

INFLUENCE OF THE CONTENT OF 6-BENZYLAMINOPURIN IN THE NUTRITIONAL ENVIRONMENT ON THE MORPHOGENESIS OF TETRAPLOID VARIETY OF CAR-TOFEL (*SOLANUM TUBERUMUM*.) NEVSKY IN THE CULTURE OF MICROSPOR

Tikhomirova L. I.
Altai State University,
Barnaul, Russia,
L-tichomirova@yandex.ru

Abstracts. At this stage, work was conducted to study the effect of concentration of BAP in the induction medium on the frequency of formation of embryoid from in vitro cultured isolated microspores to develop targeted ways of obtaining embryoids and regeneration of plants in further studies.

Within 24 days of cultivation studied the ratio of microspores at different stages of development depending on the content of BAP in nutrient media. Used 4 media No. 1 MS + BAP 1 μm , No. 2 MS + BAP 2 μm , n 3 MS + BAP 3 μm , no 4 MS + BAP 4 μm .

Established, the use of nutrient media based on MS with 1-4 μm BAP is effective for induction of embryogenesis potatoes in the culture of the microspores. 88,0-95,0% of the microspores were in the living state within 24 hours. The frequency of formation of embryoids in the experiment was 0.5-1.0% of the total number of microspores and 4.7-6.6% of the number of multicellular structures. Initial embryoid cells of tetraploid varieties of potatoes in the period up to 11-12 days could be the monad. In addition to single paradisepayday structures in suspension of microspores potatoes on the 11-12 days was marked by conglomerates of embryoid – polyembryony. In the light microscopes and paradiseparadise structure of tetraploid potato varieties Nevsky acquired a green color. 24 days of cultivation discovered developing embryoid potato in the phase of organogenesis.

Keywords: potatoes, culture of microspores, embryologist, embryoid, dihaploid line.

ВЛИЯНИЕ СОДЕРЖАНИЯ 6-БЕНЗИЛАМИНОПУРИНА В ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ НА МОРФОГЕНЕЗ ТЕТРАПЛОИДНОГО СОРТА КАРТОФЕЛЯ (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) НЕВСКИЙ В КУЛЬТУРЕ МИКРОСПОР

Тихомирова Л. И.
ФГБОУ ВПО «Алтайский государственный университет»,
Барнаул, Россия,
L-tichomirova@yandex.ru

Аннотация. На данном этапе работы провели изучение влияния концентрации 6-бензиламинопурина (БАП) в индукционной питательной среде на частоту образования эмбриоидов из культивируемых *in vitro* изолированных микроспор с целью разработки способа целенаправленного получения эмбриоидов и регенерации растений в дальнейших исследованиях.

В течение 24 суток культивирования изучали соотношение количества микроспор на разных стадиях развития в зависимости от содержания БАП в питательных средах. Использовали 4 варианта сред: № 1 MS + БАП 1 мкМ, № 2 MS + БАП 2 мкМ, № 3 MS + БАП 3 мкМ, № 4 MS + БАП 4 мкМ.

Установили, использование питательных сред на основе MS с 1-4 мкМ БАП является эффективным для индукции эмбриоидогенеза у картофеля в культуре микроспор. 88,0-95,0% микроспор находилось в живом состоянии в течение 24 суток. Частота формирования эмбриоидов в опыте составила 0,5-1,0% от общего количества микроспор и 4,7-6,6 % от количества многоклеточных структур. Инициальными клетками эмбриоидов тетраплоидного сорта картофеля в период до 11-12 суток могли быть монады. Помимо одиночных зародышеподобных структур, в суспензии микроспор картофеля на 11-12 сутки были отмечены конгломераты эмбриоидов – полиэмбриоиды. На свету микроспоры и зародышеподобные структуры тетраплоидного сорта картофеля Невский приобрели зелёное окрашивание. На 24 сутки культивирования обнаружены развивающиеся эмбриоиды картофеля в фазе органогенеза.

Ключевые слова: картофель, культура микроспор, эмбриоидогенез, эмбриоиды, дигаметоидные линии.

Введение

Ежегодно в мире производится более 300 миллионов тонн картофеля [1]. Треть производства картофеля сосредоточена в развивающихся странах, и свыше 1 миллиарда человек потребляют картофель в качестве основного продукта питания. Картофель является важнейшим пищевым источником крахмала, белков, витаминов, антиоксидантов в рационе населения планеты [2]. По содержанию белка картофель уступает только сое. Пататин – главный запасной белок клубней картофеля, один из самых сбалансированных среди известных растительных белков в питании человека [3]. Огромное значение картофеля как культуры на международном уровне, особенно в развивающихся странах, было представлено ООН в 2008 году, который был годом картофеля [4].

