

Влияние обработки регуляторами роста стенок контейнеров на развитие корневой системы зависело от применяемого вещества и концентрации. Применение паклобутразола в концентрации 1 мл/ л стимулировало более раннее ветвление корней и предотвращало закручивание.

### **1.3. Модификация питательной среды хелатными комплексами микроэлементов при клональном микроразмножении подвоя вишни ВЦ-13 (С.В.Акимова, Е.А.Никулина, Н.В.Цирульникова, В.В.Киркач, В.И.Деменко)**

Косточковые культуры включают множество экономически важных видов: нектарины и персики, сливы, абрикосы, вишню кислую и черешню и др. В настоящее время мировое производство плодов косточковых культур превышает 30 миллионов тонн. В России общее производство плодовых косточковых культур по итогам 2018 года достигло 615,6 тыс. тонн, а посевные площади, занятые под возделыванием последних оценивались более чем в 120 тыс. га. (Mayer, 2017) Черешня и вишня кислая получили признание во многих странах мира за потенциальную пользу для здоровья человека и являются любимыми плодовыми культурами многих людей. В России последние очень распространены, а по производству вишни Россия занимает лидирующие позиции в мире.

Современные сады косточковых культур представляют собой сложные высокопродуктивными биологические системы. При этом первое важнейшее требование, которое предъявляется к качеству саженцев плодовых растений - это генетическое и санитарное состояние растений, то есть истинный тип генотипа и отсутствие патогенных микроорганизмов (вирусов, бактерий, грибов). Более того, корневая система качественных саженцев должна быть хорошо развитой и насчитывать не менее чем 3-4 хорошо структурированных корней, равномерно распределенных вокруг корневой шейки растения, снабженных обрастающими корнями (всасывающие, проводящие, переходные корни) (Almada R. et all., 2013; Mayer N. A. et all., 2017).

Создание высокопродуктивных садов интенсивного типа косточковых культур требует развития интенсивных методов ускоренного размножения чистосортного оздоровленного посадочного материала. (Mayer, 2017; Balla, 2006; Зубков, 2020). Клональное микроразмножение представляет собой наиболее широко распространенный метод вегетативного размножения клоновых подвоев косточковых культур (Battistini, 2002; Fotopoulos, 2005; Balla, 2006; Zilkah, 2006; Vaez-Livari, 2006; Almada, 2013;). Размножаемые *in vitro* растения имеют небольшие размеры и легко транспортируются, свободны от патогенных микроорганизмов.

Одним из самых лучших клоновых подвоев вишни, применяемых в климатических условиях России, является подвой ВЦ-13 (*P.cerasus* × (*P.cerasus* × *P.maackii*), выведенный специалистами Крымской опытно-селекционной станции (Россия) (Еремин, 2003). Он отличается высокой морозостойкостью, засухоустойчивостью, сопротивляемостью ко многим заболеваниям и физиологически совместим со всеми сортами черешни и вишни.

В культуре размножения *in vitro* ВЦ-13 испытывает общие трудности характерные для клонального микроразмножения многих косточковых культур. Фаза укоренения полученных микрорастений-регенерантов *in vitro* и их последующая адаптация к нестерильным условиям является одним из самых сложных и ключевых факторов успешного размножения (Cos, 2004; Fotopoulos, 2005; Vaez-Livari, 2006; Tsipouridis, 2006; Guo-Qing, 2015). Для решения этой проблемы на этапе ризогенеза в питательные среды обычно вводят повышенные дозы синтетических ауксинов. Однако, длительное воздействие ауксинов сначала стимулирует процессы корнеобразования, но затем ингибирует рост корней, способствует развитию каллуса и некротизации тканей у растений-регенерантов (Perez-Tornero, 2000). Другой подход, используемый на практике, заключается в применении временного погружения растений в жидкую питательную среду на разное время и интервалы (Damiano, 2016). При этом многие авторы отмечают важность правильного подбора оптимального состава питательной среды (Zilkah, 2006; Guo-Qing, 2015).

