

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ ПРИ КЛОНИРОВАНИИ IN VITRO ЧЁРНОЙ МАЛИНЫ

Соловых Наталья Владимировна

Кандидат биологических наук, ФГБНУ «Федеральный
научный центр имени И.В. Мичурина»
natalyasolovykh@yandex.ru

USE OF ANTIOXIDANTS IN THE IN VITRO CLONING OF BLACK RASPBERRY

N. Solovykh

Summary. The aim of the study was to study the effect of exogenous antioxidants on clonal micropropagation of black raspberry (*Rubus occidentalis* L.). **Methods.** At different stages of clonal micropropagation, ascorbic acid, reduced glutathione and rutin were added to the nutrient media at concentrations of 0 (control); 0.25; 0.5; 0.75 and 1 mM. At the stage of introduction into culture, the number of viable explants was taken into account, at the stage of multiplication — the multiplication coefficient and the length of shoots, at the rooting stage — the number of rooted plants, the number and length of roots. **Results.** At the stage of introduction into the culture, the addition of ascorbic acid or reduced glutathione to the nutrient media increases the number of viable explants in the Cumberland variety by 64–73.1 %, in the yellow-fruited mutant of Cumberland variety — by 72.2–100 %. At the multiplication stage, these antioxidants made it possible to increase the reproduction rates of black raspberries by an average of 30–35 %. Reduced glutathione increases the average shoot length of black raspberry by 19.8–33.3 %. The optimal concentration of ascorbic acid was 0.75 mM, optimal concentration of reduced glutathione was 0.5 mM. Ascorbic acid and reduced glutathione had no effect on the process of rhizogenesis. The use of rutin in any of the tested concentrations did not demonstrate a stimulating effect on the viability of sterilized explants, the processes of growth, reproduction and rooting of plants *in vitro*. **Conclusions.** The efficiency of clonal micropropagation of black raspberry at the stage of introduction into a sterile culture and at the stage of multiplication can be increased by adding ascorbic acid at a concentration of 0.75 mM or reduced glutathione at a concentration of 0.5 mM to the nutrient media.

Keywords: black raspberry, *in vitro*, clonal micropropagation, ascorbic acid, reduced glutathione.

Аннотация. Целью исследования являлось изучение действия экзогенных антиоксидантов на клональное микроразмножение чёрной малины (*Rubus occidentalis* L.). **Методы.** В питательные среды на разных этапах микроразмножения вносили аскорбиновую кислоту, глутатион восстановленный и рутин в концентрациях 0 (контроль); 0,25; 0,5; 0,75 и 1 мМ. На этапе введения в культуру учитывали количество жизнеспособных эксплантов, на этапе мультипликации — коэффициент размножения и длину побегов, на этапе укоренения — количество укоренившихся растений, число и длину корней. **Результаты.** На этапе введения в культуру внесение в питательные среды аскорбиновой кислоты или глутатиона восстановленного увеличивает количество жизнеспособных эксплантов у сорта Кумберленд на 64–73,1 %, у желтоплодного мутанта сорта Кумберленд — на 72,2–100 %, соответственно. На этапе мультипликации названные антиоксиданты позволили увеличить коэффициенты размножения у чёрной малины в среднем на 30–35 %. Глутатион восстановленный увеличивает среднюю длину побегов у чёрной малины на 19,8–33,3 %. Оптимальная концентрация аскорбиновой кислоты составила 0,75 мМ, глутатиона восстановленного — 0,5 мМ. Аскорбиновая кислота и глутатион восстановленный не оказали влияния на процесс ризогенеза. Применение рутина ни в одной из испытанных концентраций не продемонстрировало стимулирующего действия на жизнеспособность подвергнутых стерилизации эксплантов, процессы роста, размножения и укоренения растений *in vitro*. **Выводы.** Эффективность клонального микроразмножения чёрной малины на этапе введения в стерильную культуру и на этапе мультипликации может быть увеличена внесением в питательные среды аскорбиновой кислоты в концентрации 0,75 мМ или глутатиона восстановленного в концентрации 0,5 мМ.

Ключевые слова: чёрная малина, *in vitro*, клональное микроразмножение, аскорбиновая кислота, глутатион восстановленный.

