

СТАТЬИ И СООБЩЕНИЯ

БИОЛОГИЯ И ЭКОЛОГИЯ РЕСУРСНЫХ ВИДОВ

ОСОБЕННОСТИ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ И ДИНАМИКА
МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НЕКОТОРЫХ
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДОВ *RUBUS* И *FRAGARIA* (*ROSACEAE*)
ПРИ ХРАНЕНИИ *IN VITRO*

© И. С. Саматова,^{*} ** С. Е. Дунаева,^{*} Е. И. Шарова,^{**}
С. М. Щупарев,^{**} С. С. Медведев,^{**} Т. А. Гавриленко^{*}

Одним из перспективных способов сохранения коллекций растений является метод хранения *in vitro*, преимущества которого заключаются в компактности коллекций, возможности сохранять их в контролируемых условиях среды, их устойчивости к инфекциям, а также возможности массового и ускоренного размножения независимо от времени года (Бутенко, 1964; Попов, 1979; Reed, 1996; Лутова, 1999; Гавриленко и др., 2007; Дунаева, Гавриленко, 2007). В коллекциях *in vitro* в генетических банках разных стран хранится не более 10 % образцов дикорастущих растений (Гавриленко и др., 2007). Это связано с тем, что методы хранения *in vitro* разработаны лишь для ограниченного числа видов, фактически отсутствуют методы мониторинга жизнеспособности растений, полученных из меристем или других типов эксплантов на питательной среде в стерильных условиях *in vitro* (микрорастений), а также не определены сроки беспересадочного их хранения.

Существует несколько способов хранения растений *in vitro*, самым распространенным из которых является депонирование пробирочных образцов в условиях низких положительных температур (Олешко, 1985; Туровская, 1988; Дорошенко, Кострикин, 1989; Reed, 1996; Высоцкая, 1994; Дунаева, Гавриленко, 2007). С другой стороны, условия длительного хранения *in vitro* при низких положительных температурах могут воздействовать на растения как стрессовый фактор.

Следует отметить, что воздействия, которые испытывают микрорастения при выращивании *in vitro* и хранении при низких положительных температурах, могут вызвать окислительный стресс. Известно, что любые стрессовые воздействия ведут к образованию и накоплению в больших количествах активных форм кислорода, а также к изменению активности ферментов, участвующих в их синтезе и разрушении (Prasad et al., 1995; Pastory, Foyer, 2002). В частности, низкие положительные температуры вызывают в организме ответные реакции, при которых образуется в больших количествах пероксид водорода (Agnao et al., 1990; Baynton et al., 1994). Пероксид водорода играет важную роль в процессах сигнальной трансдукции и наряду с другими активными формами кислорода рассматривается в качестве одного из

первичных индукторов ответных реакции растительной клетки на стрессовое воздействие (Wojtaszek, 1997). В утилизации пероксида водорода важную роль играют пероксидазы. Пероксидазам также принадлежит важное место в окислительном метаболизме клетки, так как они связаны с системой защитных реакций растительного организма и являются индикаторами стрессовых воздействий. Увеличение их активности наряду с различными стрессовыми факторами наблюдается и в условиях низких значений температур (Савич, 1989). К стрессовым воздействиям также очень чувствителен уровень аскорбиновой кислоты в клетках растений (Millar et al., 2003). Выявлено, что виды растений, содержащие большое количество аскорбиновой кислоты, характеризуются повышенной морозо- и газоустойчивостью (Pallanca, Smirnoff, 2000). Также известно, что накопление пролина является одной из наиболее быстрых ответных реакций клетки в условиях стрессового воздействия (Гёринг, 1981). Поэтому для проведения анализа повреждающего эффекта условий длительного хранения возникает необходимость выявить динамику активности пероксидаз, содержания пероксида водорода, содержания аскорбата и пролина в тканях микрорастений при их выращивании и хранении *in vitro*.

Целью настоящей работы являлось изучение способности к микроразмножению и длительному хранению в условиях *in vitro* некоторых видов рода *Rubus* L. и *Fragaria ananassa* Duch., а также анализ динамики их морфофизиологических и биохимических показателей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материал для исследований получен из *in vitro* коллекции Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства им. Н. И. Вавилова. Объектами исследования были 5 образцов ежевик — *Rubus argutus* Link И-576516 (Whitford Thornless), *Rubus ursinus* Cham. et Schltld. И-576483 (Bodega Bay) и межвидовые гибриды ежевик: И-576516 (Merton Thornless), И-576510 (Silvan) и (Агавам); 5 образцов малины обыкновенной *Rubus idaeus* L.: И-576501 (Mandarin), И-576507 (Rubin Bulgarski), И-588472 (Canby), К-8257 (Ранняя Сладкая) и К-8283 (Красноплодный Сеянец); 5 образцов земляники садовой *Fragaria ananassa* Duch.: Red Gountlent, Polka, Venta, Holiday и Боровицкая.

В работе использовали общепринятые методы культивирования *in vitro* изолированных органов растений (Бутенко, 1964).

