

## ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛОВ В ЛИСТЬЯХ ВИНОГРАДА СОРТА ПОБЕДА В ПРОЦЕССЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO*

Х. И. БОБОДЖАНОВА, Ш. К. ЯСАУЛОВА

Центр биотехнологии Таджикского национального университета,  
г. Душанбе, Республика Таджикистан, 734025, e-mail: bobojankh\_7@bk.ru

Н. А. МАНИЯЗОВА

Институт ботаники, физиологии и генетики растений Национальной академии наук Таджикистана,  
г. Душанбе, Республика Таджикистан, 734063, e-mail: maniyazova58@mail.ru

Н. В. КУХАРЧИК

РУП «Институт плодоводства»,  
аг. Самохваловичи, Республика Беларусь, 223013, e-mail: nkykhartchik@gmail.com

(Поступила в редакцию 05.06.2023)

В данной статье представлены результаты исследований по оценке содержания пигментов в листьях винограда сорта Победа. Изучено содержание хлорофиллов  $a$ ,  $b$  и каротиноидов в листьях винограда сорта Победа на разных этапах культивирования – *in vitro*, *in vivo*, *ex vitro*. Показано, что содержание хлорофилла  $a$  не отличается на этапах введения в культуру и микроразмножения *in vitro*. В то время как содержание хлорофилла  $b$  значительно ниже на этапе микроразмножения по сравнению с введением *in vitro*. Соответственно отличается и соотношение  $Chl\ a/Chl\ b$ , которое значительно выше на этапе микроразмножения по сравнению с введением *in vitro*. В период адаптации *ex vitro* в листьях растений винограда сорта Победа наблюдается снижение содержания хлорофилла  $a$ , хлорофилла  $b$  и суммы хлорофиллов  $a+b$ , а также каротиноидов по сравнению с этапом ризогенеза. Установлено, что в сравнении с начальным этапом развития, на этапе адаптации *ex vitro* содержание зеленых пигментов заметно увеличивается. Это происходит как за счет хлорофилла  $a$ , так и хлорофилла  $b$ . Анализ отношения  $Chl(a+b)/каротиноиды$ , характеризующий работу фотосинтетического аппарата, показал, что на этапе адаптации *ex vitro* это соотношение имело высокое значение – 7,1, а минимальное на этапе микроразмножения *in vitro* – 3,8. В период ризогенеза *in vitro* и адаптации *in vivo* отношение  $Chl(a+b)/каротиноиды$  имело одинаковое значение.

Результаты показали, что содержание хлорофиллов  $a$  и  $b$  в листьях растений винограда сорта Победа минимальное на этапе микроразмножения, а наибольшее значение содержания зеленых пигментов – на этапе ризогенеза. При адаптации *ex vitro* содержание хлорофиллов заметно увеличивается, по сравнению с начальными этапами развития.

**Ключевые слова:** виноград, *in vitro*, *ex vitro*, *in vivo*, хлорофилл  $a$ , хлорофилл  $b$ , каротиноиды.

This article presents the results of studies on the evaluation of the content of pigments in the leaves of the Pobeda grape variety. The content of chlorophylls  $a$ ,  $b$  and carotenoids in the leaves of the Pobeda grape variety was studied at different stages of cultivation – *in vitro*, *in vivo*, *ex vitro*. It has been shown that the content of chlorophyll  $a$  does not differ at the stages of introduction into culture and micropropagation *in vitro*. While the content of chlorophyll  $b$  is significantly lower at the stage of micropropagation compared to *in vitro* administration. Correspondingly, the  $Chl\ a/Chl\ b$  ratio also differs, which is significantly higher at the stage of micropropagation compared to *in vitro* administration. During the period of *ex vitro* adaptation in the leaves of Pobeda grape plants, a decrease in the content of chlorophyll  $a$ , chlorophyll  $b$  and the amount of chlorophylls  $a + b$ , as well as carotenoids is observed compared to the stage of rhizogenesis. It has been established that, in comparison with the initial stage of development, at the stage of *ex vitro* adaptation, the content of green pigments increases markedly. This is due to both chlorophyll  $a$  and chlorophyll  $b$ . Analysis of the  $Chl(a+b)/carotenoids$  ratio, which characterizes the operation of the photosynthetic apparatus, showed that at the stage of *ex vitro* adaptation this ratio had a high value of 7.1, and the minimum at the stage of *in vitro* micropropagation was 3.8. During *in vitro* rhizogenesis and *in vivo* adaptation, the  $Chl(a+b)/carotenoids$  ratio had the same value.

