.1371/journal.pone.0004502](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004502)
25. Piotrowska-Niczyporuk A., Bajguz A. The effect of natural and synthetic auxins on the growth, metabolite content and antioxidant response of green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) // *Plant Growth Regulation*. 2014. Vol. 73, № 1. PP. 57–66. doi: [10.1007/s10725-013-9867-7](https://doi.org/10.1007/s10725-013-9867-7)
26. Цоглин Л.Н., Мелик-Саркисов О.С., Андреев Т.И., Розанов В.В. Газообмен и фотосинтез растений картофеля в условиях *in vitro* // *Доклады Академии наук*. 1991. Т. 316, № 1. С. 1020–1024.
27. Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010. Vol. 48, № 12. PP. 909–930. doi: [10.1016/j.plaphy.2010.08.016](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016)
28. Huang H., Ullah F., Zhou D.-X., Yi M., Zhao Yu. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses // *Frontiers in Plant Science*. 2019. Vol. 10. PP. 800. doi: [10.3389/fpls.2019.00800](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00800)
29. Pasternak T., Potters G., Caubergs R., Jansen M.A.K. Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level // *Journal of Experimental Botany*. 2005. Vol. 56, № 418. PP. 1991–2001. doi: [10.1093/jxb/eri196](https://doi.org/10.1093/jxb/eri196)
30. Hayat S., Hayat Q., Alyemeni M.N., Wani A.S., Pichtel J., Ahmad A. Role of proline under changing environments: a review // *Plant Signaling and Behavior*. 2012. Vol. 7, № 11. PP. 1456–1466. doi: [10.4161/psb.21949](https://doi.org/10.4161/psb.21949)
31. Sánchez E., Garcia P.C., López-Lefebvre L.R., Rivero R.M., Ruiz J.M., Romero L. Proline metabolism in response to nitrogen deficiency in French Bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv Strike) // *Plant Growth Regulation*. 2002. Vol. 36. PP. 261–265. doi: [10.1023/A:1016583430792](https://doi.org/10.1023/A:1016583430792)

Поступила в редакцию 13.03.2021 г.; повторно 07.07.2021 г.;
принята 27.07.2021 г.; опубликована 29.09.2021 г.

Авторский коллектив:

Кадырбаев Максат Кадырбаевич, аспирант кафедры физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики Биологического института, Национальный исследовательский Томский государственный университет (Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36).

E-mail: Kadyrbaev.maks@mail.ru

Головацкая Ирина Феохтистовна, д-р биол. наук, профессор кафедры физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики, Биологический институт, Национальный исследовательский Томский государственный университет (Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-1919-1893>

E-mail: golovatskaya.irina@mail.ru

Сатканов Мереке Жайдарбекович, бакалавр кафедры биотехнологии и микробиологии Евразийского национального университета им. Л.Н. Гумилева (Казахстан, 010008, г. Нур-Султан, ул. Кажымукана, 13, корпус № 3).

E-mail: 19mereke99@mail.ru

For citation: Kadyrbaev MK, Golovatskaya IF, Satkanov MZh. Features of regenerants morphogenesis and metabolism *in vitro*, obtained from different fragments of potato shoots. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2021;55:114–134. doi: 10.17223/19988591/55/7 In Russian, English Summary

Максат К. Кадырбаев¹, Ирина Ф. Головацкая¹, Мереке Ж. Сатканов²

¹*Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation*

²*L.N. Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan, Kazakhstan*

**Features of regenerants morphogenesis and metabolism *in vitro*,
obtained from different fragments of potato shoots**

Micropropagation is one of the fastest ways of plant propagation. This method allows obtaining a large number of clones that retain all characteristics of the species and varieties of plants. Among the important problems of micropropagation of potato plants, two can be distinguished: the rate of microclones regeneration (rooting of microclones and the development of regenerants) *in vitro* and the value of the propagation factor (number of layers). The plant hormones auxins and cytokinins, whose content changes along the longitudinal axis of the plant, play a key role in the regeneration of cuttings. The aim of this research was to study the specificity of micropropagation, morphogenesis and metabolism of *Solanum tuberosum* L. regenerants *in vitro*, depending on the initial explants position in the plant.