Питательные среды, применяемые в клональном микроразмножении растений, представляют собой сложные составные композиции неорганических и органических соединений. В составе среды могут присутствовать более 25-30 компонентов, находящихся в строго определенных соотношениях и пропорциях (Murashige, 1962; George, 2008; Lloyd, 1980; Driver, 1984; Quoirin, 1977). Замена компонентов, хотя бы одного всегда сопряжена с риском непредсказуемости поведения системы. Это могут быть и возможные химические- и биохимические превращения элементов, и непредвиденная реакция растений-эксплантов (Ramage, 2002).

Оптимизация состава питательных сред и природы входящих в них элементов для микроразмножения является сложной многопараметрической задачей, связанной с разнообразными потребностями различных видов растений в питании и многочисленными химическими взаимодействиями питательных веществ. Несмотря на то, что минеральное питание является одним из важнейших факторов микроразмножения растений, его влияние на морфогенез изучено слабо (Ramage, 2002, Greenway, 2012). В связи с этим при разработке подходящего состава питательных сред обычно модифицируют регуляторы роста растений без изменения минеральных питательных веществ (Hand, 2014, Andres, 2002). Однако многие медленно растущие или трудноразмножаемые в стерильных условиях виды и сорта плодовых культур не поддаются классическому оптимизационному подходу путем тестирования гормональных компонентов роста растений и их трудно выращивать на любой из стандартных питательных сред. Субоптимальные питательные среды вызывают серьезные физиологические нарушения или даже гибель культур (Hand, 2014, Andres, 2002). Кроме того, нарушение обмена веществ, вызванное дисбалансом питания, влияет на чувствительность тканей и клеток к регуляторам роста (Ramage, 2002). Ряд авторов отмечает, что регуляторы роста могут быть уменьшены или даже удалены из питательных сред при устранении дисбаланса (Preese, 1995, Kothari, 2004). Такие проявления, как стекловидность

и каллусообразование, могут быть связаны с высокой концентрацией регуляторов роста (Oberschelp, 2016).

В последнее десятилетие в литературе появляется все больше сведений о критическом влиянии оптимальных значений мезо- и микроэлементов на лучшую регенерацию побегов и укоренение микрорастений плодовых культур методами *in vitro* (Reed, 2013; Hand, 2014). Следует отметить, что отсутствие достаточных фундаментальных знаний о механизмах доступности и поглощения питательных элементов в биологии растений, и тем более в культуре тканей, служит серьезным препятствием для развития прогрессивных методик получения питательных растворов (Niedz, 2007; Ramage, 2002). Помимо концентраций компонентов и их соотношений между собой в фокусе внимания должны быть такие факторы, как химическая форма компонента, обеспечивающая его доступность, химические взаимодействия между компонентами в среде, эффекты антагонизма и синергизма при поглощении элементов тканями растений и др (Niedz, 2007; Битюцкий, 2011).

Хелатная форма поглощения также присуща и другим микроэлементам, но в питательных средах они используются в форме простых неорганических солей (George, 2008; Битюцкий, 2011). Качественное улучшение доступности и поглощения трейсовых элементов за счет непосредственной замены на хелатные формы в питательных средах способно в значительной мере повысить физиологический статус растений-регенерантов. Однако, применение хелатных форм микроэлементов сопряжено с рядом аспектов, требующих детального изучения. Речь идет о дополнительном влиянии лигандов, в том числе ранее не используемых в практике культуры тканей *in vitro*, на рост и развитие микропобегов.

