Стимуляция ризогенеза красной и чёрной малин *in vitro* с использованием когерентного излучения

Н.В. Соловых, А.В. Будаговский

ФГБНУ «Федеральный научный центр имени И.В. Мичурина», г. Мичуринск, Российская Федерация

Изучали влияние дополнительного красного светодиодного и лазерного освещения на ризогенез *in vitro* растений рода *Rubus* при разных уровнях базовой полихроматической освещённости. Актуальность данной работы обусловлена необходимостью совершенствования биотехнологических методов ускоренного размножения растений на всех этапах клонирования, в том числе на этапе корнеобразования. Одним из путей решения этой задачи является использование когерентного излучения для стимуляции физиологических и морфогенетических процессов у растений и создание на основе разработанных методов энергосберегающих технологий культивирования. Микрочеренки ягодных культур, культивируемые при освещённости 1000 и 2000 Люкс, подвергали ежедневному дополнительному освещению в течение 20 минут светодиодами ($\lambda = 638$ нм, плотность мощности 5 Вт/м^2) или гелий-неоновым лазером ($\lambda = 632,8$ нм, плотность мощности 3 Вт/м^2). В условиях низкой освещённости (1000 Лк) отмечено снижение интенсивности ризогенеза у красной и чёрной малин по сравнению с освещённостью 2000 Лк. Светодиодное и лазерное дополнительное облучение повышали интенсивность ризогенеза ягодных культур *in vitro*. При низкой базовой освещённости (1000 Лк) наблюдался максимальный стимулирующий эффект дополнительного красного квазимонохроматического освещения. У красной и чёрной малин лазерная и светодиодная досветки при недостаточной базовой освещённости позволили получить число корней и суммарную их длину в расчёте на один эксплант, не отличающиеся статистически от таковых при полной освещённости, но без досветки.

Ключевые слова: клональное микроразмножение *in vitro*, ризогенез, фотостимуляция, система фитохромов, малина красная, малина чёрная

Клональное микроразмножение в последние десятилетия приобретает всё большую популярность для быстрого тиражирования растений и производства оздоровленного посадочного материала [1, 2]. Клонирование *in vitro* включает несколько этапов, основными из которых являются введение в стерильную культуру, мультипликация, укоренение *in vitro* и адаптация пробирочных растений *in vivo*. Чтобы увеличить эффективность метода необходимо совершенствовать методики и технологии для всех перечисленных этапов. Клонированию растений рода *Rubus* посвящено большое количество работ [3, 4, 5, 6, 7, 8] и другие.

Важным этапом процесса клонирования растений является образование корней *in vitro*. Зачастую, даже у сравнительно хорошо укореняемых видов и сортов, оно проходит медленно, что тормозит переход к этапу адаптации растений в грунте и увеличивает количество саженцев, требующих доращивания в следующем вегетационном сезоне. Как правило, чтобы добиться более интенсивного ризогенеза, применяют различные модификации питательных сред.

Стимуляция физиологических и морфогенетических процессов возможна путём применения фоторегуляторных воздействий [9], в частности низкоинтенсивного когерентного излучения [10, 11]. Стимулирующее действие красного лазерного света связывают с переходом

дом фитохромов в активное конформационное состояние $\text{ФХ}_{660} \xleftarrow[\lambda \approx 730]{\lambda \approx 660} \text{ФХ}_{730}$

[9, 12]. Формой, стимулирующей физиологическую активность растений, является ФХ_{730} . Повышения её доли достигают воздействием красного света (630...690 нм). Под действием ФХ_{730} происходит изменение структуры мембран, возрастает их проницаемость, что способствует увеличению эффективности действия цитокининов и гиббереллинов. Цитокинины и гиббереллины, в свою очередь, способствуют делению клеток, гиббереллины вызывают также вытягивание клеток в длину. Цитокинины также обладают свойством снимать апикальное доминирование и способствовать тем самым вегетативному размножению растений [13].