В последние десятилетия популярность приобретает размножение садовых культур методами биотехнологии. Клонирование растений *in vitro* позволяет получать оздоровленный посадочный материал высших категорий качества. Кроме того, использование данного метода даёт возможность быстро размножить ценные генотипы, полученные путём традиционной селекции или с использованием биотехнологических приёмов [1, 2 и др.].

Клональное размножение растений *in vitro* включает в себя несколько этапов: введение в стерильную культуру, мультипликация, укоренение, адаптация *in vivo*, высадка в открытый грунт и доращивание. Относительно

широко культивируемых малины красной и ежевики для каждого из этих этапов разработаны сравнительно эффективные методики [3–5 и др.].

Однако существуют перспективные, но ещё слабо распространённые не только в промышленном, но и в любительском садоводстве виды рода *Rubus*, например, чёрная малина (*Rubus occidentalis* L.).

Плоды чёрной малины не крупные (1,7–2,4 г), но очень многочисленные. Поэтому по урожайности данная культура не уступает красной малине. По содержанию витаминов С, К, Е, антоцианов, железа, меди, марганца, антиоксидантов и эллаговой кислоты плоды *R. occidentalis*

превосходят плоды *Rubus idaeus* L. Они обладают хорошим вкусом, могут храниться в свежем виде в течение нескольких дней, транспортабельны. *R. occidentalis* достаточно морозостойка, хорошо переносит засушливые периоды, неприхотлива к почвам, устойчива к ряду вредителей и болезней.

Большинство сортов чёрной малины получены в США и Канаде. В России культура распространена меньше, чем красная малина и даже ежевика, что связано, главным образом, с нехваткой посадочного материала.

Чёрная малина не образует корневых отпрысков. В природе она размножается укоренением верхушек. Её можно размножать также горизонтальными отводками, одревесневшими и зелёными черенками. Но такие способы не предполагают массового производства саженцев.

Разработаны методы размножения чёрной малины *in vitro*. Определены пригодные для мультипликации и укоренения минеральный и гормональный составы сред [6–10 и др.]. Однако морфометрические показатели (коэффициент размножения, длина образовавшихся побегов, число корней, их длина) при клонировании чёрной малины уступают таковым у малины красной, а тем более у ежевики. Это может быть обусловлено угнетающим действием кислородных радикалов на физиологические процессы в тканях. Есть данные о повышении эффективности введения в стерильную культуру красной малины и росте у неё коэффициента размножения в первом субкультивировании на среде для мультипликации у при внесении в среды антиоксидантов [11].

Целью настоящего исследования являлось изучение действия антиоксидантов (глутатиона восстановленного, аскорбиновой кислоты и рутина) на процессы введения в стерильную культуру, размножения и укоренения чёрной малины *in vitro*.

Материалы и методы исследований

В качестве материала для исследований использовали чёрную малину сорта Кумберленд и желтоплодный мутант названного сорта, полученный в 1975 г. в ЦГЛ им. И.В. Мичурина (в настоящее время СГЦ ВНИИГиСПР—структурное подразделение ФГБНУ «Федеральный научный центр имени И.В. Мичурина») и получивший обозначение YFM-75 (yellow-fruit mutant).

Введение в культуру осуществляли в августе — начале сентября апикальными и латеральными почками окончивших рост побегов. Почку промывали проточной водой со стиральным порошком, ополаскивали дистиллированной водой, после чего удаляли кроющиеся чешуи и проводили стерилизацию 0,1 %-м раствором суле-

мы (хлорид ртути) в течение 45 секунд. Затем экспланты вновь дважды ополаскивали проавтоклавированной дистиллированной водой и помещали в пробирки диаметром 21 мм с питательной средой. Использовали среду с минеральным составом по прописи MS [12], содержащую 1/2 макросолей, 20 г/л сахарозы и 0,5 мг/л гибберелловой кислоты (ГК) и 0,1 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП).

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

Для укоренения использовали среду с минеральным составом по прописи MS, содержащую 1/2 макросолей, 15 г/л сахарозы и 0,5 мг/л ГК и 0,5 мг/л β-индолил-3-масляной кислоты (ИМК).