Среди опубликованных данных крайне мало присутствует сведений, посвященных изучению модификаций питательных сред хелатными формами микроэлементов. Практически все они касаются улучшения питания растений-регенерантов отдельных культур железом за счет замены  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{EDTA}$  в среде на комплекс  $\text{FeEDDHA}$  как таковой (Molassiotis, 2004;

Padmanabhan, 2017). Более широких исследований не проводилось. Отчасти это связано с ограниченностью знаний специалистов-биотехнологов сельскохозяйственных культур в области химии комплексонов. Так, например, известны также другие эффективные хелатные соединения железа как с карбоксил-, так и с фосфорсодержащими хелантами. Более того, фосфорорганические комплексоны способны образовывать при определенных условиях стабильные комплексы как с Fe (III), так и с Fe(II), что невозможно в отношении карбоксилсодержащих лигандов, например, EDTA, ДТРА, EDDHA и др. (Дятлова, 1988). Тогда как двухвалентная форма Fe энергетически более предпочтительна для жизнедеятельности многих растений (Jolley, 1996).

Следует заметить, что научную новизну предложенных модификаций питательных сред составляет не только сам факт замены неорганических солей треисовых элементов на хелатные соединения, но впервые в практике культуры тканей использование в качестве хеланта фосфорсодержащего комплексона класса бисфосфонатов - оксиэтилидендифосфоновой кислоты (1-hydroxyethylidenediphosphonic acid HEDP).

Известно, что бисфосфонаты обладают самостоятельной биологической активностью (Архипова, 1984). HEDP используется как медицинская субстанция, для неё характерна специфическая стереохимия и взаимное влияние фосфоновых фрагментов. В литературе приведены результаты многочисленных исследований относительно применения HEDP в медицине и других отраслях. Являясь аналогом природных пирофосфатов, HEDP способна участвовать более чем в 60 биохимических клеточных реакциях, регулируя ионный кальциевый и фосфорный обмен (Матковская, 2001). Доказано, что это вещество имеет свойство стабилизировать клеточные мембраны, взаимодействуя с лигандами мембранных белков и, таким образом, встраиваться в мембранные структуры и заменять утраченные компоненты мембран. HEDP также проявляет способность подавлять активность ферментов разрушающих мембранные компоненты (Юрьева, 1988). Однако, сведений о роли HEDP в физиологии растений крайне мало. Ранее, в работах советских

ученых, сообщалось о ретардантных свойствах HEDP, которые были обнаружены при выращивании ржи, ячменя, гречихи (Дятлова, 1984). Механизм ретардантного действия HEDP детально не изучался и остается невыясненным. Ввиду своих химических свойств, HEDP устойчива к ферментативному гидролизу и не может разлагаться с производством этилена. Также, в других ранее проведенных исследованиях в условиях гидропоники был продемонстрирован значительный эффект последствия применения комплексоната железа  $Fe^{3+}$  на основе HEDP, в котором испытываемые растения после среды с достаточным содержанием  $Fe^{3+}$  HEDP перемещали в питательный раствор без добавления хелата железа и, при этом уровень концентрации хлорофилла в тканях и интенсивность фотосинтеза не снижалась.

Основываясь на информации о поведении бисфосфонатов в биологических системах, авторами проекта выдвинута гипотеза о возможном ретардантном действии HEDP на растения-регенеранты в культуре тканей при модификации питательных сред и возможных эффектах последствия. В связи с чем в ходе исследования предложено применить и изучить метод временного погружения эксплантов в питательные среды, модифицированные хелатами трейсовых элементов на основе HEDP, что также будет проводиться впервые.

В более ранних исследованиях было показано, что оптимальные питательные среды и условия микроразмножения сильно зависят от генотипа культуры (Perez-Tornero, 2000; Zilkah, 2006; Ghasheem, 2018). Тем не менее, наиболее широко используется питательная среда Мурасиге-Скуга (Murashige, 1962). Известно, что косточковые культуры содержат в тканях повышенные количества пектиновых веществ, которые имеют высокое сродство к ионам трейсовых элементов. Поэтому косточковые культуры отличаются повышенными требованиями к питанию микроэлементами. В стандартных питательных средах микронутриенты используются в форме неорганических солей. Такая форма не является оптимальной для поглощения растениями многих необходимых элементов, например, Fe, Cu, Zn, Mn. Наиболее предпочтительной является хелатная форма. Однако до сих пор работы в

области модификации микроэлементного состава питательных сред были сфокусированы на введении непосредственных комплексонов Fe (обычно, FeEDDHA) (Van der Salm, 1994; Матковская, 2001; Zawadzka, 2006; Molassiotis, 2004; Licea-Moreno, 2015).

