

**Титаренко Н.В.**

*аспірантка;*

**Теслюк Н.І.**

*кандидат сільськогосподарських наук, викладач,  
Одеський національний університет імені І.І. Мечникова*

## **ВИКОРИСТАННЯ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ ДЛЯ ПРОЦЕСУ ВВЕДЕННЯ РОСЛИН В КУЛЬТУРУ *IN VITRO***

Введення у культуру *in vitro* є першим та одним з найважливіших етапів мікроклонального розмноження рослин. Кінцевою метою цієї стадії є отримання вільного від інфекції експланта, що стабільно росте на живильному середовищі і придатний для наступних пасажів. Для успішного введення в культуру дуже важливо враховувати такі фактори: 1) правильний вибір рослини-донора та виділення експланта; 2) оптимальна пора року для введення; 3) підбір ефективної схеми стерилізації рослинного матеріалу; 4) відповідні умови для культивування [1].

Зазвичай, навіть за умов ідеального забезпечення вищезазначених потреб експланти часто гинуть протягом перших тижнів культивування. Однією із найпоширеніших причин низької приживлюваності ініціальних експлантів рослин є виділення у середовище фенолів пошкодженими частинами експланта та подальше їх окиснення. Даний процес викликає побуріння живильного середовища навколо експланта, блокує отримання живильних речовин з середовища та інактивує ріст рослини, що врешті доволі швидко призводить до загибелі.

Феноли – одні з найрозповсюдженіших вторинних метаболітів рослин. Основа їхньої хімічної будови – ароматичне кільце та гідроксильні групи. На сьогодні відомо більше 8000 фенольних сполук. При пошкодженні рослинних покривів, феноли окиснюються на світлі за участі ферменту поліфенолоксидази (ПФО), а також деяких інших з групи оксидаз. Продукти цього окиснення є токсичними інгібіторами клітинного росту, подавляючи активність життєво важливих ензимів.

Оскільки при підготовці експланта до введення у культуру дослідник у абсолютній більшості випадків вимушений пошкодити тканини рослини, фенольне окиснення стає серйозною перепоною для введення

рослин у культуру *in vitro*. Особливо це стосується багаторічних культур, що продукують феноли найактивніше. Відомо, що багаті на фенольні сполуки саме деревні види рослин [5].

Для подолання цієї проблеми сьогодні використовують різні прийоми: попередня обробка експлантів антиоксидантами, включення антиоксидантів та сорбентів у середовище, інкубація у темряві, часті пересадки на свіже середовище і т. д. Ефект від цих маніпуляцій є різним у залежності від виду рослин та типу експланта.

Одним з найпростіших та економічно вигідних методів пом'якшення оксидативного стресу є використання аскорбінової кислоти у якості антиоксиданта. Ця сполука не взаємодіє з ПФО, але зменшує кількість субстрату для окиснення, що дозволяє зменшити рівень побуріння середовища та попередити гибель мікроклонів. Аскорбінову кислоту у різних концентраціях використовують як для замочування експлантів перед введенням у культуру, так і шляхом додавання безпосередньо у середовище. Наприклад, замочування експлантів Стретліції королівської *Strelitzia reginae* у розчині аскорбінової та лимонної кислот протягом 12 годин незначно зменшило окиснення фенолів у середовищі, а витримка протягом 24 годин майже повністю позбавила цієї проблеми [9]. У іншому дослідженні спостерігався значний позитивний вплив після витримки експлантів протягом години у суміші 100 мг/л аскорбата та 1500 мг/л цитрата [8].

Але частіше аскорбінова кислота використовується для додавання у живильне середовище. У багатьох експериментах на різних рослинах ця стратегія показала свою ефективність. Проте, на даний момент існує певна невідповідність у дослідженнях на цю тему між собою, оскільки ефективні концентрації доданої аскорбінової кислоти дуже сильно відрізняються. Наприклад, у дослідженні, що проводили у Казахстані, ефективною виявилась мінімальна концентрація 1 мг/л [2], китайські дослідники визначили найбільш ефективною концентрацію 15 мг/л [4], а вчені з Танзанії показали найбільший позитивний вплив концентрації 200 мг/л [7]. Звісно, усі дослідження проводилися на різних модельних рослинах, але така велика різниця беззаперечно викликає науковий інтерес до цього питання.

У нашому дослідженні ми використовували у якості модельної рослини Ожину звичайну *Rubus caesius* L. сорту Торнфрі. Ожина – ягідна культура, що стрімко набирає популярність в Україні в останні роки завдяки високим смаковим властивостям та хворобостійкості.

Незважаючи на те, що Ожина звичайна добре розмножується вегетативним способом, такий метод (особливо, для безшипних сортів та гібридів) має низький коефіцієнт розмноження та не дозволяє звільнити рослини від інфекцій. Саме тому актуальною темою є удосконалення методики мікроклонального розмноження цього виду рослин, а, особливо, безшипних сортів. Складності з прискореним розмноженням ожини виникають вже на етапі введення в культуру *in vitro*, оскільки процент приживлюваності експлантів дуже малий через окиснення фенолів. Враховуючи даний факт, дослідження використання аскорбінової кислоти на етапі введення в культуру є для ожини дуже доцільними.

Мета роботи – визначити вплив невеликих концентрацій аскорбінової кислоти (до 10 мг/л) на процес введення рослин у культуру *in vitro*.