Микроклональное размножение проводили путем снятия апикального доминирования и активации пазушных почек при добавлении в питательную среду цитокинина (6-бензиламинопурина, 1 мг/л) на среде Мурасиге—Скуга (Murasige, Skoog, 1962).

Исходным материалом для микроразмножения служили микрочеренки, содержавшие небольшую часть стебля и пазушную почку, без листа. Коэффициент микроразмножения каждого образца определяли как среднее количество хорошо развитых побегов, полученных при клональном размножении от одного экспланта. Коэффициенты микроразмножения исследуемых образцов ежевик, малины обыкновенной и земляники садовой были рассчитаны в пяти независимых повторностях опытов.

Сформировавшиеся микропобеги отделяли и пересаживали на питательную среду Мурасиге и Скуга с половинным составом макро- и микроэлементов, дополненную ауксином (индолилуксусная кислота, 0.4 мг/л) для их

дальнейшего роста и укоренения. Через 3—4 недели микрорастения достигали высоты 30—40 мм, затем их пересаживали в стеклянные пробирки, содержавшие по 10 фл питательной среды Мурасиге и Скуга с половинным составом макро- и микроэлементов без фитогормонов. На всех этапах работы микрорастения культивировали при фотопериоде длинного дня (16 ч освещения и 8 ч темноты, интенсивность освещения 2000 лк) и температуре 22 °С на свету и 18 °С в темноте.

Для длительного беспересадочного хранения отбирали выровненные микрорастения каждого образца с хорошо сформированной корневой системой на среде Мурасиге и Скуга с половинным составом макро- и микроэлементов в количестве 40—45 микрорастений каждого образца на 1 повторность (трехкратная повторность опыта). Микрорастения в пробирках со средой Мурасиге и Скуга с половинным составом макро- и микроэлементов переносили в камеры с контролируемыми условиями хранения (температура $\pm 4 \pm 1^\circ\text{C}$, фотопериод короткого дня: 16 ч темноты и 8 ч освещения, интенсивность освещения 500—700 лк).

Динамику изменения морфологических параметров пробирочных растений разных образцов ежевик, малины обыкновенной и земляники садовой в процессе беспересадочного хранения *in vitro* анализировали через каждые 4 мес в течение 1 года. Оценивали следующие признаки: высота растений, количество зеленых листьев, количество пожелтевших листьев и количество корней.

При изучении динамики биохимических показателей контролем служили исходные микрорастения исследованных образцов ежевик, выращенные в условиях *in vitro* при +22 °С и фотопериоде короткого дня, не заложенные на низкотемпературное хранение. Сравнение биохимических показателей проводили у контрольных растений и у микрорастений пяти образцов ежевик, хранящихся при температуре +4 °С. В каждом варианте (контроль и микрорастения после 4, 8 и 12 мес хранения) листья растений взвешивали и фиксировали в жидком азоте; замороженную листовую ткань использовали для анализов. У контрольных микрорастений и в вариантах 4, 8 и 12 мес хранения анализировали следующие биохимические показатели: содержание свободного пролина, пероксида водорода, аскорбиновой кислоты, а также активность легкорастворимых и ионосвязанных с клеточными стенками пероксидаз.

Для определения содержания свободного пролина использовали модифицированную методику С. Л. Бейтса (Vates et al., 1973). Метод основан на взаимодействии свободного пролина с нингидриновым реактивом, образующим розово-красную окраску. Навеску листовой ткани (150—300 мг) гомогенизировали в 10 мл 3%-ного раствора сульфосалициловой кислоты. Гомогенат центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин. К 2 мл супернатанта в реакционной пробирке добавляли 2 мл нингидринового реактива и 2 мл ледяной уксусной кислоты. Пробирки закрывали пробкой с обратным холодильником и выдерживали 1 ч на кипящей водяной бане. Затем пробы охлаждали до комнатной температуры, прибавляли к ним по 4 мл толуола и тщательно перемешивали встряхиванием. Верхний слой толуола, содержащий окрашенный комплекс пролин—нингидрин, отделяли от водной фазы и колориметрировали на ФЭК-56-М при 490 нм в 3-миллиметровых кюветах. Содержание свободного пролина определяли по калибровочной кривой, построенной с использованием растворов пролина в диапазоне концентраций от 50 до 150 мкг/мл, и выражали в микрограммах на 1 г сырой массы.