Цель данной работы заключалась в исследовании влияния замены неорганических солей всех микроэлементов, входящих в состав питательной среды на хелатные формы последних на ризогенез *in vitro* клонового подвоя косточковых культур - ВЦ-13. В качестве хелатирующих агентов использовались 2 вида комплексонов: наиболее широко распространенный карбоксилсодержащий комплексон - этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA) и, впервые, фосфорсодержащий комплексон из класса бисфосфонатов - этилендиаминдифосфоновая кислота 1- hydroxyethylidenediphosphonic acid (HEDP).

Объекты исследований: клоновый подвой косточковых ВЦ-13.

На этапе ризогенеза (укоренения) использовали питательную среду с минеральной основой по прописи Мурасиге и Скуга (MS) редуцированную до 1/2 по макроэлементам, обогащенную следующими веществами: (мг/л) тиамин-гидрохлорид (B1), пиридоксин-гидрохлорид (B6), никотинамид (PP) - 0,5; ИМК - 0,2; сахара - 15000, агар-агар - 6000.

Микроэлементы модифицировали в хелатную форму на основе EDTA и HEDP. Подготовка маточных растворов хелатных форм микроэлементов для питательной среды проводилась в лаборатории технологии комплексонов и комплексных соединений Национального Исследовательского Центра «Курчатовский институт» - Институт химических реактивов и особо чистых химических веществ (ИРЕА). В ходе работ изучалось влияние 3-х уровней концентраций хелатированных микроэлементов: 1,25; 2,5 и 5 мг/л.

Питательную среду разливали в культуральные сосуды (стеклянные банки объемом 100 мл с покрытием из пленки) по 30 мл в каждый и подвергали стерилизации в автоклаве продолжительностью 20 минут и давлением 0,2 Мпа. В ламинарном боксе в каждый сосуд помещали по 5 микрочеренков длиной в 2-3

узла. Субкультивирование опытных микрорастений проводилось в культуральной комнате при интенсивности освещения 2500 люкс, 16-ти часовом фотопериоде, температуре 20-22°C. На 30 день субкультивирования проводили учеты укореняемости и развития растений-регенерантов. Повторность опытов – трехкратная по 12 эксплантов в одной повторности.

На втором этапе, после получения результатов первого проверка наилучшего результата в большем масштабе. В табл.1.8 представлена общая схема опытов.

Таблица 1.8

**Общая схема опытов**

Питательная среда		мл/л
Макроэлементы ½ по прописи MS	Микроэлементы в хелатной форме на основе HEDP	5
		2,5
		1,25
	Микроэлементы в хелатной форме на основе EDTA	5
		2,5
		1,25

При изучении ризогенеза *in vitro* косточкового подвоя ВЦ-13 было обнаружено, что максимальный эффект - 100% укоренение после 30 дней субкультивирования был достигнут при концентрации хелатных микроэлементов с фосфорорганическим лигандом (HEDP) в концентрации 5 мл/л. Результаты исследований представлены в таблице 1.8. Как видно из приведенных данных наилучший результат, 10-кратное повышение укореняемости по сравнению с контрольным вариантом было получено при использовании модифицированной питательной среды Мурасиге и Скуга (MS) хелатными микроэлементами на основе HEDP при концентрации 5 мл/л.