Картофель растет в широком диапазоне среды обитания, поднимаясь до 4000 м над уровнем моря [5]. Средняя потенциальная урожайность картофеля заметно меняется в зависимости от местных условий выращивания и колеблется от около 13 т / га в Африке и Азии и до 50 т / га в Западной Европе и США. По валовому производству картофеля Россия занимает второе место после Китая среди самых крупных производителей в мире. Вместе с тем по показателю средней урожайности (14т/га) Россия значительно отстает даже от среднего мирового уровня (17т/га). В условиях современного рынка остро ощущается дефицит высокопродуктивных сортов картофеля с повышенными качественными характеристиками, пригодных к переработке.

Технология получения удвоенных гаплоидов (DH (*double haploid*)-технологии) через культуру пыльников/микроспор *in vitro* – один из способов генетического улучшения сельскохозяйственных растений. Несмотря на то, что в получении гаплоидов у некоторых видов растений достигнуты большие успехи, тем не менее, существует множество факторов, которые могут способствовать улучшению и оптимизации DH-технологий. Необходимо более глубокое фундаментальное понимание процессов индукции эмбриогенеза микроспор и развития гаплоидных растений, которое будет обеспечивать высокую эффективность получения DH-линий [6].

К настоящему времени накоплены многочисленные данные, позволяющие выявить относительно оптимальные условия культивирования пыльников картофеля, для индукции каллусо- и эмбриоидогенеза, а также добиться регенерации полностью сформированных растений. Важную роль в формировании и развитии новообразований *in vitro* и последующей регенерации растений играет компонентный состав питательной среды. Рядом авторов показаны требования разных генотипов картофеля к содержанию и соотношению в среде азотсодержащих солей, различных макро- и микроэлементов, аминокислот, сахаров, витаминных добавок и гормональных факторов, связующих и адсорбирующих агентов [7-13].

Целью настоящей работы являлось определение эффективности индукции эмбриоидогенеза в культуре микроспор у сорта картофеля (*Solanum tuberosum* L.) Невский, в зависимости от содержания БАП (6-бензиламинопурина) в питательных средах.

Экспериментальная часть

Растительный материал Объектом исследования служил отечественный сорт картофеля Невский.

Цветки собирали в поле в фазе бутонизации и для предварительной обработки низкими температурами помещали на 4 суток в холодильник при 4-5⁰ С. Растительный материал стерилизовали 1%-ным раствором сульфохлорантина в течение 10 мин, далее трёхкратно промывали стерильной дистиллированной водой. Для выделения пыльников использовали бутоны длиной 5,0-7,0 мм. Микроспоры из пыльников высвобождали бытовым блендером в жидкой питательной среде в течение 1,5 мин. Выделяли 100 пыльников и разбивали в 100 мл жидкой питательной среды. Суспензию микроспор фильтровали и в объёме 20,0 мл наслаивали на твёрдые агаровые среды во флаконы и пластиковые контейнеры.

Состав питательных сред

Жидкую питательную среду готовили на основе прописи Мурасиге-Скуга (MS), добавляли 500 мг/л L-глутмина, 1 мкМ кинетина, 1 мкМ 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота). Твёрдые среды готовили также на основе MS с 1-4 мкМ БАП (6-бензиламинопурина).

Осмотическое давление в среде – критический фактор для развития эмбриоида *in vitro*. Сахарозу используют в культуре растительных клеток *in vitro* как источник углеводов и регулятор осмотического давления. Обычно высокое осмотическое давление требуется для эмбриоида на ранних стадиях развития (48 ч), а на поздних стадиях оно должно быть более низким. Сахароза в высоких концентрациях может действовать как осмотический стрессор, с другой стороны, она необходима для формирования эмбриоидов. В нашем эксперименте жидкие среды содержали 9% сахарозы. В агаровые среды её добавляли в количестве 3%.

Культивировали в термостате при температуре 26-27⁰ С, в темноте.

Методы исследования

1. В работе использован метод культуры изолированных микроспор, основанный на применении биологического феномена андроклинии, или андрогенеза *in vitro*, при котором гаплоидные клетки микроспор развиваются по спорофитному пути в зародышеподобные структуры – эмбриоиды и далее в растения-регенеранты, содержащие половинный набор хромосом.

2. Цитологические исследования проводили каждые 3-4 суток культивирования. Для этого брали 100 мкл суспензии микроспор, препараты окрашивали ацетокармином, изучали 200 микроспор с одного стекла.