The objects of the study were plants of *S. tuberosum* L. of the mid-season cultivar Lugovskoy. During the experiment, cuttings (explants) taken from layers 3 and 5 of the shoot consisted of internodes, buds and leaves. We chose apical cuttings containing a greater amount of endogenous auxins due to the spatial separation of the site of synthesis and the main action of these hormones in the plant as experienced clones. Cuttings from the middle of the shoot were those of control. We cultured cuttings on hormone-free solid agar 50% nutrient medium Murashige-Skoog (MS) supplemented with 3% sucrose and vitamins. The flux density of incident photons of the PAR was 200–230 $\mu\text{mol} / (\text{m}^2 \cdot \text{s})$, with a 16-hour photoperiod and an air temperature of 20–22°C. Luminescent white lamps TL-D 58W / 54–765 G13 (Philips, Poland) were used as a light source. The relative light intensity was measured using an AvaSpec-102/256/1024/2048 spectrometer version 6.2 (Avantes BV, Netherlands). During 3 weeks of culturing microclones in test tubes, we described the phenology of their regeneration. We assessed the formation of adventive roots (AdR) by the dynamics of changes in the number and length of AdR primordia. The formation of regenerants was assessed by the dynamics of changes in the number of layers and the length of shoots. At the end of cultivation on the 39th

day, we removed the regenerants from the test tubes and determined their growth and biochemical parameters. We used the gravimetric method to determine the wet and dry biomass of the regenerants. We measured the leaf surface area using the Moticam 2300 software (Spain) on photographs taken with a digital camera. The intensity of lipid peroxidation (LPO) and the content of free proline were measured in the leaves of the middle layers fixed with liquid nitrogen. The content of photosynthetic pigments was determined in the alcoholic extract. In the air dry material, the total content of flavonoids and anthocyanins was determined. We carried out the measurements using a Genesys 10S UV-Vis spectrophotometer (Thermo Electron, Germany). The significance of the differences between the samples was assessed using Student's *t*-test ($p < 0.05$). Figures show data as the mean of the repetitions and their confidence interval ($M \pm 1.96SEM$). All experiments were performed in 20-40 (growth parameters) and five (physiological parameters) biological and three analytical replicates.

We noted the emergence of roots in potato cuttings on the 4th-5th day. More active root formation and their elongation occurred after seven days of cultivation in apical clones, compared with clones obtained from the middle layer. By the 10th day of cultivation, the apical clones had formed seven roots, while the middle ones had four roots, their total length was 9.04 ± 0.36 and 6.56 ± 0.26 cm, respectively (See Fig. 1, A-B). In the cuttings of the middle layer, bud opening and growth of the first shoot internode started earlier than in the apical microclone (See Fig. 1, C-D). The manifestation of donor-acceptor bonds between organs during the formation of regenerants should be noted. The predominant growth of the root system in the apical microclone caused inhibition of the growth and development of the shoot. In the middle microclone, the opposite pattern took place: shoot growth prevailed when the root growth was inhibited. We studied the growth parameters of 39-day-old potato regenerants obtained from apical (AR) and medium (MR) shoot cuttings of potato mother plants (See Fig. 2, A). In AR, root volume, shoot length, number of layers, and the total leaf area increased by 25, 14, 11 and 20% ($p < 0.05$), respectively compared to MR (See Fig. 2, B-E). The regenerants had the same total dry biomass (See Fig. 2, F). However, the redistribution of dry matter between the organs in the plant was ambiguous. We showed that ARs had a 34% ($p < 0.05$) lower dry root mass relative to MR, but a 13.4% higher shoot biomass due to the leaf surface. As a result, the shoot-to-root dry mass ratio was higher in AR compared to MR. *In vitro* potato regenerants showed predominantly heterotrophic growth since more active AR growth occurred against the background of a low content of all groups of photosynthetic pigments and the chlorophyll *a* / chlorophyll *b* ratio (See Fig. 3, E). We studied the physiological state of the regenerants by the biochemical parameters of the middle leaves. In AR leaves, the intensity of LPO relative to MR decreased by 22% ($p < 0.05$), which indicated the formation of a higher oxidative status in MR. AR has a reduced content of free proline by 28% ($p < 0.05$) compared to MR (See Fig. 3, A-B). The total flavonoids content in MR was twice that in AR (See Fig. 3, C). This could indicate a decrease in the intensity of their growth processes. The level of anthocyanins in the MR and AR did not differ.

The data obtained show the ability of the initial hormonal status of microclones to change the sequence and intensity of their regeneration processes, including organogenesis, growth rate and plant metabolism. The use of apical micro-clones is especially important when it is necessary to increase the reproductive rate of plants. The mechanisms underlying the different rates of regeneration of microscopic cuttings taken from different layers of the *S. tuberosum* shoot are discussed.

The paper contains 3 Figures and 31 References.