The results showed that the content of chlorophylls  $a$  and  $b$  in the leaves of Pobeda grape plants is minimal at the stage of micropropagation, and the highest value of the content of green pigments is at the stage of rhizogenesis. With *ex vitro* adaptation, the content of chlorophylls increases markedly, compared with the initial stages of development.

**Key words:** grapes, *in vitro*, *ex vitro*, *in vivo*, chlorophyll  $a$ , chlorophyll  $b$ , carotenoids.

### Введение

В процессе фотосинтеза хлорофиллу принадлежит ведущая роль. Он может поглощать солнечную энергию, запасать ее или передавать другим молекулам. Наиболее распространенный хлорофилл  $a$  (найден у всех зеленых растений и цианобактерий) имеет голубовато-зеленый цвет. Хлорофилл  $b$  – желтовато-зеленый. В состав хлоропластов входят желтые пигменты – каротиноиды. Хлорофилл использует энергию красной части спектра, каротиноиды – синей. Кроме того, каротиноиды могут защищать молекулы хлорофилла от чрезмерного фотоокисления на ярком свете [1]. Содержание пигментов специфично для листьев каждого вида и сорта растений и существенно изменяется в зависимости от освещенности, минерального питания, возраста листьев и других внешних и внутренних условий [2].

Пигментные системы являются первичными акцепторами световой энергии и участвуют в важнейших стадиях фотосинтеза. Они ответственны за поглощение энергии света в фотофизической стадии,

осуществляют процесс преобразования энергии в фотохимических реакциях и являются важнейшими компонентами электрон-транспортной цепи фотосинтеза [3].

Уровень сбалансированности условий среды, фотосинтетической активности и продуктивности растений в природе таков, что, как правило, растения не полностью используют потенциалы их жизненной физиологической и экологической активности. И в этом есть глубокий биологический смысл: условия среды их обитания изменчивы и непостоянны, и растения, сохраняя резервы потенциалов продуктивности на среднем уровне, могут эффективно использовать их в адаптивных процессах [3].

Пигменты, принимая активное участие в обмене веществ, непосредственно связаны с осуществлением окислительно-восстановительных процессов, имеющих большое значение в жизнедеятельности растения [4]. Поэтому динамика изменения содержания пигментов у различных сортов винограда занимает одно из важнейших мест среди основных физиологических показателей.

На основании наблюдений за окраской растительных органов можно сделать вывод о значительных изменениях содержания пигментов в онтогенезе растений: количество хлорофиллов и каротиноидов постепенно увеличивается до цветения и уменьшается к концу вегетации.

Ф. В. Турчиным и другими исследователями показано, что в живых листьях происходит обновление хлорофилла. Скорость этого процесса может быть различной [5]. В большей мере она зависит от особенностей растения. Значительное влияние на нее оказывают внешние условия и физиологическое состояние растения. В онтогенезе наблюдается постепенное замедление процесса обновления хлорофилла, на который влияют условия освещения, температура и минеральное питание.

Отношение  $Xл\ a/Xл\ b$  связано с активностью «главного» хлорофилла  $a$ . Чем оно больше, тем интенсивнее фотосинтез. В норме этот показатель составляет 2.2–3.0. Отношение  $Xл(a+b)/каротиноиды$  играет не менее важную роль при характеристике работы фотосинтетического аппарата. Это соотношение в норме стабильно и очень реагирует на изменение условий выращивания [6].