Вихідний матеріал Ожини звичайної відбирали з кущів-донорів, які вирощуються у відкритому ґрунті. Підготовлений рослинний матеріал стерилізували за визначеною ефективною схемою [3], після чого експланти висаджували у ємності з поживним середовищем Мурасіге-Скуга (МС). Середовище МС готували за стандартною методикою [6], але з додаванням різних концентрацій аскорбінової кислоти після автоклавування. Було підготовлено варіанти середовища з 1, 5, і 10 мг/л, та контрольний варіант без аскорбінової кислоти у складі. Під час експерименту висаджували по 30 експлантів на кожен варіант середовища – загалом, було проаналізовано 120 мікроклонів ожини. Через 30 діб після моменту введення результати оцінювали за трьома показниками. Приживлюваність враховували у процентному співвідношенні кількості живих експлантів до всіх висаджених. Проліферацію бруньок оцінювали як порядковий номер доби від моменту висадки на середовище, у який вперше було зафіксовано ріст нових вегетативних органів рослини з меристем на експланті (чим раніше це відбувається, тим краще для процесу подальшого мікроклонального розмноження). І останній показник – кількість утворених пагонів, тобто кількість меристем, що відтворили нові пагони на експланті за час культивування (більша кількість утворених пагонів дозволяє підвищити коефіцієнт розмноження). Результати дослідження представлені у таблиці.

Таблиця 1

**Приживлюваність, проліферація та кількість  
утворених пагонів ожини на середовищі МС  
з різними концентраціями аскорбінової кислоти**

<b>Концентрація аскорбінової кислоти</b>	<b>Приживлюваність, %</b>	<b>Проліферація бруньок, доба від початку культивування</b>	<b>Кількість утворених пагонів ожини, шт.</b>
0 мг/л (контроль)	26,67 ± 16,70	7,47 ± 0,26	1,20 ± 0,08
1 мг/л	50,00 ± 18,89	7,20 ± 0,18	1,43 ± 0,18
5 мг/л	56,67 ± 18,72	<b>6,73 ± 0,18*</b>	<b>1,87 ± 0,12*</b>
10 мг/л	<b>66,67 ± 17,80*</b>	<b>6,30 ± 0,18*</b>	<b>2,20 ± 0,18*</b>

\* статистично достовірні у порівнянні з контролем показники при  $P=0,05$

Як показано у таблиці, концентрація аскорбінової кислоти 1 мг/л середовища не показала статистично значущих змін у порівнянні з контролем. Але на середовищі МС з концентрацією 5 мг/л проліферація відбувалася, в середньому, на 0,74 дні швидше, та формувалося на 0,67 шт. більше пагонів. Проте, за показником приживлюваності дані для 5 мг/л аскорбінової кислоти у середовищі виявилися недостовірними. З використанням концентрації 10 мг/л усі аналізовані показники були статистично значущими: в середньому, приживлюваність підвищилася на 40,00 %, кількість пагонів – на 1,00 шт., а проліферація прискорилося на 1,17 дня.

Таким чином, концентрація аскорбінової кислоти 10 мг/л у середовищі МС виявила найбільший позитивний вплив на введення Ожини звичайної *Rubus caesius L.* сорту Торнфрі в культуру *in vitro*.

### Список використаних джерел:

1. Ишмуратова М.М., Барышникова Н.И., Газиева Э.М. Клональное микроразмножение *in vitro*: выбор эксплантов (на примере видов рода *Valeriana*) // Вестник ПУ. – 2017. – № 4. – С. 442–449.
2. Оразбаева Г.К., Майсупова И.Л., Хасанов В.Т., Швидченко В.К. Клональное размножение растений красной малины (*Rubusidaeus L.*) *in vitro* // Вестник науки КазАТУ им. С. Сейфуллина. – 2012. – № 1(72). – С. 140–149.
3. Титаренко Н.В., Теслюк Н.І. Удосконалення процесів мікроклонального розмноження Ожини звичайної *Rubus caesius L.* сорту Торнфрі // Мікробіологія та біотехнологія. – 2020. – № 2. – С. 72–84.
4. Irshad M., Rizwan H.M., Debnath B., Anwar M., Li M., Liu S., He B., Qiu D. Ascorbic Acid Controls Lethal Browning and Pluronic F-68 Promotes High-frequency

Multiple Shoot Regeneration from Cotyledonary Node Explant of Okra (*Abelmoschus esculentus* L.) // Hortscience. – 2018. – № 53(2). – P. 183–190.

5. Ishtiaq A., Tanveer H., Irfan A., Nafees M., Rafay M., Iqbal M. Lethal Effects of Secondary Metabolites on Plant Tissue Culture // American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. – 2013. – № 13(4). – P. 539–547.

6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – № 15. – P. 473–497.

7. Ndakidemi C.F., Mneney E., Ndakidemi P.A. Effects of Ascorbic Acid in Controlling Lethal Browning in in Vitro Culture of *Brahylaena huillensis* Using Nodal Segments // American Journal of Plant Sciences. – 2014. – № 5. – P. 187–191.

8. Wu H.C., du Toit E.S. Reducing oxidative browning during in vitro establishment of *Protea cynaroides* // Scientia Horticulturae. – 2004. – № 100. – P. 355–358.

9. Ziv M., Halevy A. Control of oxidative browning and in vitro propagation of *Strelitzia reginae* // Ait. Hort. Sci. – 1983. – № 18. – P. 434–436.