Обсуждение результатов

В результате ряда последовательных митотических делений из первичных спорогенных клеток образуются микроспороциты, или материнские клетки микроспор. Из каждого микроспороцита в результате мейотического деления образуется тетрада (четверка) гаплоидных микроспор. В начале профазы мейоза вокруг микроспороцитов начинает откладываться толстый слой каллозы – нерастворимого в воде полисахарида. В период между окончанием мейоза и освобождением сестринских спор из каллозной оболочки протекают процессы формирования спородермы (оболочки микроспор). Сформировавшиеся микроспоры освобождаются из тетрады, в результате быстрого растворения каллозной оболочки. Высвободившиеся микроспоры быстро увеличиваются в размерах. Но, как было показано рядом исследователей, основные структурные особенности эктэкины определяются в более раннем тетрадном периоде, и последующие изменения касаются лишь развития уже имеющихся структурных черт. Отсюда делается вывод, что в изолированных микроспорах основные морфогенетические процессы затухают очень скоро после распада тетрады. Но хотя морфогенетическая активность заканчивается, происходит дифференциальный рост, изменяющий пропорции разных элементов эктэкины. Наконец вскоре после освобождения микроспор из тетрады начинается также развитие интины. Морфологическая активность цитоплазмы микроспоры заканчивается к началу деления ее ядра, когда все пусковые механизмы переключаются на совершенно иные процессы. Микроспора, в которой началось деление, тем самым уже перестает быть микроспорой в точном смысле этого слова. От собственно микроспоры остается лишь ее оболочка, а содержимое – это уже двухклеточная или трехклеточная стадия развития мужского гаметофита [14].

На момент изоляции микроспор картофеля сорт Невский отмечали следующие стадии развития: тетрады, распавшиеся тетрады на монады, ранние, средние и поздние (сильно вакуолизированные) микроспоры. Двух и трёх клеточную пыльцу не наблюдали. В поле зрения микроскопа 2-4% микроспор имели атипичное строение. Среди средних и поздних микроспор обнаружены двуядерные, с симметричными ядрами. Появление атипичных микроспор, возможно, индуцировала холодовая предобработка цветков в течение 4 суток, либо это связано с нарушениями в мейозе при микроспорогенезе. (рис. 1).

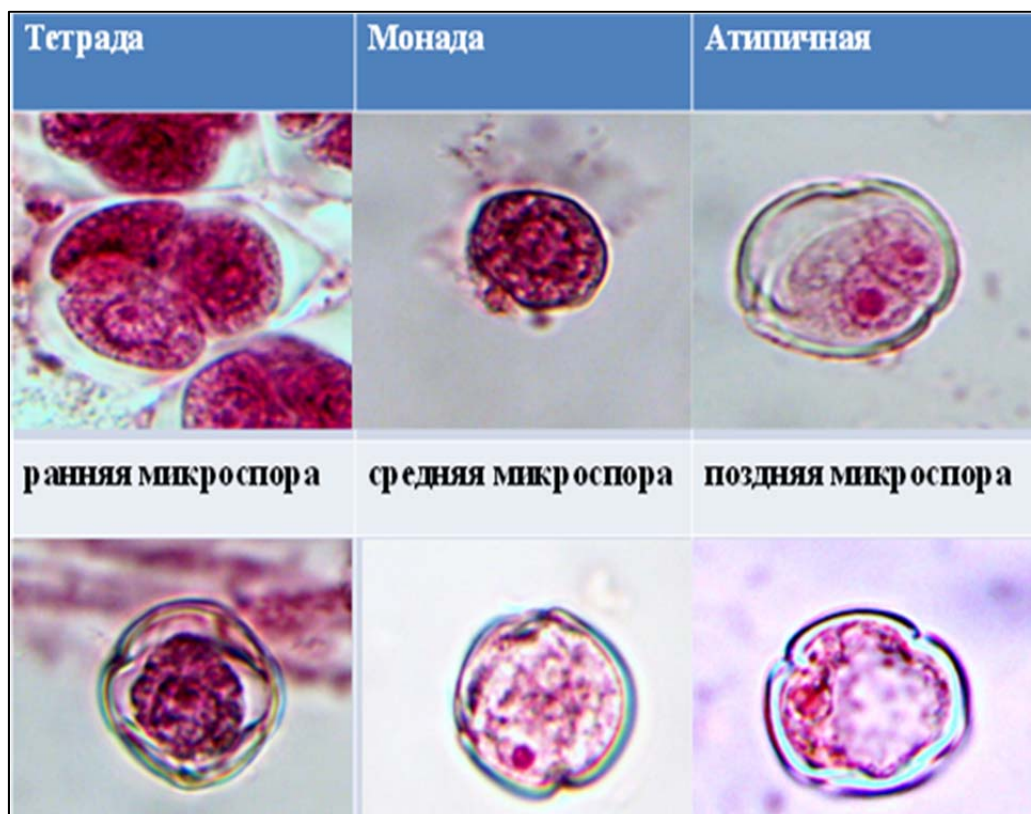


Рисунок 1. Стадии развития микроспор на момент изоляции у картофеля сорт Невский

Подбор оптимальной концентрации определенных гормонов, вводимых в состав питательной среды – один из ключевых этапов в работе с культурой *in vitro*. В лаборатории генетики картофеля Института генетики и цитологии НАН Беларуси было проведено сравнение эффективности воздействия различных физиологически активных веществ (цитокининов – 6-БАП, кинетина; ауксинов – НОУК, 2,4-Д; а также хлорхолинхлорида и алара, обладающих антигиббереллиновой активностью) на процесс андрогенеза в культуре пыльников сортов картофеля. Лучшие результаты были получены при использовании цитокининов, в частности БАП. Эффект воздействия цитокинина, по-видимому, заключался не только в увеличении доли эмбриогенных пыльцевых зёрен, но и повышении жизнеспособности эмбриогенных микроспор [7].