Содержание восстановленной аскорбиновой кислоты определяли методом, основанным на взаимодействии окисленной аскорбиновой кислоты с 2,4-динитрофенилгидразином (Roe, Khuether, 1948). Замороженные листья (10–30 мг) растирали с кварцевым песком в 2 мл 5%-ной метафосфорной кислоты, затем центрифугировали 15 мин при 7000 g. Надосадочную жидкость отмеривали по 0.9 мл в две пробирки и в одну из них прибавляли по каплям 0.001 н раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола (краска Тильманса) до появления слабо-розового окрашивания, устойчивого в течение 30 с. В обе пробирки добавляли по 0.3 мл 2%-ного раствора 2,4-динитрофенилгидразина в 9 н H_2SO_4 , содержащего 0.25 % тиомочевины. Затем доводили объем до 1.5 мл бидистиллированной водой, кипятили 10 мин с обратным холодильником и охлаждали в ледяной бане. В каждую пробирку добавляли порциями 1.5 мл 85%-ного раствора H_2SO_4 , охлаждая в ледяной бане после каждой порции. Окрашенные растворы фотометрировали на спектрофотометре на СФ-46 (ЛОМО) через 1 ч при 520 нм. Концентрацию восстановленной аскорбиновой кислоты определяли по разности экстинкции двух проб (\pm 2,6-дихлорфенолиндофенола) с использованием калибровочной кривой, построенной для растворов с концентрацией аскорбиновой кислоты в диапазоне от 5 до 20 мг/л.

Для определения содержания пероксида водорода замороженные листья (10–30 мг) растирали с кварцевым песком в 1 мл 0.4 М $HClO_4$ с добавлением 10–20 мг сорбента нерастворимых фенольных соединений поливинилполипирролидона. Экстракт отделяли центрифугированием (15 мин при 2000 g) и нейтрализовали добавлением 0.32 мл 1 н КОН. Квоту экстракта (0.5 мл) наносили на колонку объемом 4 мл с анионообменной смолой (Dowex Cl^- , 1×2 , 50–100 mesh) и элюировали бидистиллированной водой. Спустив первые 2 мл элюата, собирали четыре порции по 1.5 мл, в которых определяли содержание H_2O_2 по методу FOX (Gay, Gebicki, 2000; Jiang et al., 1990). Этот метод основан на изменении окраски ксиленового оранжевого при окислении пероксидом водорода Fe^{2+} в Fe^{3+} в растворе разбавленной серной кислоты. С Fe^{3+} связывается краситель ксиленовый оранжевый, образуя комплекс с максимумом поглощения при 560 нм. К пробе (1.5 мл) добавляли равный объем FOX-реагента. Интенсивность окрашивания измеряли через 45 мин при 560 нм на СФ-46 (ЛОМО). Концентрацию H_2O_2 в пробе рассчитывали по калибровочной кривой, построенной с использованием растворов H_2O_2 (10–40 мкМ) в хлорной кислоте, подверженных такой же, как проба, процедуре очистки на анионообменной колонке.

Активность легкорастворимых и ионосвязанных с клеточными стенками пероксидаз определяли по скорости окисления гваякола по стандартной методике (Lin, Као, 1999). Всю процедуру экстракции пероксидаз проводили при 0–4 °С. Замороженные в жидком азоте листья (10–30 мг) растирали с кварцевым песком в 1.5 мл К-фосфат-цитратного буфера (10 мМ, рН 6.0) с добавлением 10–20 мг сорбента фенольных соединений поливинилполипирролидона. Экстракт, содержащий растворимые в основном вокуолярные пероксидазы, отделяли центрифугированием (10 мин 2000 g) и очищали от мешающих определению пероксидазной активности низкомолекулярных соединений (смола, аскорбиновой кислоты) пропусканием через колонку сефадекса G-25. Для этого 1 мл экстракта наносили на колонку объемом 4 мл и проводили элюцию экстрагирующим буфером. Пероксидазы собирали во 2-м и 3-м миллилитрах элюата.

Для выделения ионосвязанных с клеточными стенками пероксидаз осадок промывали в 5 мл экстрагирующего буфера, содержащего 0.2 % детер-

гента тритона X-100, очищая клеточные стенки от мембранных компонентов. Супернатант отделяли центрифугированием (10 мин 2000 g) и отбрасывали. Затем осадок промывали в 5 мл экстрагирующего буфера при тех же условиях центрифугирования. Ионсвязанные с клеточными стенками пероксидазы экстрагировали из промытого осадка посредством 30-минутной инкубации в 1 мл 1 М NaCl, экстракт отделяли центрифугированием (10 мин 4000 g).

Активность пероксидаз определяли в реакционной смеси объемом 3 мл, содержащей 100 мМ ацетатного буфера pH 5, 20 мМ гваякола и 4 мМ пероксида водорода. Реакцию проводили при комнатной температуре. Пероксидазную активность оценивали по скорости образования продукта реакции тетрагваякола ($\epsilon_{470\text{nm}} = 0.0266 \text{ мкМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) на линейном участке реакционной кривой (2-я мин реакции) и относили к 1 г сырой массы, измеряя каждые 0.5 мин интенсивность окраски на СФ-46 (ЛОМО).

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами (Рокицкий, 1987). Для морфометрических измерений было использовано 40–45 растений каждого образца из трех независимых повторностей. Биохимические анализы проводили четыре раза для каждого образца ежевики. Полученные результаты рассчитывали на единицу сырой массы растений. На рисунках и в таблицах приведены средние показатели по пяти образцам каждого вида и стандартные ошибки средних.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Пробирочные растения хранятся в цикле последовательных этапов: клонального микроразмножения и беспересадочного *in vitro* хранения в условиях минимального роста микрорастений. На первом этапе исследований была проведена оценка образцов разных видов по способности к клональному микроразмножению. У изученных образцов земляники садовой значения коэффициентов микроразмножения почти вдвое превышали соответствующие показатели образцов ежевик и малины обыкновенной (табл. 1).