Key words: *Solanum tuberosum*; regeneration; lipid peroxidation; antioxidants; photosynthetic pigments

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. Ye B-B, Shang G-D, Pan Y, Xu Z-G, Zhou C-M, Mao Y-B, Bao N, Sun L, Xu T, Wang J-W. AP2/ERF transcription factors integrate age and wound signals for root regeneration. *The Plant Cell*. 2020;32:226-241. doi: [10.1105/tpc.19.00378](https://doi.org/10.1105/tpc.19.00378)
2. Xu L. *De novo* root regeneration from leaf explants: wounding, auxin, and cell fate transition. *Current Opinion in Plant Biology*. 2018;41:39-45. doi: [10.1016/j.pbi.2017.08.004](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.08.004)
3. Finet C, Jaillais Y. Auxology: when auxin meets plant evo-devo. *Developmental Biology*. 2012;369(1):19-31. doi: [10.1016/j.ydbio.2012.05.039](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.05.039)
4. Ljung K, Bhalerao RP, Sandberg G. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. *Plant Journal*. 2001;28(4):465-474. doi: [10.1046/j.1365-313x.2001.01173.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01173.x)
5. Overvoorde P, Fukaki H, Beeckman T. Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010;2(6):a001537. doi: [10.1101/cshperspect.a001537](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001537)
6. Swarup K, Benkova E, Swarup R, Casimiro I, Peret B, Yang Y, Parry G, Nielsen E, De Smet I, Vanneste S, Levesque MP, Carrier D, James N, Calvo V, Ljung K, Kramer E, Roberts R, Graham N, Marillonnet S, Patel K, Jones JD et al. Bennett the auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology*. 2008;10:946-954. doi: [10.1038/ncb1754](https://doi.org/10.1038/ncb1754)
7. Bowman JL, Floyd SK. Patterning and polarity in seed plant shoots. *Annual Review of Plant Science*. 2008;59:67-88. doi: [10.1146/annurev.arplant.57.032905.105356](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105356)
8. Bielach A, Hrtyan M, Tognetti VB. Plants under stress: involvement of auxin and cytokinin. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(7):1427. doi: [10.3390/ijms18071427](https://doi.org/10.3390/ijms18071427)
9. Oshchepkov MS, Kalistratova AV, Savel'yeva YeM, Romanov GA, Bystrova NA, Kochetkov KA. Natural and synthetic cytokinins and their applications in biotechnology, agrochemistry and medicine. *Uspekhi Khimii = Russian Chemical Reviews*. 2020;89(8):787-810. doi: [10.1070/RCR4921](https://doi.org/10.1070/RCR4921) In Russian, English Summary
10. Lomin SN, Krivosheyev DM, Steklov MYu, Osolodkin DI, Romanov GA. Receptor properties and features of cytokinin signaling. *Acta Naturae*. 2012;4(3):34-48. doi: [10.32607/20758251-2012-4-3-31-45](https://doi.org/10.32607/20758251-2012-4-3-31-45) In Russian, English Summary.
11. Higuchi M, Pischke MS, Mahonen AP, Miyawaki K, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Shinozaki K, Kato T, Tabata S, Helariutta Y, Sussman MR, Kakimoto T. *In planta* functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(23):8821-8826. doi: [10.1073/pnas.0402887101](https://doi.org/10.1073/pnas.0402887101)
12. Golovatskaya IF, Boyko EV, Vidershan AN, Laptev NI. Age-dependent morphophysiological changes and biochemical composition of *Lactuca sativa* L. plants influenced by Se and solar radiation of varying intensity. *Agricultural Biology*. 2018;53(5):1025-1036. doi: [10.15389/agrobiology.2018.5.1025eng](https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.5.1025eng)
13. Golovatskaya IF, Kadyrbayev MK, Satkanov MZh, Plyusnin IN. Specifics of action of 24-epibrassinolide on the morphophysiological reactions of potato regenerants with different IAA levels *in vitro*. In: *Novyye i netraditsionnyye rasteniya i perspektivy ikh ispol'zovaniya: sbornik nauchnykh trudov po materialam XIII Mezhdunarodnogo simpoziuma* [New and unconventional plants and prospects for their use. Proceedings of the XIII International Symposium]. Author's edition. Moscow: RUDN Publ.; 2019. pp. 59-61. doi: [10.22363/09509-2019-59-61](https://doi.org/10.22363/09509-2019-59-61) In Russian
14. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. 1978;52:302-310. doi: [10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6)
15. Bates LS, Waldran RP, Teare ID. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*. 1973;39:205-212. doi: [10.1007/BF00018060](https://doi.org/10.1007/BF00018060)
16. Lichtenthaler HK. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*. 1987;148:350-382. doi: [10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)