На всех этапах клонирования в среды включали антиоксиданты. В разных вариантах опытов использовали аскорбиновую кислоту, глутатион восстановленный и рутин в концентрациях 0 (контроль); 0,25; 0,5; 0,75 и 1 мМ.

Экспланты культивировали при освещённости 2500 Лк, продолжительности светового дня 16 часов и температуре 23±2°C.

На этапе введения учитывали процент стерильных эксплантов и процент жизнеспособных эксплантов от числа стерильных. На этапе мультипликации — коэффициенты размножения и длину образовавшихся побегов через 30 дней после высадки на среду. На этапе укоренения учитывали количество укоренившихся микрочеренков, число и суммарную длину корней на один эксплант через 45 суток с момента высадки на среду для индукции ризогенеза.

В каждом варианте опытов было использовано 6 повторностей по 6 эксплантов в каждой. Математическую обработку данных проводили с использованием статистического пакета программы Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Описанный выше режим стерилизации позволил освободить от грибного и бактериального заражения от 44,4 до 68,3 % эксплантов чёрной малины. Присутствие в средах антиоксидантов, как и следовало ожидать, не повлияло на количество стерильных эксплантов. Однако внесение в среду аскорбиновой кислоты увеличило число эксплантов, образующих побеги у сорта Кумберленд на 64 %, а у YFM-75 — на 72,2 %. Наличие в среде глутатиона восстановленного привело к росту

этого показателя у сорта Кумберленд на 73,1 %, у YFM-75 — вдвое (Таблица). Применение рутина не дало положительного эффекта ни в одном из вариантов опыта.

Для аскорбиновой кислоты оптимальной оказалась концентрация 0,75 мМ, для глутатиона восстановленного 0,50 мМ. В таблице приведены данные вариантов опыта, оказавшихся наиболее эффективными.

Таблица 1.

Влияние оптимальных концентраций антиоксидантов на эффективность введения в стерильную культуру малины чёрной

Сорт	Вариант опыта	Количество стерильных эксплантов, %	Количество жизнеспособных эксплантов после стерилизации, % от числа стерильных
Кумберленд	контроль	58,3±7,1	18,6±6,2
	0,75 мМ аскорбиновой кислоты	63,9±8,0	30,5±1,8
	0,5 мМ глутатиона восстановленного	63,9±5,1	32,2±4,6
Желтоплодный мутант сорта Кумберленд	контроль	44,4±5,6	9,7±4,2
	0,75 мМ аскорбиновой кислоты	42,4±3,5	16,7±7,4
	0,5 мМ глутатиона восстановленного	50±6,1	19,4±5,7

На этапе мультипликации присутствие аскорбиновой кислоты (0,75 мМ) и глутатиона восстановленного (0,5 мМ) в питательных средах увеличило коэффициенты размножения у сорта Кумберленд на 35,0 и 39,9 %, соответственно. У YFM-75 внесение в среду витамина С увеличило коэффициент размножения на 32,2 %, а глутатиона — на 28,7 % (Рис. 1).

Применение глутатиона восстановленного дало существенное увеличение средней длины побегов у сорта Кумберленд на 33,3 %, а у YFM-75 — на 19,8 % (P<0,05). На средах, содержащих 0,75 мМ аскорбиновой кислоты, обе изучаемые формы продемонстрировали не подтверждённую математически тенденцию к увеличению этого показателя (Рис. 2).

Использование рутина на этапе мультипликации не дало стимулирующего эффекта.

На этапе ризогенеза в контроле количество укоренившихся растений сорта Кумберленд составило 74,1±4,3 %, у желтоплодного мутанта этот показатель составил 62,3±7,2 %. Применение антиоксидантов ни в одном из вариантов не позволило повысить процент укоренившихся растений.

Аскорбиновая кислота и глутатион восстановленный на этапе укоренения растений *in vitro* дали незначительное увеличение числа корней и их длины. Только у YFM-75 в варианте с глутатионом (0,5 мМ) наблюдается статистически существенное различие с контролем по числу корней. В контроле среднее число корней на один эксплант через 45 суток культивирования составляло 7,4±1,1 шт., в присутствии 0,5 мМ глутатиона восстановленного этот показатель равнялся 9,5±0,8 шт. (P<0,05).