На следующем этапе работы анализировали морфометрические показатели полученных микрорастений и их выживаемость в процессе длительного хранения при +4 °С. После года хранения *in vitro* в этих условиях выживаемость в среднем по образцам составляла: $95.5 \pm 1.5 \%$ у земляники садовой, 97.6 ± 1.2 у ежевики и $82.5 \pm 3.8 \%$ у малины обыкновенной. Таким образом, в течение года беспересадочного хранения при температуре +4 °С большая часть микрорастений у различных образцов ягодных культур остается жизнеспособной (табл. 2).

ТАБЛИЦА 1

Эффективность размножения некоторых видов рода *Rubus* и *Fragaria ananassa* в культуре *in vitro*

Вид	Количество посаженных микрочеренков	Коэффициент микроразмножения
<i>Rubus argutus</i> , <i>R. ursinus</i> и гибриды	1219	2.8 ± 0.2
<i>Rubus idaeus</i>	1211	2.4 ± 0.2
<i>Fragaria ananassa</i>	1041	5.0 ± 0.7

ТАБЛИЦА 2

Выживаемость некоторых видов рода *Rubus* и *Fragaria ananassa* (%) в процессе длительного хранения *in vitro* при +4 °С (n = 100)

Вид	Месяц хранения			
	4-й	8-й	12-й	20-й
<i>Rubus argutus</i> , <i>R. ursinus</i> и гибриды	100	99	98	33
<i>Rubus idaeus</i>	87	86	83	10
<i>Fragaria ananassa</i>	100	100	96	52

Через 20 мес хранения при +4 °С у всех изученных образцов земляники можно было отобрать жизнеспособные растения; количество выживших микрорастений в среднем составило 52.0 ± 0.6 %. К этому сроку хранения погибли все микрорастения трех образцов малины обыкновенной и ежевик, выживаемость оставшихся образцов значительно снизилась и составила в среднем 9.7 ± 1.4 % для малины обыкновенной и 33.3 ± 1.8 % для ежевик (табл. 2).

Оценка динамики роста микрорастений при пониженной температуре +4 °С показала, что наибольшей интенсивностью роста в этих условиях характеризовались растения земляники садовой (рис. 1).

В течение длительного хранения микрорастений происходят два процесса: формирование новых листьев и пожелтение сформированных листьев за счет разрушения фотосинтетического аппарата (в первую очередь пигментов), что, вероятно, связано с включением программы старения и гибели микрорастений. Общее количество листьев (в среднем на микрорастение) увеличивается более чем в 2 раза в течение года хранения (рис. 2). При этом динамика формирования зеленых листьев у 3 видов существенно не различалась. Однако интенсивность пожелтения листьев была наиболее низкой у образцов земляники садовой и вдвое выше — у изученных образцов малины обыкновенной и ежевик.

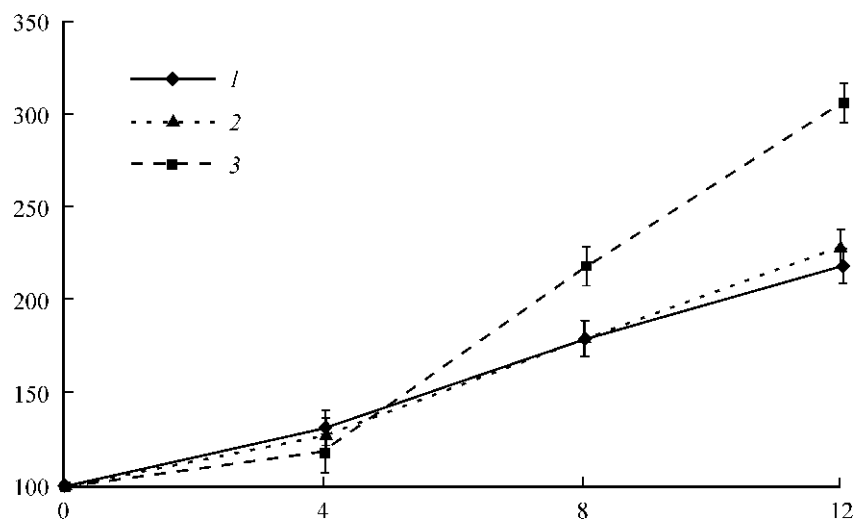


Рис. 1. Динамика роста микрорастений *Rubus argutus*, *R. ursinus* и гибридов (1), *Rubus idaeus* (2) и *Fragaria ananassa* (3) в процессе хранения при +4 °С.

По оси ординат — высота растений, % от исходной; по оси абсцисс — время, мес.