На данном этапе работы мы провели изучение влияния концентрации БАП в индукционной питательной среде на частоту образования эмбриоидов из культивируемых *in vitro* изолированных микроспор с целью разработки способа целенаправленного получения эмбриоидов. В течение 24 суток культивирования проводили подсчёт нормально развивающихся микроспор, атипичных и погибших. Соотношение количества микроспор на разных стадиях развития в зависимости от содержания БАП в питательных средах представлено на рис. 2. Использовали 4 варианта сред: № 1 MS + БАП 1 мкМ, № 2 MS + БАП 2 мкМ, № 3 MS + БАП 3 мкМ, № 4 MS + БАП 4 мкМ.

Уже на 3 сутки культивирования отмечали изменения в соотношении разных стадий развития микроспор в опыте. На среде № 1 сокращается количество монад за счёт увеличения доли ранних микроспор. Соотношение тетрад, средних и поздних микроспор остаётся практически неизменным. На среде № 2, вероятно, процессы прохождения микроспорами этапов развития проходят быстрее. Значительно сокращается доля тетрад, при этом возрастает количество поздних микроспор. При увеличении содержания БАП до 3 мкМ на среде № 3 данные процессы ещё более ускоряются. Наряду с резким сокращением доли тетрад, монад и ранних микроспор, значительно увеличивается количество поздних микроспор и двухклеточной пыльцы. На среде № 4 на 3 сутки культивирования тетрады мы не обнаружили, монад и ранних микроспор стало значительно меньше, а средние и поздние микроспоры наблюдали в равных долях. При этом выявили 1% погибших микроспор (рис. 2).