С. Ю. Тищенко и Р. А. Карначуком установлено, что условия размножения оказывают влияние на содержание фотосинтетических пигментов. Растения соответствующих сортов, полученные *in vitro*, образовали хлорофиллов  $a$  и  $b$  больше, чем растения, полученные традиционным способом. При переходе от традиционного размножения к микроклональному было обнаружено изменение отношения хлорофиллов  $a/b$ . У традиционно размноженных (ТР) растений, независимо от сорта, оно оказалось очень высоким (6–7), в то время как у растений, полученных микроклональным размножением (МР) отношение составило 2–3. Достоверных различий между сортами в том и другом случае не обнаружено. Высокое отношение хлорофиллов у ТР растений связано с достаточно низким содержанием дополнительного пигмента – хлорофилла  $b$ . Это свидетельствует о повышенном светолюбии растений, полученных традиционным способом. У растений же, полученных *in vitro*, синтез хлорофилла  $b$  был в 2,5–3 раза выше, чем при ТР, что характерно для растений, более теневыносливых [7].

Известно, что в Центральной Азии виноград является одним из широко потребляемых продуктов. Это пластичное растение отличается высокой отзывчивостью на изменение факторов внешней среды [8].

Анализ имеющихся в литературе данных показывает, что у перспективных сортов не исследованы его фотосинтетические параметры, а именно содержание пигментов, поэтому целью настоящей работы было изучение содержания пигментов в листьях винограда сорта Победа, выращенных *in vitro*, *ex vitro* и *in vivo*.

### Основная часть

Исследования проводились в период 2018–2022 гг. в Центре биотехнологии Таджикского национального университета. Объектом исследования служил виноград сорта Победа [9], полученный путем микроклонального размножения в условиях *in vitro* с последующей адаптацией *ex vitro*, а также на нестерильном субстрате почва+торф (П:Т) – в условиях *in vivo*. Материал в виде черенков сорта Победа был привезен из подсобного хозяйства Р. Ю. Каландарова, участок Гульбута.

Работы по микроклональному размножению и адаптации растений винограда проводили по описанным ранее методам [10]. Культивирование растений *in vitro* проводили в биологических пробирках 22x220 в культуральных комнатах при освещении 4 тыс. люкс, температуре  $24 \pm 1$  °С, фотопериоде 16/8 часов, относительной влажности 70–80 %. Депонирование проводили при положительных низких температурах (+3...+5 °С) без освещения в течение 16 месяцев.

Определение содержания фотосинтетических пигментов проводили спектрофотометрическим методом на спектрофотометре «Shimadzu-UV-1800». Пигменты экстрагировали из листьев 96%-ным этиловым спиртом. Содержание пигментов рассчитывали по формулам Винтерманс, Де Мотс [11]. Статистическую обработку данных проводили по В. А. Доспехову с использованием программы Microsoft Excel 2010 [12]. В таблице приведены значения среднеарифметических величин и стандартные ошибки пяти измерений из трех биологических повторностей.

Исследовано содержание пластидных пигментов в листьях растений винограда сорта Победа на разных этапах развития. В таблице приведены данные по содержанию фотосинтетических пигментов в листьях растений винограда сорта Победа на разных этапах выращивания.

**Содержание пигментов в листьях винограда сорта Победа**

Фаза развития	Содержание пигментов (мг/г сыр массы)					
	Хл a	Хл b	Каротиноиды	Хл (a+b)	Хл a/ Хл b	Хл (a+b)/ каротиноиды
До введения в культуру <i>in vitro</i>						
Отрастающие листья на черенках с поля	1.28±0.13	0.58±0.05	*	1.86±0.18	2.2	*
В культуре <i>in vitro</i> при нормальной вегетации						
Микроразмножение <i>in vitro</i>	1.28±0.03	0,21±0,01	0.39±0.01	1,49±0.18	6,0	3,8
В культуре <i>in vitro</i> после депонирования в течении 16 месяцев						
Микроразмножение <i>in vitro</i>	0.90±0.07	0.17±0.02	*	1.07±0.08	5.3	*
Ризогенез <i>in vitro</i>	1.95±0.12	0,68±0,07	0.39±0.02	2,63±0.18	2.9	6,7
Адаптация <i>ex vitro</i>	1.61±0.07	0.59±0.03	0.31±0.01	2.20±0.11	2.7	7,1
Постадаптация	1.32±0.06	0.40±0.02	0.26±0.01	1.72±0.08	3.3	6,6

Примечание: \* – учеты не производились

Анализ данных, приведённых в таблице, показывает, что содержания хлорофилла a на этапе введения в культуру и на этапе микроразмножения *in vitro* не отличаются между собой. В то время как содержание хлорофилла b значительно ниже на этапе микроразмножения по сравнению с этапом введения *in vitro*. Соответственно отличается и соотношение Хл a/Хл b, которое значительно выше на этапе микроразмножения по сравнению с введением *in vitro*.