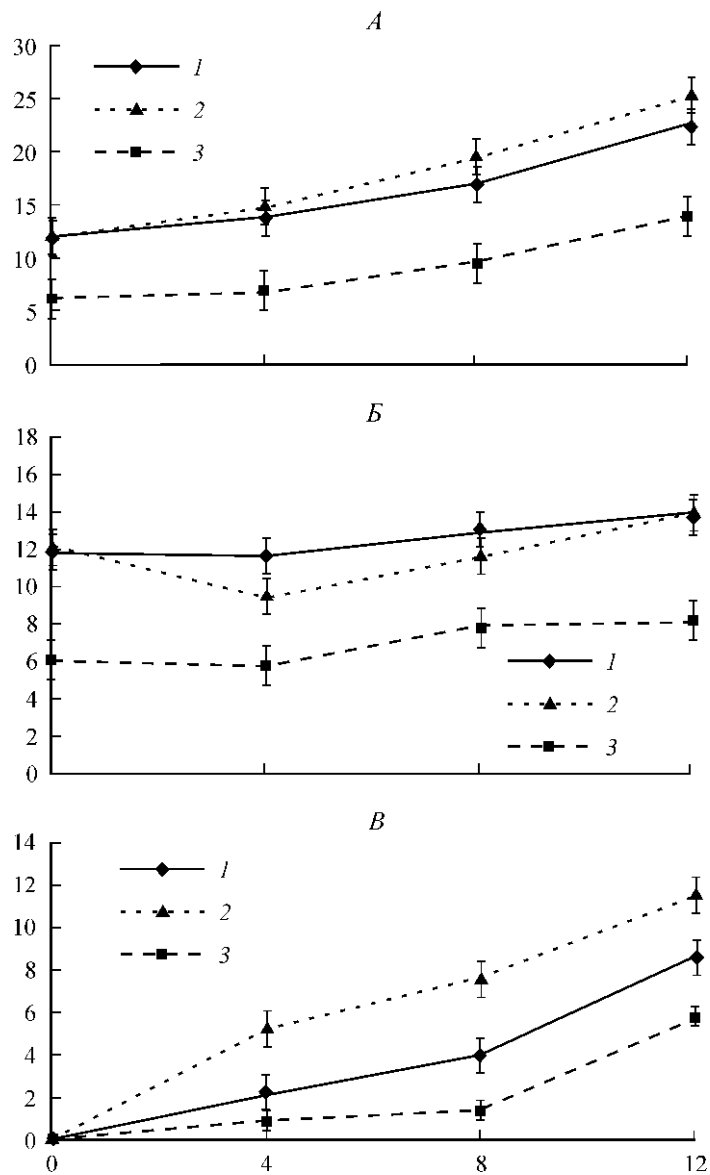


Рис. 2. Изменение общего количества листьев (А), количества зеленых (Б) и желтых (В) листьев микрорастений *Rubus argutus*, *R. ursinus* и гибридов (1), *Rubus idaeus* (2) и *Fragaria ananassa* (3) в процессе хранения при +4 °С.

По оси ординат — среднее количество листьев на 1 растение, шт.; по оси абсцисс — время, мес.

Различия между образцами ежевик, малины обыкновенной и земляники садовой по уровню выживаемости в условиях длительного *in vitro* хранения и по значениям морфологических характеристик можно объяснить биологическими особенностями видов. Так, земляника садовая характеризуется сравнительной зимостойкостью, у нее не наблюдается осеннего листопада и листья опадают не одновременно. В условиях длительного хранения *in vitro* при +4 °С микрорастения земляники садовой были наиболее жизнеспособ-

ны и характеризовались также наиболее высокими показателями интенсивности роста, формирования зеленых листьев и наименьшим числом пожелтевших листьев. Менее зимостойкие ежевики и малина обыкновенная представлены листопадными растениями, и в условиях снижения температуры и уменьшения светового дня у них запускается запрограммированное естественное старение и гибель листьев, что и приводит к более интенсивному пожелтению, высушиванию и опаданию последних.

Для того чтобы определить, влияют ли условия хранения на растения как стрессовый фактор, было проанализировано содержание свободного пролина в процессе хранения растений ежевик при температуре +4 °С. Показано, что на начальных этапах хранения *in vitro* ежевик содержание пролина повышается от 0.9 до 1.7 мг/(г сырой массы), а затем снижается до 0.6 мг/(г сырой массы) (рис. 3, А).