Следует отметить, что в контроле и в вариантах с антиоксидантами по количеству жизнеспособных эксплантов после стерилизации ртутным препаратом и коэффициентам размножения желтоплодный мутант чёрной малины уступает сорту Кумберленд, что вероятно, связано с его генетическими особенностями.

Заключение

Внесение в питательные среды аскорбиновой кислоты и глутатиона восстановленного позволяет увеличить

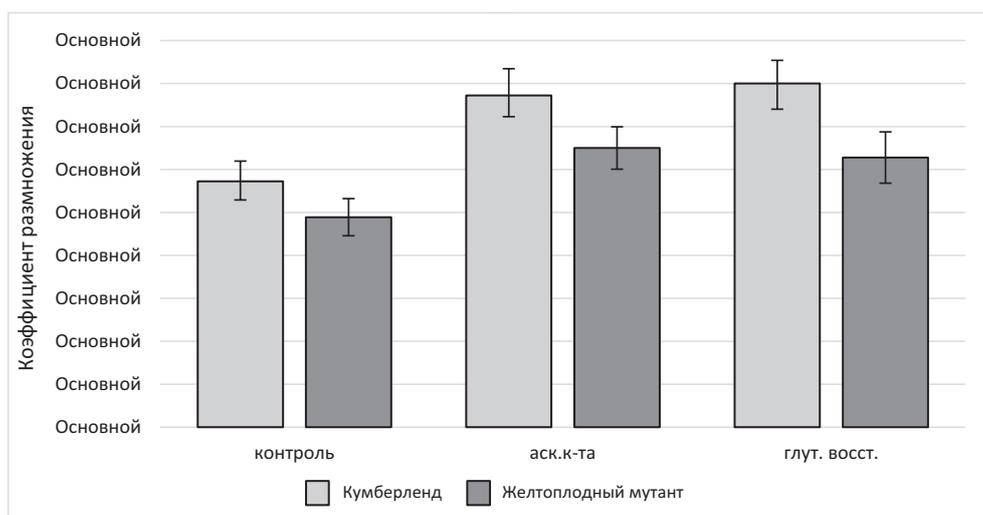


Рис. 1. Влияние антиоксидантов на коэффициенты размножения чёрной малины (30 дней культивирования)

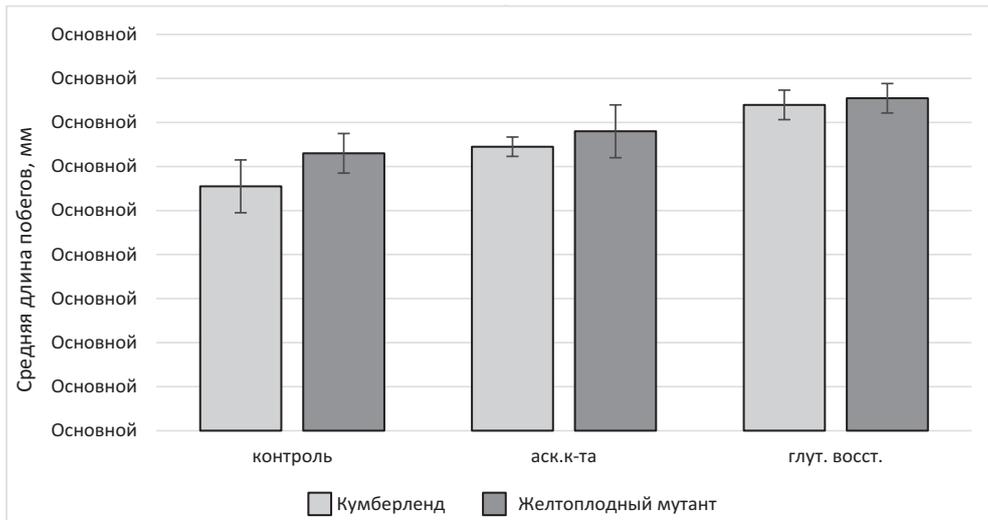


Рис. 2. Влияние антиоксидантов на среднюю длину побегов у чёрной малины (30 дней культивирования)

эффективность введения в культуру и эффективность мультипликации чёрной малины. Оптимальная концентрация аскорбиновой кислоты составляет 0,75 мМ, глутатиона восстановленного — 0,5 мМ.