Отношение Хл a/Хл b связано с активностью «главного» хлорофилла a. Чем оно больше, тем интенсивнее фотосинтез [6].

Как видно из таблицы, в период микроразмножения *in vitro*, после хранения при положительных низких температурах и без освещения, наблюдается самое низкое содержание хлорофилла a, хлорофилла b и суммы хлорофиллов a+b. На этом этапе содержание хлорофилла a уменьшалось на 30 %, чем на этапе введение *in vitro*. Содержание хлорофилла b уменьшилось на 70 % и соответственно сумма хлорофиллов a+b уменьшилась на 42 %. При этом отношение хлорофиллов a и b заметно изменилось за счет увеличения хлорофилла b. По-видимому, хранение при положительных низких температурах без освещения в течение 16 месяцев на этапе микроразмножения сильно повлияло на физиологические процессы растений винограда, которые оказали влияние на синтез хлорофиллов.

На этапе ризогенеза в условиях *in vitro* у исследуемого объекта содержание зеленых пигментов выше, чем при микроразмножении *in vitro*. На данном этапе содержание хлорофилла a увеличивалось на 53 %, по сравнению с начальным этапом, т. е. при введении в культуру *in vitro* черенков. Содержание хлорофилла b увеличилось на 17 % и соответственно суммы хлорофиллов a+b на 42 %.

Анализ данных показывает, что на период адаптации *ex vitro* в листьях растений винограда сорта Победа наблюдается снижение содержания хлорофилла a, хлорофилла b и суммы хлорофиллов a+b, а также каротиноидов по сравнению с этапом ризогенеза. Однако эти показатели были выше, чем на этапах введение и микроразмножение *in vitro*.

При постадаптации через 2 месяца наблюдается снижение содержания хлорофиллов a и b, их суммы и каротиноидов на 18 %, 32 %, 22 % и 16 % соответственно по сравнению с первым этапом адаптации. Данные таблицы отчетливо показывают, что в сравнении с начальным этапом развития, на этапе адаптации *ex vitro* содержание зеленых пигментов заметно увеличивается. Это происходит как за счет хлорофилла a, так и хлорофилла b. Как следует из полученных данных, с переходом от этапа введения в культуру *in vitro* на этап микроразмножения растения винограда несколько ослабевают и, по-видимому, это повлияло на содержание зеленых пигментов.

Уменьшение содержания хлорофиллов и каротиноидов, вероятно, связано с ограничением их биосинтеза, а также деструкцией в данных условиях выращивания. Наблюдаемое снижение содержания фотосинтетических пигментов, возможно, является предельным адаптационным потенциалом, позволяющим сохранять нормальную жизнедеятельность [6]. Анализ отношения Хл(a+b)/каротиноиды, которое используют для характеристики работы фотосинтетического аппарата, показывает, что это соотношение в норме стабильно и очень реагирует на изменение условий выращивания [6].

При этом на этапе адаптации *ex vitro* это соотношение имело высокое значение – 7,1, а минимальное на этапе микроразмножения *in vitro* – 3,8. В период ризогенеза *in vitro* и постадаптации *in vivo* оно имело одинаковое значение.

Таким образом, изучение содержания пластидных пигментов в листьях растений винограда сорта Победа на разных этапах развития показало, что минимальное содержание хлорофиллов a и b

наблюдается на этапе микроразмножения после депонирования в течение 16 месяцев, и достигает высоких показателей на этапе ризогенеза. При адаптации *ex vitro* содержание хлорофиллов заметно увеличивается, по сравнению с начальными этапами развития. Это происходит за счет хлорофиллов *a* и *b*. Однако при адаптации *in vivo* наблюдается снижение содержания хлорофиллов и каротиноидов.