Известно, что содержание пролина в растениях резко повышается под действием стрессовых факторов (Paleg, Aspinall, 1981; Ivanova, 1982). Повышение содержания свободного пролина к 4-му мес хранения, вероятно, является результатом ответной реакции растений ежевик на низкотемпературный стресс. Снижение же содержания пролина после 4 мес хранения,

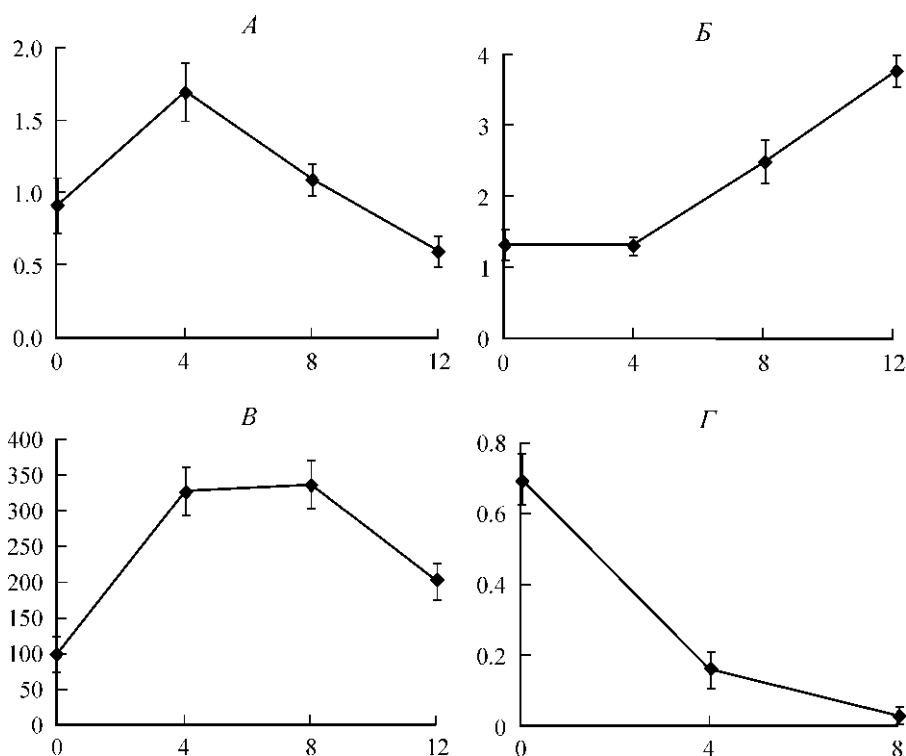


Рис. 3. Изменение биохимических показателей микрорастений *Rubus argutus*, *R. ursinus* и гибридов в процессе хранения при +4 °С.

А — динамика содержания свободного пролина; Б — динамика содержания пероксида водорода; В — динамика активности пероксидаз (суммарная активность легкорастворимых и ионсвязанных пероксидаз); Г — Динамика содержания восстановленной аскорбиновой кислоты. По оси ординат: А — концентрация пролина, мг/г сырой массы; Б — концентрация пероксида водорода, мкмоль/г сырой массы; В — удельная активность пероксидаз, % от исходной; Г — концентрация аскорбиновой кислоты, мг/г сырой массы. По оси абсцисс — время, мес.

возможно, связано с тем, что при длительном воздействии низких положительных температур растения ежевики, по-видимому, приобретают устойчивость к этому стрессовому воздействию.

Хорошо известно, что большинство стрессовых воздействий у растений сопровождается генерацией активных форм кислорода (Halliwell, 2006). В нашей работе было установлено, что условия хранения *in vitro* при низких положительных температурах способствуют изменению в метаболизме таких показателей, как уровень пероксида водорода, аскорбиновой кислоты и активности пероксидаз в растениях ежевики. Так, в течение первых 4 мес хранения *in vitro* уровень пероксида водорода в листьях не изменяется и составляет 1.3 ± 0.2 мкмоль/(г сырой массы) (рис. 3, *Б*). С увеличением срока хранения *in vitro* происходило постепенное повышение содержания пероксида водорода до 3.8 ± 0.3 мкмоль/(г сырой массы) (через 12 мес хранения).

Известно, что H_2O_2 накапливается при стрессовых условиях, в частности при воздействии низких положительных температур (Arao et al., 1990; Vaynton et al., 1994), благодаря спонтанным превращениям как $O_2^{\cdot-}$, так и HO_2^{\cdot} . Пероксидазы, которые являются очень чувствительными индикаторами стрессовых воздействий, способны вырабатывать H_2O_2 путем окисления различных субстратов молекулярным кислородом (Smith et al., 1982; Otter, Polle, 1997). В то же время пероксидазы могут окислять многие вещества, используя в качестве окислителя пероксид водорода. Таким образом, H_2O_2 может утилизироваться пероксидазами (Fujiyama et al., 1995).

Для выяснения роли пероксидаз в адаптивном ответе растений к возможному стрессовому воздействию в условиях хранения была проанализирована динамика их активности (суммарная активность легкорастворимых и ионосвязанных пероксидаз) в листьях ежевики в процессе низкотемпературного хранения в течение 12 мес. В первые 8 мес хранения активность пероксидаз возрастала в среднем до 50.9 ± 10.3 мкмоль/(мин·г сырой массы) (т. е. до 339 ± 32 % от исходного уровня) (рис. 3, *В*), что, по-видимому, и является причиной поддержания низкого уровня пероксида водорода в тканях листьев ежевики.

