

ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* КРАСНОЙ МАЛИНЫ

Н.В. Соловых, канд. биол. наук

Федеральный научный центр имени И.В. Мичурина
(Россия, г. Мичуринск)

DOI:10.24412/2500-1000-2023-8-2-17-21ё

Аннотация. Установлено, что при введении в культуру *in vitro* красной малины добавление в питательную среду антиоксидантов повышает количество эксплантов, сохранивших жизнеспособность после стерилизации раствором хлорида ртути. Использование глутатиона восстановленного в концентрации 0,25-0,5 мМ (65-130 мг/л) и аскорбиновой кислоты в концентрации равной 0,75 мМ, (135 мг/л) позволило увеличить число образовавшихся побегов из эксплантов разных сортов на 29-67%. Внесение рутин в питательную среду для стимуляции морфогенеза неэффективно.

Ключевые слова: морфогенез, питательные среды, антиоксиданты, *in vitro*, малина красная.

Интенсификация садоводства требует разработки эффективных технологий производства сертифицированного посадочного материала [1]. Продуктивность маточных растений, полученных методом культуры тканей, вдвое выше, чем у растений, размноженных обычным способом [2, 3]. Поэтому в ряде стран Европы и Северной Америки использование метода клонального микроразмножения растений *in vitro* в процессе производства оздоровленного посадочного материала плодовых и ягодных поставлено на промышленную основу.

Однако постоянно появляются новые перспективные сорта сельскохозяйственных культур, требующие включения их в биотехнологические процессы, как для научных исследований, так и для ускоренного размножения и оздоровления.

Введению в стерильную культуру посвящено много работ, в том числе рассматривающих этот процесс для растений рода *Rubus* [4-6]. Все исследователи отмечают, что успех его зависит от выбора экспланта, сроков его взятия, режимов стерилизации и культивирования, генотипа растений. Дополнительные трудности представляет повреждение эксплантов продуктами окисления фенолов, которые выделяются на месте среза растительных тканей [7]. Для снижения вредного воздействия проводят пересадки на свежие среды

или используют антиоксиданты [8]. Задачей настоящего исследования являлись подбор антиоксидантов и их оптимальных концентраций для повышения результативности введения в культуру сортов красной малины.

Материалы и методы

Введение малины в искусственную культуру проводили по стандартной методике [6]. В качестве эксплантов были взяты апикальные и латеральные почки окончивших рост и частично одревесневших (август – начало сентября) побегов сортов красной малины Вольница и Беглянка.

Перед стерилизацией фрагменты растений тщательно промывали проточной водой со стиральным порошком, а затем ополаскивали дистиллированной водой. После ополаскивания удаляли кроющие чешуи и проводили стерилизацию 0,1%-м раствором сулемы (хлорид ртути) в течение 60 секунд. Затем экспланты вновь дважды ополаскивали проавтоклавированной дистиллированной водой, после чего помещали в пробирки диаметром 21 мм с питательной средой.

Для введения в культуру использовали среду с минеральным составом и витаминами по прописи MS [9]. Среду MS модифицировали, уменьшая количество аммонийного и нитратного азота вдвое. В качестве источника углеводов использовали сахарозу в концентрации 20 г/л. Из экзо-

генных регуляторов роста в питательную среду вносили 0,5 мг/л гибберелловой кислоты (ГК) и 0,2 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП).

Для снижения вредного воздействия продуктов окисления фенолов на развитие эксплантов в среды включали антиоксиданты: аскорбиновую кислоту, глутатион восстановленный и рутин в концентрациях 0,25, 0,5, 0,75 и 1 мМ. Контролем служила среда без антиоксидантов.

Через 3 недели после введения эксплантов в стерильную культуру образовавшиеся побеги пересаживали на среду для размножения. Состав среды для размножения отличался от среды для введения в культуру более высоким содержанием 6-БАП (0,5 мг/л).

Экспланты как на этапе введения в стерильную культуру, так и на этапе размножения культивировали при освещённости 2500 Лк, продолжительности светового дня 16 часов и температуре $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Учитывали процент стерильных эксплантов, процент жизнеспособных эксплантов от числа стерильных, среднее число побегов в первом пассаже после переноса образовавшихся побегов на среду для размножения.

В каждом варианте опытов было использовано 3 биологических повторности по 30 эксплантов в каждой. Математическая обработка экспериментальных данных осуществлялась с использованием статистического пакета программы Microsoft Excel.

Результаты исследований и обсуждение

В отношении сорта малины Вольница манипуляции по стерилизации материала и введению эксплантов в культуру проходили более успешно. Использование описанного выше режима стерилизации позволило получить у сорта Вольница $76,67 \pm 7,70\%$ стерильных эксплантов. Из них число сохранивших жизнеспособность на средах без антиоксидантов достигало $65,02 \pm 1,02\%$. У сорта Беглянка число стерильных эксплантов составило $43,33 \pm 3,84\%$, из них жизнеспособность сохраняли лишь $40,03 \pm 6,38\%$.