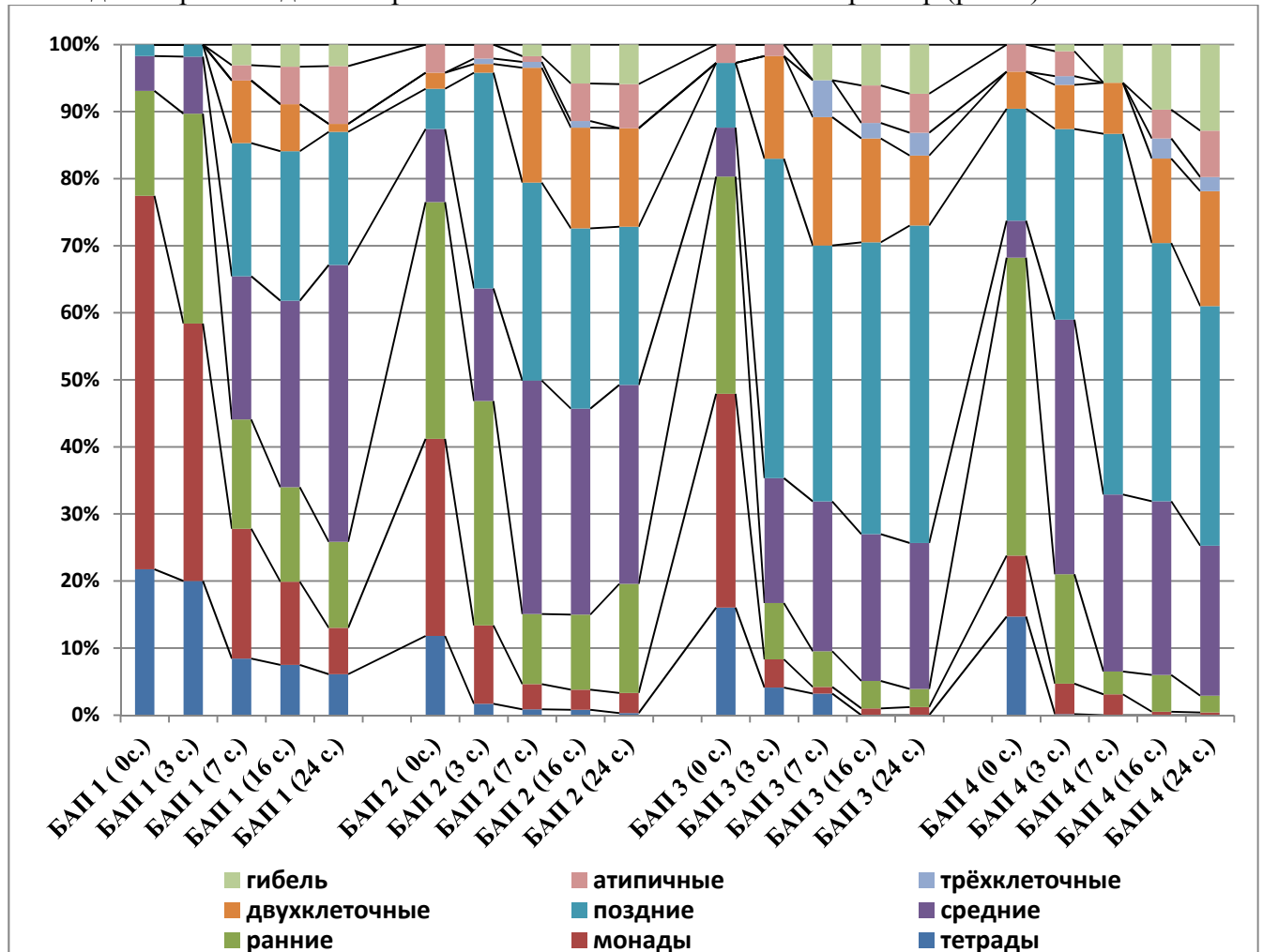


Рисунок 2. Соотношение количества микроспор на разных стадиях развития в зависимости от содержания БАП в питательных средах и времени культивирования

На 7 сутки культивирования на средах с БАП 1 мкМ доли монад, ранних, средних и поздних микроспор практически равные. При увеличении содержания БАП в питательных средах, значительно увеличивается процент средних и поздних микроспор. Т.е. при увеличении концентрации цитокинина ускоряется процесс нормального развития микроспор. Но, тем не менее, к 7 суткам отмечается гибель до 5% микроспор и увеличивается доля атипичных до 3,8%. Наряду с ассиметричным делением ядра на крупное вегетативное и мелкое генеративное, атипичные двудерные микроспоры с равными ядрами. Такие микроспоры обнаружены среди средних и поздних. Также к 7-11 суткам в результате серии делений формировались многоклеточные структуры, которые находились внутри оболочки микроспоры (рис. 2, 3).

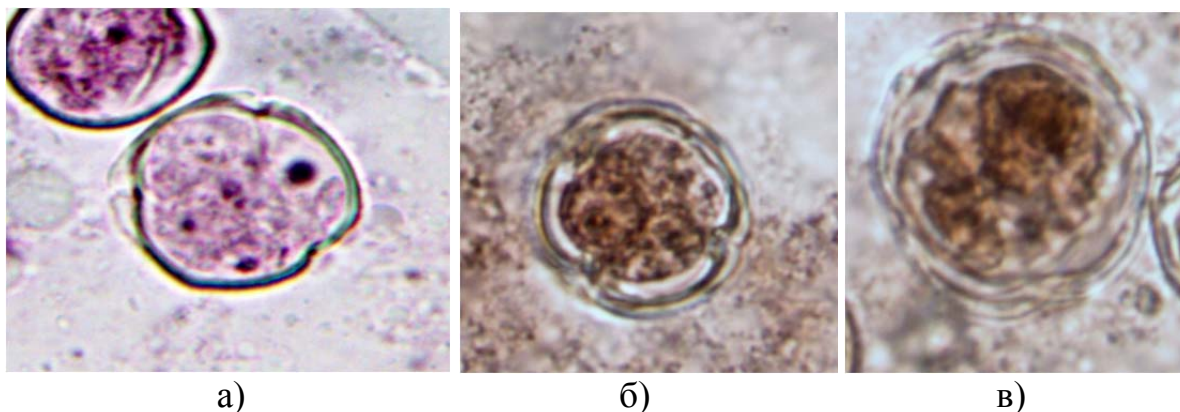
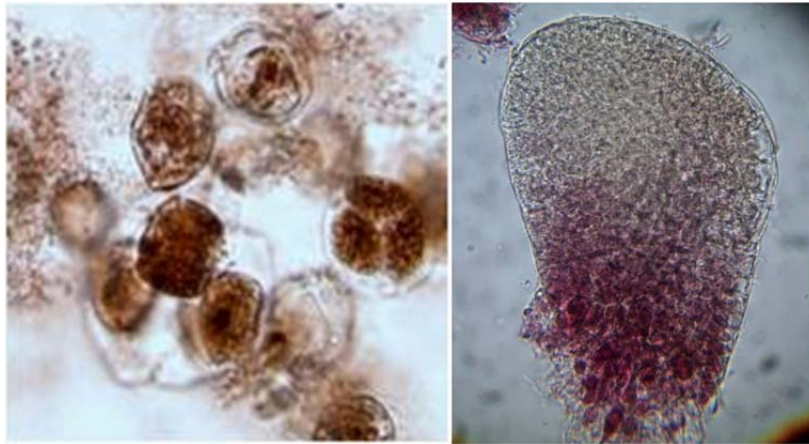


Рисунок 3. Многоклеточные структуры внутри оболочки микроспоры: а) 7 суток, б, в) 11 суток. Увел.×1000

По мнению J. M. Dunwell и U. Sunderland для реализации андрогенетического потенциала растений картофеля не менее важным, чем факторы питательной среды, является правильный выбор стадии развития микроспор при эксплантации [15]. По их мнению для картофеля оптимальная фаза эксплантации – между выходом микроспор из тетрад и первым пыльцевым митозом (стадия поздней сильно вакуолизированной микроспоры) [7, 15]. В наших опытах мы наблюдали атипичное развитие микроспор на стадии тетрад и монад, где происходило деление ядер. К 11 суткам в суспензии микроспор мы наблюдали зародышеподобные структуры (рис. 4).