С увеличением сроков хранения до 12 мес происходило снижение активности пероксидаз до 30 мкмоль/(мин·г сырой массы) (т. е. до 204 ± 27 % от исходного уровня), в то время как содержание пероксида водорода при этом постепенно повышалось. Вероятно, в начальный период хранения высокая активность пероксидаз способствовала поддержанию уровня пероксида водорода на низком уровне. Известно, что одной из причин торможения роста, которое наблюдается с увеличением возраста растений, является повышение уровня пероксида водорода (Cogras, 2001). Не исключено, что повышенный уровень H_2O_2 является также одной из наиболее важных причин старения и гибели микрорастений в условиях длительного низкотемпературного хранения.

Таким образом, изменение уровня пероксида водорода в растительных тканях может быть использовано как параметр (экспресс-тест), позволяющий оценить жизнеспособность микрорастений в условиях длительного хранения *in vitro*.

Еще одним очень важным компонентом в ответных реакциях растений на различные стрессовые факторы является аскорбиновая кислота (Smirnoff, 2000). Следует отметить, что содержание аскорбиновой кислоты в листьях ежевики к концу 8 мес хранения резко снижается: от 0.70 ± 0.03 до 0.03 ± 0.01 мг/г сырой массы (рис. 3, *Л*).

Падение уровня аскорбиновой кислоты в листьях микрорастений ежевики при хранении в условиях низких температур, возможно, связано с повышением активности пероксидаз. Еще одной возможной причиной снижения содержания восстановленной аскорбиновой кислоты в листьях ежевики при длительном хранении может быть ее окисление в дегидроаскорбиновую кислоту (Chen et al., 2003).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведения морфометрических и биохимических исследований на микрорастениях ежевик *Rubus argutus* Link, *R. ursinus* Cham. et Schldt. и некоторых межвидовых гибридов, малины обыкновенной *Rubus idaeus* L. и земляники садовой *Fragaria ananassa* Duch. установлено, что среди исследуемых культур наибольшим коэффициентом микроразмножения и выживаемостью в условиях длительного хранения *in vitro* при +4 °С обладают растения земляники садовой. Установлено, что хранение микрорастений ежевик в условиях низких положительных температур является стрессовой ситуацией, о чем свидетельствует повышение образования пролина и снижение содержания аскорбиновой кислоты в растениях.

Для оценки жизнеспособности микрорастений в условиях длительного хранения *in vitro* в качестве экспресс-теста предлагается использовать изменение уровня пероксида водорода. Так, на первых этапах низкотемпературного пробирочного хранения микрорастений ежевики происходит повышение активности пероксидаз, что способствует поддержанию содержания H₂O₂ в течение 4 мес на исходном уровне. С увеличением сроков хранения отмечено снижение активности пероксидаз; в результате пероксид водорода, накапливающийся в условиях низкотемпературного пробирочного хранения, не утилизируется и начинает повреждать растения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 05-04-49619) и Bioversity International / Vavilov Genebank / LoA (грант № 07/053)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М., 1964.
- Высоцкая О. Н. Длительное хранение *in vitro* коллекции растений земляники // Физиология растений. 1994. Т. 41. С. 935–941.
- Гавриленко Т. А., Дунаева С. Е., Трускинов Э. В., Антонова О. Ю., Пендинен Г. И., Лупышева Ю. В., Роговая В. В., Швачко Н. А. Стратегия долгосрочного хранения генофонда вегетативно размножаемых сельскохозяйственных растений в контролируемых условиях среды // Тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции. 2007. Т. 164. С. 273–285.
- Гёринг Х. Реакция растений на влияние вредных физиологических и химических факторов окружающей среды // Материалы IX конгр. эукарпия. 1981. С. 23–35.
- Дорошенко Н. П., Кострикин И. А. Микрклональное размножение столового винограда сорта Агат Донской // Садоводство и виноградарство. 1989. № 3. С. 37–40.