Уменьшение концентрации хелатных микроэлементов в среде показало линейное уменьшение процента укорененных растений-регенерантов, а также снижение морфометрических показателей образовавшейся корневой системы. Так среднее количество корней уменьшилось с 5-6 до 2-3 при концентрациях 5



и 2,5 мл/л соответственно, а средняя длина корней увеличилась с 0,5-0,6 до 1-2 см.

При модифицировании EDTA укоренения не происходило ни при одной концентрации. Модификация питательной среды фосфорсодержащими комплексонатами способствовала формированию 3 до 6 коротких крепких корней, удобных для отмывки от питательной среды для последующей высадки на этап адаптации к нестерильным условиям.

Таблица 1.9

**Результаты укоренения микрорастений клонового подвоя косточковых культур ВЦ-13 при модификации питательной среды Мурасиге и Скуга (MS) хелатными формами микроэлементов**

Питательная среда		мл/л	Укореняемость, %	Среднее число корней, шт.	Средняя длина корней, см
Макроэлементы ½ по прописи MS	Контроль микроэлементы MS	5	10	1-2	3-5
	Микроэлементы в хелатной форме на основе HEDP	5	100	5-6	0,5-0,6
		2,5	50	2-3	1-2
		1,25	0	-	-
	Микроэлементы в хелатной форме на основе EDTA	5	0	-	-
		2,5	0	-	-
		1,25	0	-	-

Проведенный повторный эксперимент по укореняемости микроросаженцев клонового подвоя ВЦ-13 с использованием модифицированной питательной среды Мурасиге и Скуга (MS) на основе HEDP в концентрации 5 мл/л на 120 эксплантах подтвердил эффективное действие данного приема. Укореняемость микрочеренков составила более 80%, среднее количество корней - 3-5 шт.

В целом ВЦ-13 является трудноукореняемым объектом в культуре *in vitro*, микрочеренки укореняются медленно и не одновременно, требуется применение высоких доз ауксинов (до 1 мг/л), что в свою очередь приводит к каллусообразованию и дальнейшей некротизации тканей микрорастений. В случае же укоренения единичных микрочеренков, как правило, они имеют 1-2 корня длиной до 3-5 см, которые легко травмируются и обламываются при

извлечении растений из питательной среды, что делает дальнейшую адаптацию к нестерильным условиям практически невыполнимой.

Таким образом, получен неожиданный результат показавший, что модификация питательной среды с минеральными макроэлементами по прописи MS хелатными микроэлементами с фосфорсодержащим лигандом привела к значительному повышению эффективности фазы ризогенеза клонового подвоя ВЦ-13. Данный факт однозначно связан с природой лиганда. Известно, что бисфосфонаты обладают самостоятельно биологической активностью. HEDP используется как медицинская субстанция, для неё характерна специфическая стереохимия и взаимное влияние фосфоновых фрагментов (Дятлова, 1984). В литературе приведены результаты многочисленных исследований относительно применения HEDP в медицине и других отраслях. Однако, сведений о роли HEDP в физиологии растений крайне мало. Ранее, в работах советских ученых, сообщалось о ретардантных свойствах HEDP, которые были обнаружены при выращивании ржи, ячменя, гречихи. Механизм ретардантного действия HEDP детально не изучался. Результаты данного эксперимента показывают, что в случае ризогенеза *in vitro* ВЦ-13 наблюдались эффекты, характерные именно для действия ретардантов: образование большего количества корней, уменьшение их длины и повышение их механической прочности. Необходимо отметить, что использование ретардантов в питательных средах практически не изученная тема, так как до конца не выяснен механизм их влияния.

Большое практическое значение имеют дальнейшие исследования в данном направлении с расширением возможных объектов исследований среди перспективных, имеющих важное экономическое и хозяйственное значение косточковых и других плодовых и ягодных культур. Подобным образом модифицированные питательные среды обеспечивают технологичность процесса клонального микроразмножения и повышение эффективности производства.