Ранее было установлено, что периодическая лазерная и светодиодная досветки в красной области спектра стимулируют рост и размножение *in vitro* малины чёрной и актинидии. Максимально стимулирующее действие проявлялось при недостатке базовой освещённости [14]. Остаётся открытым вопрос о влиянии таких излучений на ризогенез, индукция которого осуществляется фитогормонами из группы ауксинов.

Цель исследований – изучение действия периодической красной лазерной и светодиодной досветок на ризогенез растений рода *Rubus*.

Материал и методы. В качестве материала для опытов использовали микрочеренки малины красной (*Rubus idaeus* L.) сорта Вольница и малины чёрной (*Rubus occidentalis* L.) сорта Кумберленд. Их культивировали на агаризованной питательной среде, содержащей 1/2 макросолей по прописи MS [15], микросоли и витамины полностью по MS, 20 г/л сахарозы, 0,5 мг/л β -индолил-3-масляной кислоты (ИМК) и 1,0 мг/л гибберелловой кислоты (ГК). В каждом варианте опыта использовали по 30-40 растений. Культивирование проходило при освещённости 1000 и 2000 Люкс, длине светового дня 16 часов и температуре $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

Половина растений при каждом уровне освещённости в течение всего времени культивирования подвергалась светодиодной ($\lambda = 638$ нм, полуширина спектра $\Delta\lambda = 22$ нм, плотность мощности 5 Вт/м^2) или лазерной ($\lambda = 632,8$ нм, плотность мощности 3 Вт/м^2) досветке. Облучение светодиодами и лазерами проводили ежедневно в начале светового периода культивирования в течение 20 минут. Светодиодная досветка была постоянной, гелий-неоновым лазером проводили сканирование с частотой 8 оборотов в минуту, продолжительность воздействия 0,05 секунды на одну колбу или 0,01 секунды на одно растение за один оборот. Каждые 15 дней учитывали число образовавшихся корней и суммарную длину корней на один эксплант.

Для обработки экспериментальных данных использовали метод дисперсионного анализа статистического пакета Microsoft Excel 2003.

Результаты и их обсуждение. Низкое базовое полихроматическое освещение приводило к статистически значимому уменьшению интенсивности ризогенеза как у красной, так и у чёрной малины ($P < 0,05$). У обоих видов при освещённости 1000 Лк снижались число корней и суммарная их длина в расчёте на один эксплант по сравнению с вариантом освещённости 2000 Лк.

Красное квазимонохроматическое излучение светодиодов и лазера с длинами волн, соответствующими переходу фитохрома В в активное конформационное состояние, стимулировало ризогенез красной малины и ежевики *in vitro*.

При светодиодной досветке через 60 суток культивирования среднее число корней на один микрочеренок малины красной сорта Вольница при базовой освещённости 1000 Лк увеличилось на 49,11%. При базовой освещё-

ности 2000 Лк среднее число корней возросло на 46% (рис. 1).

Рис. 1. Действие светодиодной досветки на среднее число образовавшихся корней на один эксплант малины красной сорта Вольница *in vitro* (60 суток культивирования)

Суммарная длина корней одного экспланта сорта Вольница при базовой освещённости 1000 Лк через 60 суток культивирования под действием излучения светодиодов увеличилась на 49,11% ($P < 0,10$), при освещённости 2000 Лк – на 102,52% ($P < 0,01$). Следует отметить, что светодиодная досветка при освещённости (1000 Лк) позволила компенсировать недостаток света. Суммарная длина корней на один эксплант под действием светодиодов практически достигала этого показателя при полной освещённости 2000 Лк (рис. 2).