Увеличение продолжительности стерилизации почек сулемой до 90 секунд увеличивало количество стерильных эксплантов у обоих сортов до $82,33-90,33\%$, но снижало их жизнеспособность до $5,12-13,53\%$. Кроме того, после пересадки на среды для мультипликации коэффициенты размножения у сортов малины красной составляли всего $0,4-0,65$. Вероятно, это является следствием повреждения тканей в процессе длительного контакта с ртутным препаратом. Поэтому увеличение продолжительности стерилизации нежелательно.

Внесение в питательные среды антиоксидантов в процессе введения в стерильную культуру позволило увеличить число жизнеспособных эксплантов. Высокую эффективность показали аскорбиновая кислота и глутатион восстановленный.

При использовании аскорбиновой кислоты в оптимальной концентрации, равной $0,75$ мМ, количество жизнеспособных эксплантов малины сорта Вольница увеличилось на $29,11\%$, у сорта Беглянка этот показатель увеличился на $67,14\%$ по сравнению с контролем (табл.). У обоих сортов различия по количеству жизнеспособных эксплантов на средах с аскорбиновой кислотой и контрольных средах подтверждаются статистически при уровне значимости нулевой гипотезы $P < 0,05$.

Меньшие концентрации витамина С ($0,25$ и $0,5$ мМ) продемонстрировали не подтверждённую статистически тенденцию к увеличению количества жизнеспособных эксплантов. Увеличение концентрации аскорбиновой кислоты до 1 мМ не привело к увеличению числа жизнеспособных эксплантов по сравнению с концентрацией $0,75$ мМ ни у одного из изученных сортов красной малины.

Было установлено, что в первом субкультивировании на средах мультипликации экспланты, которые на этапе введения в культуру подвергались воздействию аскорбиновой кислоты, демонстрировали статистически не подтверждённую тенденцию к увеличению коэффициентов размножения. У сорта Вольница коэффициент размножения увеличился на $10,3\%$, у сорта Беглянка – на $11,59\%$ (табл.).

Оптимальные концентрации глутатиона восстановленного составили 0,25-0,5 мМ. Статистически подтвержденных различий по числу жизнеспособных эксплантов и коэффициентам размножения между названными вариантами концентраций не было обнаружено. Различия с контролем у названных вариантов математически существенны для сорта Беглянка, для второго сорта наблюдалась тенденция к увеличению жизнеспособности эксплантов и коэффициентов размножения под влиянием названного антиоксиданта. Применение глутатиона восстановленного в концентрации 0,5 мМ (130 мг/л) позволило повысить жизнеспособность эксплантов малины сорта Вольница в среднем на 12,23%, а эксплантов сорта Беглянка – на 45,72% (табл.). Коэффициент размножения в первом субкультивировании на среде мульти-

пликации у подвергнутых воздействию глутатиона на этапе введения в культуру эксплантов малины Вольница увеличился на 11,52% по сравнению с контролем, а эксплантов сорта Беглянка – на 30,43% (статистически существенное различие, $P < 0,05$).

Следует отметить, что сорт Беглянка, отличающийся в контроле более низкими показателями жизнеспособности после стерилизации ртутным препаратом, оказался более отзывчивым на внесение антиоксидантов.

Увеличение содержания глутатиона до 0,75 мМ и 1 мМ не привело ни к увеличению количества жизнеспособных эксплантов, ни к росту коэффициентов размножения по сравнению с оптимальными вариантами, хотя названные показатели имели значения выше, чем в контроле.

Таблица. Влияние оптимальных концентраций антиоксидантов на количество жизнеспособных эксплантов малины на этапе введения в стерильную культуру и коэффициент размножения в первом субкультивировании

Сорт	Вариант опыта	Количество стерильных эксплантов, %	Количество жизнеспособных эксплантов после стерилизации		Коэффициент размножения в первом субкультивировании на среде мультипликации
			шт.	%	
Вольница	контроль	76,67±7,70	43	65,02±1,02	1,65±0,18
	0,75 мМ аскорбиновой кислоты	68,89±7,29	51	83,95±2,87	1,82±0,19
	0,5 мМ глутатиона восстановленного	78,11±5,57	50	71,03±3,06	1,84±0,66
Беглянка	контроль	43,33±3,83	16	40,03±6,38	1,38±0,26
	0,75 мМ аскорбиновой кислоты	40±8,39	34	66,91±7,34	1,55±0,26
	0,5 мМ глутатиона восстановленного	41,11±4,84	21	58,33±6,73	1,8±0,25

Применение рутина ни в одной из испытанных концентраций не продемонстрировало положительных результатов. Во всех вариантах опыта и процент жизнеспособных эксплантов, и коэффициент размножения в первом субкультивировании на среде мультипликации у обоих сортов статистически не отличались от названных показателей в контроле.