Как было показано рядом исследователей, в изолированных микроспорах основные морфогенетические процессы затухают очень скоро после распада тетрады [14]. По нашему мнению, в искусственных условиях под действием внешних факторов вероятность переключение программы развития микроспоры на стадии монады на прямое формирование из неё нового растения очень велика. Мы склоняемся к версии о том, что инициальными клетками эмбрионов тетраплоидного сорта картофеля в период до 11-12 суток являлись монады.

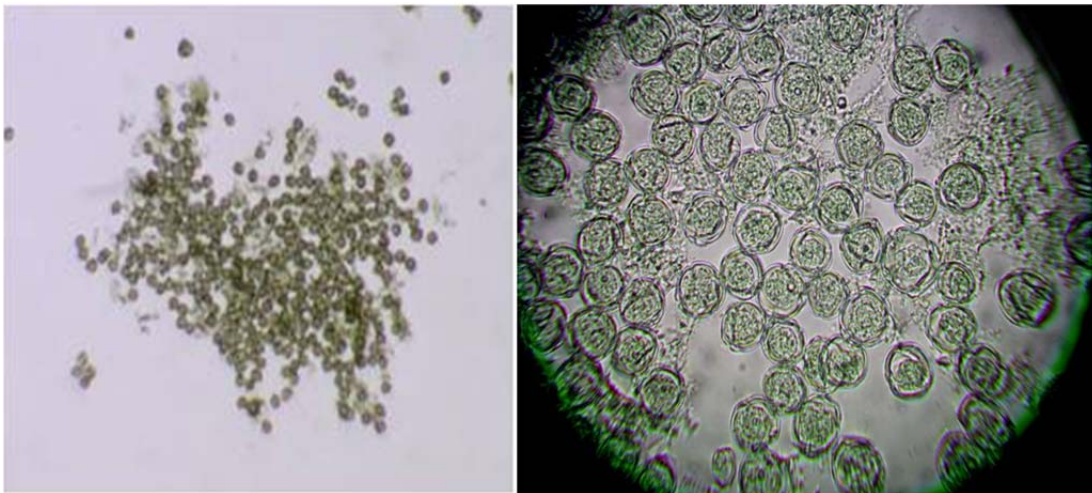


а)

б)

Рисунок 4. А) делящиеся монады на 11 сутки культивирования (увел.×1000),
б) эмбрион картофеля (увел.×1000)

После 11 суток культивирования часть флаконов с культурой микроспор переносили из термостатов на стеллажи с освещённостью 2000 люкс. Микроспоры и зародышеподобные структуры тетраплоидного сорта картофеля Невский приобрели зелёное окрашивание (рис. 5).



а)

б)



в)

г)

Рисунок 5. А) культура микроспор картофеля на свету: а) увел.×50, б) (увел.×400),
в, г) эмбрионы картофеля, выращенный на свету (увел.×400)

В питательной среде содержится цитокинин БАП. Известно, что цитокинины – это запрос на фотоассимиляты. Если ткань способна образовать хлоропласты, то под действием цитокинина синтезируется хлорофилл. В то же время, цитокинины активируя синтез хлорофиллов и апобелка ССКП, способствуют формированию структуры хлоропласта [16]. Культура микроспор картофеля 11 суток находилась в термостате в темноте, далее 4 суток на свету. Под действием питательных сред и условий культивирования в микроспорах прошли определённые формообразовательные процессы. Можно предположить, что даже если ввиду своей специализации микроспоры не способны образовывать хлоропласты, за время культивирования в искусственных условиях эта способность у них появилась.