Рис. 2. Действие светодиодной досветки на суммарную длину образовавшихся корней на один эксплант малины красной сорта Вольница *in vitro*

При изучении влияния светодиодной досветки на ризогенез чёрной малины сорта Кумберленд получены аналогичные данные. Досветка позволила увеличить среднее число

корней через 60 суток культивирования при базовой освещённости 1000 Лк на 25,81%, а суммарную длину корней на один эксплант на 50,19% в сравнении с необлучённым контролем. При базовой освещённости 2000 Лк среднее число корней возросло на 50,44%, а суммарная их длина – на 85,61%

Кратковременная периодическая лазерная досветка также позволила стимулировать ризогенез *in vitro* у растений рода *Rubus*. Через 60 суток культивирования она увеличила среднее число корней у малины красной Вольница при базовой освещённости 1000 Лк на 73,78%, при освещённости 2000 Лк различий с контролем по данному показателю не выявлено (рис. 3).

Суммарная длина корней при базовой освещённости 1000 Лк возросла на 54,64% ($P < 0,05$), при освещённости 2000 Лк статистически значимых различий по данному показателю не обнаружено (рис. 4).

Рис. 3. Влияние дополнительного периодического освещения гелий-неоновым лазером *in vitro* на среднее число корней одного экспланта малины красной сорта Вольница (60 суток культивирования)

Рис. 4. Влияние дополнительного периодического освещения гелий-неоновым лазером *in vitro* на суммарную длину корней одного экспланта малины красной сорта Вольница (60 суток культивирования)

Аналогичные данные получены на малине чёрной сорта Кумберленд. Дополнительное периодическое кратковременное освещение гелий-неоновым лазером позволило увеличить среднее число корней, образовавшихся за 60 суток культивирования на 50,79% (с 2,54 до 3,83 шт.) при базовой освещённости 1000 Лк и на 14,98% (с 4,14 до 4,76 шт.) при освещённости 2000 Лк. Суммарная длина корней на один микрочеренок под действием лазерной досветки при базовой освещённости 1000 Лк увеличилась на 48,38% (с 12,63 до 18,74 мм). В условиях полихроматической освещённости, равной 2000 Лк, досветка увеличила длину корней с 19,73 до 21,42 мм, что не является статистически значимым.

В опытах по мультипликации ягодных культур *in vitro* наблюдалось более ярко выраженное стимулирующее действие лазерной досветки по сравнению со светодиодной, что связывали с более высокой когерентностью лазерного излучения [14]. В опытах по ризогенезу не наблюдали статистически значимых различий между действием лазерного и светодиодного облучений.

Заключение. Красная квазимонохроматическая досветка позволяет стимулировать ризогенез *in vitro* у растений рода *Rubus*. Под действием светодиодного и лазерного облучений возрастает число корней и их суммарная длина на один микрочеренок *in vitro* как у красной, так и у чёрной малины. При низкой освещённости (1000 Лк) стимулирующий эффект в большинстве случаев выражен сильнее. Светодиодная и лазерная стимуляции позволяют компенсировать недостаток базовой освещённости. Полученные данные открывают возможность разработки энергосберегающих технологий культивирования растений *in vitro*.

Список литературы

- Куликов И.М., Высоцкий В.А., Шипунова А.А. Биотехнологические приёмы в садоводстве: экономические аспекты // Садоводство и виноградарство. 2005. №5. С. 24-27.
- Пронина И.Н., Матушкина О.В. Экономические аспекты использования клонального микро размножения в системе производства посадочного материала плодовых и ягодных культур // Плодоводство и ягодоводство России. 2011. Т. 26. С. 82-88.
- Verstesey J. Experiments on the propagation of virus-free raspberry propagation material by meristem culture // Acta Hort. 1979. Vol. 95. P. 77-78.

4. Skovorodnikov D.N., Kazakov I.V., Evdokimenko S.N., Sazonov F.F. Application of diphenylurea derivatives in clonal micropropagation of primocane fruiting raspberry and black currants // Acta Hort. ISHS. 2012. 946. P. 135-138.