#### **Заключение**

Результаты исследований по оценке содержания пигментов в листьях винограда показали, что после введения в культуру *in vitro* содержание хлорофилла *a* не изменяется, а содержание хлорофилла *b* снижается, что определяет увеличение показателя соотношения  $Xl\ a / Xl\ b$ . Минимальные показатели содержания хлорофиллов *a* и *b* отмечены на этапе микроразмножения регенерантов после длительного депонирования, что, по-видимому, является результатом культивирования без освещения в течение 16 месяцев.

Дальнейшее увеличение содержания хлорофиллов *a* и *b*, оптимальные показатели их соотношения на этапах ризогенеза и адаптации дают основание полагать, что негативное влияние депонирования на содержание зеленых пигментов является краткосрочным и не окажет дальнейшего влияния на качество получаемого саженца винограда.

#### **ЛИТЕРАТУРА:**

1. Пластиды и их пигменты [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://studbooks.net/858406/agropromyshlennost/-plastydy\\_pigmenty\\_fotosintez\\_neobhodimye\\_usloviya\\_delenie\\_kletki](https://studbooks.net/858406/agropromyshlennost/-plastydy_pigmenty_fotosintez_neobhodimye_usloviya_delenie_kletki). – Дата доступа: 10.01.2023.
2. Титова, М. С. Содержание фотосинтетических пигментов в хвое *Picea abies* и *Picea koraiensis* / М. С. Титова. – Вестник Оренбургского государственного университета. – 2010. – № 12. – С. 9–12.
3. Ничипорович, А. А. Фотосинтетическая деятельность растений как основа их продуктивности в биосфере и земледелии / А. А. Ничипорович // Фотосинтез и продукционный процесс / Под ред. А. А. Ничипоровича. М.: Наука, 1988. – С. 5–28.
4. Taiz L., Zeiger E. Plant Physiology, (2006). 764p. ISBN 978-0878938568.
5. Состояние хлорофилла в живых пластидах. источник: Физиология растений – 3-е изд., М: 1988 г. / Лебедев С. И. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://agromage.com/stat\\_id.php?id=1270](https://agromage.com/stat_id.php?id=1270). – Дата доступа: 1.10.2022 г.
6. Титова, М. С. Динамика фотосинтезирующей активности хвои *Picea ajanensis* и *Picea Smithiana* в условиях зеленой зоны г. Уссурийска / М. С. Титова, Н. Г. Розломий // Живые и биокосные системы. – 2015. – № 12. – Режим доступа: [www.jbks.ru/archive/issue-12/article-4/](http://www.jbks.ru/archive/issue-12/article-4/). – Дата доступа: 30.05.2019.
7. Тищенко, С. Ю. Рост и фотосинтетический аппарат сенполии (*Saintpaulia ionantha* H.Wendl), полученной размножением *in vitro* и *in vivo* / С. Ю. Тищенко, Р. А. Карначук. – [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.biometrika.tomsk.ru/senpoli.htm> – Дата доступа: 2.04.2020.
8. Грибкова, А. Изменение содержания пластидных пигментов в листьях растений винограда сорта Бианка, в зависимости от экологических условий. [Электронный ресурс] / А. Грибкова. Режим доступа: [https://ibn.idsi.md/sites/default/files/imag\\_file/45-48\\_17.pdf](https://ibn.idsi.md/sites/default/files/imag_file/45-48_17.pdf) – Дата доступа: 1.10.2022 г.
9. Победа. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://vinograd.info/sorta/arhiv/pobeda.html>. Дата доступа: 30.10.2022 г.
10. Бободжанова, Х. И. Микрочлональное размножение винограда / Х. И. Бободжанова, Н. В. Кухарчик. – Душанбе: Эргаф, 2017. – 36 с.
11. Гавриленко, В. Ф. Большой практикум по физиологии растений / В. Ф. Гавриленко, М. Е. Ладыгина, Л. М. Хандобина. – М.: Высшая школа, 1975. – 392 с.
12. Доспехов, В. А. Методы полевого опыта / В. А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.