Заключение

Установлено, что при введении в культуру *in vitro* красной малины добавление в питательную среду антиоксидантов повышает количество эксплантов, сохранивших жизнеспособность после стерилизации

раствором хлорида ртути. Использование аскорбиновой кислоты в концентрации равной 0,75 мМ, (135 мг/л) позволило увеличить число побегов, развивающихся на исходных эксплантах в среднем на 29,11% у сорта Вольница и на 67,14% у сорта Беглянка.

Применение глутатиона восстановленного в концентрации 0,25-0,5 мМ (65 - 130 мг/л) позволило повысить жизнеспособность эксплантов малины сорта Вольница в среднем на 9,24%, а эксплантов сорта Беглянка – на 45,72%.

Применение аскорбиновой кислоты и восстановленного глутатиона на этапе

введения в культуру *in vitro* дает тенденцию к незначительному повышению коэффициентов размножения на этапе мультипликации у сорта Вольница. В отношении испытывающих сильное повреждение при стерилизации 0,1%-м раствором сулемы эксплантов малины сорта Беглянка применение глутатиона восстановленного оказалось эффективным, удалось повысить коэффициент размножения на среде для мультипликации на 30,43% по сравнению с контролем ($P < 0,05$).

Внесение рутина в питательную среду для стимуляции морфогенеза неэффективно.

Увеличение содержания глутатиона до 0,75 мМ и 1 мМ не привело ни к увеличению количества жизнеспособных эксплантов, ни к росту коэффициентов размножения по сравнению с оптимальными вариантами, хотя названные показатели имели значения выше, чем в контроле.

Применение рутина ни в одной из испытанных концентраций не продемонстрировало положительных результатов. Во всех вариантах опыта и процент жизнеспособных эксплантов, и коэффициент размножения в первом субкультивировании на среде мультипликации у обоих сортов статистически не отличались от названных показателей в контроле.

Библиографический список

1. Пронина И.Н., Матушкина О.В. Экономические аспекты использования клонального микроразмножения в системе производства посадочного материала плодовых и ягодных культур // Плодоводство и ягодоводство России: Сб. науч. статей. – ВСТИСП. – М., 2011. – Т. XXV1. – С. 82-88.
2. Czynzyk A. Influence of micropropagation on the performance and quality of P 22 rootstock in mother plantation / A. Czynzyk, J. Hodun, P. Beilicki // Journ. Fruit ornamental Plant Res. – 1994. – Vol. 2, № 3. – P. 91-100.
3. Zimmerman R.H. Tissue culture of fruit trees and other fruit plants / R.H. Zimmerman // Int. Plant Propagators Soc.: Comb. Proc. – 1978. – Vol. 28. – P. 539-546.
4. Упадышев М.Т. Клональное микроразмножение некоторых нетрадиционных культур рода *Rubus* / М.Т. Упадышев // Ягодоводство в нечерноземье. – М., 1993. – С. 10-18.
5. Джигадло Е.Н., Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, Ягодными и декоративными культурами / Е.Н. Джигадло, М.И. Джигадло, Л.В. Голышкина. – Орёл: ГНУ ВНИИСПК, 2005. – 51 с.
6. Муратова С.А. Размножение садовых культур *in vitro* / С.А. Муратова, Д.Г. Шорников, М.Б. Янковская. РАСХН, ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина, – Мичуринск-научкоград РФ, ОАО Тамбовская типография «Пролетарский светоч». 2008. – 68 с.
7. Christiansen J. Prevention by polyvinylpyrrolidone of grown inhibition of *Hamamelis* shot tips *in vitro* and browning of the agar medium / J. Christiansen, M. Fannesbech // Acta Hort. – 1975. – V. 54. – P. 101-104.
8. Бутенко Р.Г. Биология высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р.Г. Бутенко. Учебное пособие. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
9. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures/ T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15, – №13. – P. 473-497.

INFLUENCE OF ANTIOXIDANTS ON THE EFFICIENCY OF INTRODUCING RED RASPBERRY INTO CULTURE IN VITRO

N.V. Solovykh, *Candidate of Biological Sciences*

I.V. Michurin Federal Scientific Centre
(Russia, Michurinsk)

Abstract. *It was found that when red raspberries were introduced into the culture in vitro, the addition of antioxidants to the nutrient medium increases the number of explants that remained viable after sterilization with a solution of mercury chloride. The use of reduced glutathione at a concentration of 0.25-0.5 mM (65-130 mg/l) and ascorbic acid at a concentration of 0.75 mM (135 mg/l) allowed to increase the number of shoots formed from explants of different varieties by 29-67%. The introduction of routine into the nutrient medium to stimulate morphogenesis is ineffective.*

Keywords: *morphogenesis, nutrient media, antioxidants, in vitro, red raspberry.*