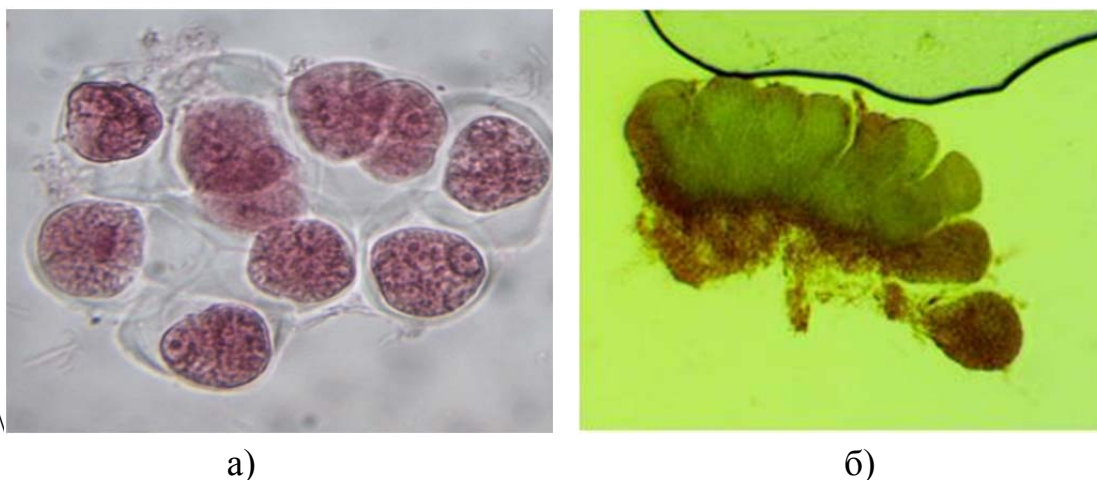


Рисунок 6. А) делящиеся микроспороциты на 11 сутки культивирования (увел.×1000), б) полиэмбрионд картофеля, выращенный на свету (увел.×1000)

На 16–24 сутки на разных вариантах сред соотношение многоклеточных структур имело свои особенности. В нашем эксперименте формировались многоклеточные структуры внутри оболочки микроспороцитов, монад, микроспор. В поле зрения микроскопа обнаруживали многоклеточные образования типа каллуса и эмбрионды. Наибольшее количество многоклеточных структур в оболочках микроспороцитов и монад наблюдали на среде № 1., а также недифференцированной ткани типа каллуса (табл. 1). Выявляли двухядерные средние и поздние микроспоры с симметричными ядрами на средах № 2 и № 3. По данным Ludmila Rihova и Jaroslav Turu [18] стресс-индуцированный эмбриогенез у картофеля инициируется путем симметричного деления ядра у микроспоры, с образованием двух одинаковых по размеру ядер.

На 24 сутки культивирования частота формирования эмбриондов (одиночных зародышеподобных структур) и частота образования полиэмбриондов в опыте составила 0,5-1,0% от общего количества микроспор и 4,7-6,6 % от количества многоклеточных структур (табл. 1).

Таблица 1. Доля многоклеточных структур (%) на разных стадиях развития микроспор в зависимости от содержания БАП в средах

Среда БАП в мкМ	Многоклеточные структуры внутри оболочки			Средние равно- ядерные	Поздние равно- ядерные	Многоклеточные образования типа каллус	Зародышеподобные структуры
	Микроспороциты	Монады	Микроспоры				
№ 1 БАП 1	71,0	9,4	0	0	0	14,9	4,7
№ 2 БАП 2	38,8	0	5,5	0	33,3	16,9	5,5
№ 3 БАП 3	0	0	0	20,0	73,3	0	6,6
№ 4 БАП 4	0	5,8	11,7	0	76,7	0	5,8

Необходимо отметить, в наших экспериментах 88,0-95,0% микроспор находилось в живом состоянии в течение 24 суток. Чешские учёные Ludmila Rihova и Jaroslav Tuру [18] отмечали жизнеспособными только 33% микроспор картофеля в течение 14 дней развития.

На 24 сутки культивирования в поле зрения микроскопа обнаружены развивающиеся эмбриониды картофеля в фазе органогенеза (рис. 7).

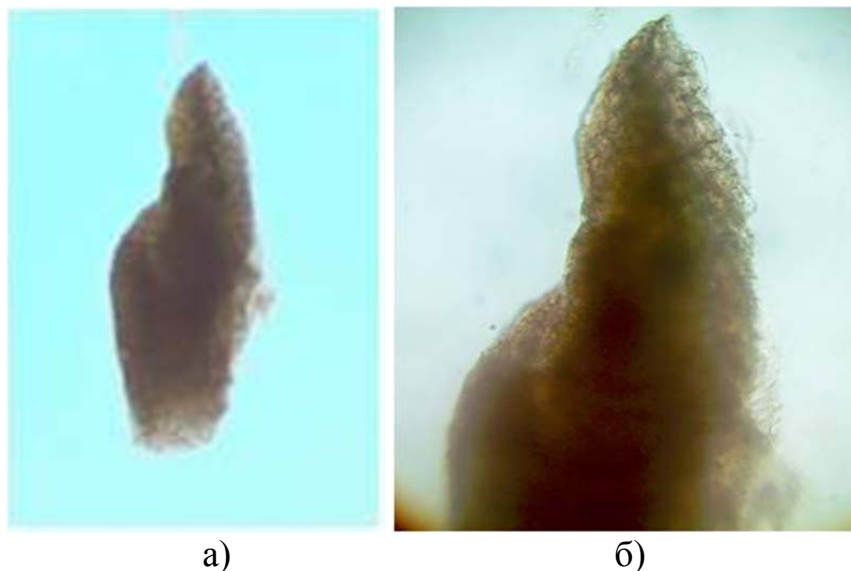


Рисунок 7. Эмбриониды картофеля в фазе органогенеза: а) увел.×100, б) (увел.×400)

Заключение

Использование питательных сред на основе MS с 1-4 мкМ БАП является эффективным для индукции эмбрионидогенеза у картофеля в культуре микроспор. Частота формирования эмбрионидов (одиночных зародышеподобных структур) и частота образования полиэмбрионидов в опыте составила 0,5-1,0% от общего количества микроспор и 4,7-6,6 % от количества многоклеточных структур. 88,0-95,0% микроспор находилось в живом состоянии в течение 24 суток.