- Дунаева С. Е., Гавриленко Т. А. Коллекции плодовых и ягодных культур *in vitro*: стратегия создания и хранения // Тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции. 2007. Т. 161. С. 10–19.
- Лутова Л. А. Биотехнология. СПб., 1999.
- Олешко Е. В. Особенности клонального микроразмножения подвоев и сортов вишни. М., 1985.
- Попов Ю. Г. Оздоровление и размножение плодовых и ягодных растений методом культуры меристематических верхушек. М., 1979.
- Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. Минск, 1987.
- Савич И. М. Peroxidазы — стрессовые белки растений // Успехи соврем. биологии. 1989. Т. 107. С. 406–417.
- Туровская Н. И. Размножение плодовых и ягодных культур зелеными черенками. Мичуринск, 1988.
- Arnao M. B., Acosta M., del Rio J. A., Garcia-Canovas F. Inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide and its protection by a reductant agent // Biochem. Biophys. Acta. 1990. Vol. 1038. P. 85–89.
- Baynton K. J., Bewtra J. K., Biswas N., Taylor K. E. Inactivation of horseradish peroxidase by phenol and hydrogen peroxide: a kinetic investigation // Biochem. Biophys. Acta. 1994. Vol. 1206. P. 272–278.
- Bates S. L., Wilderen R. P., Teany I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // Plant and Soil. 1973. Vol. 39. P. 205–207.
- Chen Z., Yong T. E., Ling J., Chang S-C., Galie D. R. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. Vol. 100. P. 3525–3530.
- Corpas F. J. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells // Trends Plant Sci. 2001. Vol. 6. P. 145–150.
- Fujiyama K., Intapruk C., Shinmyo A. Gene structures of peroxidases isoenzymes in horseradish and *Arabidopsis thaliana* and their expression // Biochem. Soc. Transact. 1995. Vol. 23. P. 245–246.
- Gay C., Gebicki J. M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylene orange hydroperoxide assay // Anal. Biochem. 2000. Vol. 284. P. 217–220.
- Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme in aerobic life // Plant Physiol. 2006. Vol. 141. P. 312–322.
- Ivanova A. Proline accumulation — Reaction von Pflanzen auf stress situationen / Ed. by Z. Wiss. Dresden, 1982.
- Jiang Z. Y., Woollard A. C. S., Wolff S. P. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation // FEBS letters. 1990. Vol. 268. P. 69–71.
- Lin C. C., Kao C. H. NaCl induced changes in ionically bound peroxidase activity in roots of rice seedlings // Plant and Soil. 1999. Vol. 216. P. 147–153.
- Millar A. H., Mittler V., Kiddle G., Heazlewood J. L., Bartoli C. G., Theodoulou F. L., Foyer C. H. Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses // Plant Physiol. 2003.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. 473–497.
- Otter T., Polle A. Characterization of acidic and basic apoplastic peroxidases from needles of Norway spruce (*Picea abies* L. Karsten) with respect to lignifying substrates // Plant Cell Physiol. 1997. Vol. 38. P. 595–602.
- Paleg L. G., Aspinall D. Proline accumulation physiological aspects // Physiology and biochemistry of drought resistance in plants / Ed. by L. G. Paleg, D. Aspinall. Sydney, 1981.
- Pallanca J. E., Smirnoff N. The control of ascorbic acid synthesis and turnover in pea seedlings // J. Exp. Bot. 2000. Vol. 51. P. 669–674.
- Pastory G. M., Foyer C. H. Components, networks, and pathways of cross tolerance to stress. The central role of «redox» and abscisic acid-material controls // Plant Physiol. 2002. Vol. 129. P. G7460–G7468.

- Prasad T. K., Anderson M. D., Stewart C. R. Localization and characterization of peroxidases in the mitochondria of chilling-acclimated maize seedlings // *Plant Physiol.* 1995. Vol. 108. P. 1597—1605.
- Reed B. M. The *in vitro* genebank of temperate fruit and nut crops at the National Clonal Germplasm Repository-Corvallis // *Management of field and *in vitro* germplasm collection.* Cali, Colombia. 1996. P. 132—135.
- Roe J. H., Khuether C. A. *Methods biochemical Analysis* // *J. Biol. Chem.* 1948. Vol. 174. P. 201—202.
- Smirnoff N. Ascorbic acid: metabolism and function of a multifaceted molecule // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2000. Vol. 3. P. 229—235.
- Smith A. M., Morrison W. L., Milham P. J. Oxidation of indole-3-acetic acid by peroxidase: involvement of reduced peroxidase and compound II with superoxide as a product // *Biochemistry.* 1982. Vol. 21. P. 4414—4419.
- Wojtaszek P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection // *Biochem. J.* 1997. Vol. 322. P. 681—692.

* Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства имени Н. И. Вавилова
г. Санкт-Петербург

Поступило 30 IX 2008

** Санкт-Петербургский государственный университет
tatjana9972@yandex.ru

MICROPROPAGATION AND DYNAMICS MORPHOPHYSIOLOGICAL
PARAMETERS OF SOME SPECIES OF GENERA *RUBUS* AND
FRAGARIA (ROSACEAE) UNDER PRESERVATION *IN VITRO*

*I. S. Samatova, S. E. Dunaeva, E. I. Sharova,
S. M. Schiparyev, S. S. Medvedev, T. A. Gavrilenko*

SUMMARY

Interspecies differences of micropropagation, growth and development between 15 samples of blackberry, raspberry and strawberry microplants have been analyzed under long-term *in vitro* preservation at +4 °C. Some biochemical parameters of blackberry microplants stored for a long time at +4 °C have been analyzed too. Strawberry demonstrated the best micropropagation factor and the greatest survive under mentioned. The content of an ascorbic acid in leaves of a blackberry is sharply reduced (in 25 times within 8 months of preservation). The content of free proline increased in the beginning of preservation, and then reduced. Level of H₂O₂ in leaves of the blackberry, stored long time at low temperature, does not vary within the first 4 months and then increases. Peroxidase activity increases in 4—8 months of preservation and is decreased by 12 month of preservation. It is concluded that the most probable reason of ageing and destruction of microplants in conditions of long-term *in vitro* preservation is the increase of H₂O₂ level.