17. Gosudarstvennaya farmakopeya SSSR: Vyp. 2. Obshchiye metody analiza. Lekarstvennoye rastitel'noye syr'ye [State Pharmacopoeia of the USSR: Vol. 2. General methods of analysis. Medicinal plant raw materials]. XI iss. Mashkovskiy MD, editor. Moscow: Meditsina Publ.; 1989. 400 p. In Russian
18. Guan L, Tayengwa R, Cheng Z (Max), Peer WA, Murphy AS, Zhao M. Auxin regulates adventitious root formation in tomato cuttings. *BMC Plant Biology*. 2019;19(1):435. doi: [10.1186/s12870-019-2002-9](https://doi.org/10.1186/s12870-019-2002-9)
19. Lakehal A, Bellini C. Control of adventitious root formation: Insights into synergistic and antagonistic hormonal interactions. *Physiologia Plantarum*. 2019;165:90-100. doi: [10.1111/ppl.12823](https://doi.org/10.1111/ppl.12823)
20. Golovatskaya IF, Boyko EV, Karnachuk RA. Role of melatonin in the regulation of IAA-dependent plant reactions under different lighting conditions. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2017;37:144-160. doi: [10.17223/19988591/37/8](https://doi.org/10.17223/19988591/37/8) In Russian, English Summary.
21. Verstraeten I, Schotte S, Geelen D. Hypocotyl adventitious root organogenesis differs from lateral root development. *Frontiers in Plant Science*. 2014;5:495. doi: [10.3389/fpls.2014.00495](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00495)
22. Ahkami AH, Melzer M, Ghaffari MR, Pollmann S, Javid MG, Shahinnia F, Hajirezaei MR, Druge U. Distribution of indole-3-acetic acid in *Petunia hybrid* shoot tip cuttings and relationship between auxin transport, carbohydrate metabolism and adventitious root formation. *Planta*. 2013;238:499-517. doi: [10.1007/s00425-013-1907-z](https://doi.org/10.1007/s00425-013-1907-z)
23. Altman A, Wareing PF. The effect of IAA on sugar accumulation and basipetal transport of ¹⁴C-labelled assimilates in relation to root formation in *Phaseolus vulgaris* cuttings. *Physiologia Plantarum*. 1975;33:32-38. doi: [10.1111/j.1399-3054.1975.tb03760.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1975.tb03760.x)
24. Mishra BS, Singh M, Aggrawal P, Laxm A. Glucose and auxin signaling interaction in controlling *Arabidopsis thaliana* seedlings root growth and development. *PLoS ONE*. 2009;4(2):e4502. doi: [10.1371/journal.pone.0004502](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004502)
25. Piotrowska-Niczyporuk A, Bajguz A. The effect of natural and synthetic auxins on the growth, metabolite content and antioxidant response of green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). *Plant Growth Regulation*. 2014;73(1):57-66. doi: [10.1007/s10725-013-9867-7](https://doi.org/10.1007/s10725-013-9867-7)
26. Tsoqlin LN, Melik-Sarkisov OS, Andreyenko TI, Rozanov VV. Gazoobmen i fotosintez rasteniy kartofelya v usloviyakh *in vitro* [Gas exchange and photosynthesis of potato plants *in vitro*. *Doklady Akademii Nauk*. 1991;316(1):1020-1024. In Russian
27. Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010;48(12):909-930. doi: [10.1016/j.plaphy.2010.08.016](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016)
28. Huang H, Ullah F, Zhou D-X, Yi M, Zhao Yu. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science*. 2019;10:800. doi: [10.3389/fpls.2019.00800](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00800)
29. Pasternak T, Potters G, Caubergs R, Jansen MAK. Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *Journal of Experimental Botany*. 2005;56(418):1991-2001. doi: [10.1093/jxb/eri196](https://doi.org/10.1093/jxb/eri196)
30. Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, Wani AS, Pichtel J, Ahmad A. Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signaling and Behavior*. 2012;7(11):1456-1466. doi: [10.4161/psb.21949](https://doi.org/10.4161/psb.21949)
31. Sánchez E, Garcia PC, López-Lefebvre LR, Rivero RM, Ruiz JM, Romero L. Proline metabolism in response to nitrogen deficiency in French Bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv Strike). *Plant Growth Regulation*. 2002;36:261-265. doi: [10.1023/A:1016583430792](https://doi.org/10.1023/A:1016583430792)

Author info:

Kadyrbaev Maksat K. Post-graduate Student, Department of Plant Physiology, Biotechnology and Bioinformatics, Institute of Biology, Tomsk State University, 36 Lenin Ave., Tomsk 634050, Russian Federation.

E-mail: Kadyrbaev.maks@mail.ru

Golovatskaya Irina F. Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Plant Physiology, Biotechnology and Bioinformatics, Institute of Biology, Tomsk State University, 36 Lenin Ave., Tomsk 634050, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-1919-1893>

E-mail: golovatskaya.irina@mail.ru

Satkanov Mereke Z. Bachelor, Department of Biotechnology and Microbiology, L.N. Gumilyov Eurasian National University, 13/3 Kazhymukan Str., Nur-Sultan 3010008, Republic of Kazakhstan.

E-mail: 19mereke99@mail.ru