Библиографический список

1. Food and agriculture organization of the United Nations. Statistics Division /<http://faostat3.fao.org/home/index.html>
2. Burlingame B., Mouille B., Charrondiere R., Nutrients, bioactive non-nutrients and anti-nutrients in potatoes // J. Food Compos. Anal. 2009. Vol. 22. P. 494–502.
3. Liedl B.E., Kosier T., Desborough S.L. HPLC isolation and nutritional value of a major tuber protein // Am. Potato J. 1987. Vol. 64. P. 545–557.
4. FAO. 2008. International year of the potato: why potato? <http://www.potato2008.org/en/aboutiyp/index.html>.
5. Hijmans, R.J. Global distribution of the potato crop // Am. J. Potato Res. 2001. Vol. 78. P. 403–412.
6. Шмыкова Н.А., Супрунова Т.П., Пивоваров В.Ф. Биотехнологические и молекулярно-генетические методы в селекции овощных культур (к 95-летию ВНИИССОК) // Сельскохозяйственная биология. 2015. Т. 50. № 5. С. 561-570.
7. Генетические основы селекции растений. В 4 т. Т. 3. Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия / науч. ред. А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева. Минск : Беларус. навука, 2012. 489 с.
8. Bajaj Y. P. S. *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding // Haploids in crop improvement . Berlin; Heidelberg, 1990. P. 3–44.
9. Foroughi-Wehr B., Wilson H.M., Mix G., Gaul H. Monohaploid plants from anthers of a diploid genotype of *Solanum tuberosum* L // Euphytica. 1977. Vol. 26. P. 361–367.

10. Rokka V. M., Pietilä L., Pehu E. Enhanced production of dihaploid lines via anther culture of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L. *ssp tuberosum*) lines // Amer. Potato J. 1996. Vol. 73. P. 1–12.
11. Mix G. Production of dihaploid plantlets from anthers of autotetraploid genotypes of *Solanum tuberosum* // Potato Res. 1983. Vol. 26, N 1. P. 63–67.
12. Johansson L. B. Increasing induction of embryogenesis and regeneration in anther cultures of *Solanum tuberosum* L. // Potato Res. 1988. Vol. 31. P. 145–149.
13. Snider K. T., Veilleux E. Factors affecting variability in anther culture and in conversion of androgenic embryos of *Solanum phureja* // Plant Cell Tissue Organ Cult. 1994. Vol. 36. P. 345–354.
14. Фёдоров А.А. Жизнь растений в шести томах. Том 5. Часть 1. Цветковые растения / Под ред. А. Л. Тахтаджяна. – М.: Просвещение, 1980. 430 с.
15. Dunwell J.M., Sunderland N. Anther culture of *Solanum tuberosum* L. // Euphytica. 1973. Vol. 22. Pp. 317–323.
16. Физиология растений: Учебник для студентов вузов / Под ред. Ермакова И.П.. М.: Издательский центр «Академия». 2005. 640 с.
17. Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н. Формирование полиэмбрионидов в культуре *in vitro* как этап биотехнологии клонирования пшеницы // Известия Уфимского научного центра РАН. 2014. № 1. С. 22–26.
18. Rihova L., Tupy J. Manipulation of division symmetry and developmental fate in cultures of potato microspores // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1999. Vol. 59. P. 135–145.

PLOWING OF CEREALS STRAW WITH *HUMICOLA FUSCOATRA* AS A METHOD OF MAINTAINING EFFECTIVE SOIL FERTILITY

Cherepukhina I. V.,

The A. L. Mazlumov All-Russian research institute of sugar beet and sugar
Voronezh State University

Bezler N. V.,

The A. L. Mazlumov All-Russian research institute of sugar beet and sugar

Kumitskij D. A.

Voronezh State University

Abstracts. As a result of the research it was found that the use of cellulolytic micromycete *Humicola fuscoatra* when plowing barley straw contributes to an increase in the microbiological and biochemical activity of the soil, which is confirmed by the calculated index (integral indicator of the soil biological state). During four years of the experiment this method influence a multifunctional positive effect on the microbiological and biochemical properties of the soil, which contributes to an increase in the effective and potential fertility and, as a result, in the productivity of the crops of the grain-fallow-crop rotation. The yield of winter wheat was 27.5 c/ha, which is higher by 2.4 c/ha of control and by 6.2 c/ha relative to the use of one straw. The yield increase of sugar beet was 8.6 t/ha. The yield of barley also had a positive trend, its increase in relation to plowing straw without additional components was 35.4%, which was the result of accelerated decomposition of barley straw and accumulation of nutrients in the previous three years.

Keywords: barley straw, *Humicola fuscoatra*, integral indicator of the biological state of the soil, crop yields, grain-fallow-crop rotation.