На этапе введения в культуру внесение в среду аскорбиновой кислоты увеличивает число образующих побеги эксплантов у сорта Кумберленд на 64 %, а у желтоплодного мутанта — на 72,2 %. Внесение в среду глутатиона восстановленного приводит к увеличению этого показателя у сорта Кумберленд на 73,1 %, у желтоплодного мутанта — вдвое ($P < 0,05$).

На этапе мультипликации названные антиоксиданты позволяют увеличить коэффициенты размножения у чёрной малины в среднем на 30–35 %. Использование глутатиона восстановленного дает увеличение средней

длины побегов у сорта Кумберленд на 33,3 %, у желтоплодного мутанта чёрной малины — на 19,8 % ($P < 0,05$). Аскорбиновая кислота позволила получить не подтверждённую математически тенденцию к увеличению этого показателя у обеих форм.

На этапе укоренения в подавляющем большинстве вариантов применение антиоксидантов не дало достоверных различий с контролем ни по количеству укоренённых растений, ни по морфометрическим показателям (числу и длине корней).

Применение рутина ни в одной из испытанных концентраций не продемонстрировало стимулирующего действия на жизнеспособность подвергнутых стерилизации эксплантов, процессы роста, размножения и укоренения растений *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Высоцкий В.А. Некоторые итоги и перспективы использования методов культуры изолированных тканей и органов в садоводстве // История, современность и перспективы развития садоводства России: Материалы междунар. конф., Москва, 15–17 ноября 2000 г. — М., 2000. С. 163–191.
2. Расторгуев С.Л. Культура изолированных тканей и органов в селекции плодовых растений / С.Л. Расторгуев. Мичуринск-наукоград РФ: Изд. Мичуринского государственного аграрного университета, 2009. 171 с.
3. Джигадло Е.Н., Джигадло М.И., Гольшикина Л.В. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами. Орёл: ГНУ ВНИИСПК. 2005. 51с.
4. Муратова С.А., Шорников Д.Г., Янковская М.Б. Размножение садовых культур *in vitro* // РАСХН, ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина, — Мичуринск-наукоград РФ, ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина: ОАО Тамбовская типография «Пролетарский светоч». 2008. 68 с.
5. Волосевич Н.Н. Малина // Размножение плодовых, ягодных растений, винограда и хмеля в культуре *in vitro* / Н.Н. Волосевич, О.А. Гашенко; под общей редакцией Н.В. Кухарчик. Минск: Колорград, 2021. с 164–193.
6. Anderson W.C. Tissue culture propagation of red and black raspberries, *Rubus idaeus* and *Rubus occidentalis* / W.C. Anderson // Acta Horticulturae. 1980. №112, P. 13–20.
7. Упадышев М.Т., Высоцкий В.А. Размножение ежевики и малины чёрной методом культуры тканей // Садоводство и виноградарство. 1991. №6, С.24–27.
8. Упадышев М.Т. Клональное микроразмножение некоторых нетрадиционных культур рода *Rubus* // Ягодководство в Нечерноземье. — М., 1993. С. 10–18.
9. Соловых Н.В. Оптимизация питательных сред для клонального размножения красной и чёрной малин *in vitro* / Н.В. Соловых // Плодоводство и ягодоводство России, 2014, — Т.ХХХХ. — №1. С. 297–300.
10. Cheong E.J., Jeon A.R., Kang J.W., Mock R., Kinard Q., Li R. *In vitro* elimination of Black raspberry necrosis virus from black raspberry (*Rubus occidentalis*) — Short communication // Hort. Sci. 2014, Vol. 41, No 2, P. 95–99.
11. Соловых Н.В. Влияние антиоксидантов на эффективность введения в культуру *in vitro* красной малины // Международный журнал гуманитарных и естественных наук. 2023. №8–2 (83). С. 17–21.
12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol.Plant.* 1962. V.15. №13. P.473–497.

© Соловых Наталья Владимировна (natalyasolovykh@yandex.ru)

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»