5. James D.J., Knight V.H., Thurbon I.J. Micropropagation of the red raspberry and the influence of phloroglucinol // J. Hort. Sci. 1980. 12. P. 313-319.

6. Сковородников Д.Н., Казаков И.В. Особенности клонального микроразмножения ремонтантных форм малины // Садоводство и виноградарство. 2012. №3. С. 39-42.

7. Муратова С.А., Шорников Д.Г., Янковская М.Б. Размножение садовых культур *in vitro*: методические рекомендации. Мичуринск – наукоград РФ, 2008. 69 с.

8. Бородаева Ж.А., Муратова С.А., Кулько С.В., Тохтарь Л.А. Влияние различных источников углеводного питания на ризогенез микрочеренков ягодных культур в условиях *in vitro* // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. 2017. Т.41. №25 (274). С. 21-35.

9. Конев С.В., Волотовский И.Д. Фотобиология. Минск: Из-во БГУ, 1979. 384 с.

10. Будаговский А.В. Теория и практика лазерной обработки растений. Мичуринск-наукоград РФ, 2008. 548 с.

11. Budagovsky A.V., Solovykh N.V., Budagovskaya O.N., Budagovsky I.A. Response of vegetable organisms to quasi-monochromatic light of different duration, intensity and wavelength // Quantum Electronics. 2015. Vol. 45. № 4. P. 345-350.

12. Волотовский И.Д. Фитохром – фоторегуляторный рецептор растений. Минск: Изд-во "Наука и техника", 1992. 166 с.

13. Жизнь зелёного растения. Влияние длительного облучения источниками света с широким спектром. Режим доступа: <http://www.bibliotekar.ru/7-rasteniya/48.htm> (дата обращения: 30.07.2018 г.).

14. Соловых Н.В., Будаговский А.В., Янковская М.Б. Влияние светодиодного и лазерного излучения на рост и размножение ягодных культур *in vitro* на примере малины чёрной и актинидии коломикта // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2014. № 5. С. 16-21.

15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol.15. №13. P. 473-497.

Сведения об авторах:

Соловых Наталья Владимировна, кандидат биол. наук, ведущий научный сотрудник,

e-mail: natalyasolovykh@yandex.ru,

Будаговский Андрей Валентинович, доктор техн. наук, ведущий научный сотрудник

ФГБНУ «Федеральный научный центр имени И.В. Мичурина», ул. Мичурина, 30, г. Мичуринск, Тамбовская область, Российская Федерация, 393774, e-mail: info@fnc-mich.ru

Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka, 2018. Vol. 66, no. 5, pp. 64-68.

doi: 10.30766/2072-9081.2018.66.5.64-68

Stimulation of risogenesis of red and black raspberry *in vitro* with use of coherent radiation

N.V. Solovykh, A.V. Budagovsky

I.V. Michurin Federal Scientific center, Michurinsk, Tambov Region, Russian Federation

The effect of supplementary red LED and laser lightning on the rhizogenesis *in vitro* of plants of the genus *Rubus* at different levels of the basic polychromatic illumination was studied. The relevance of this work is due to the need to improve the biotechnological methods of accelerated plant propagation at all stages of cloning, including root formation stage. One of the ways to solve this problem is to use coherent radiation to stimulate physiological and morphogenetic processes in plants and to create energy-saving cultivation technologies on the basis of the methods developed. Microcuttings of berry crops cultivated with 1000 and 2000 Lux illumination were subjected to daily supplementary lightning for 20 minutes with LEDs ($\lambda = 638$ nm, power density 5 W/m^2) or helium-neon laser ($\lambda = 632.8$ nm, power density 3 W/m^2). In conditions of low illumination (1000 Lux), the intensity of rhizogenesis in red raspberry and black raspberry decreased in comparison with the illumination of 2000 Lux. LED-based and laser additional irradiation increased the intensity of the rhizogenesis of berry crops *in vitro*. With a low basic illumination (1000 Lux) the maximum stimulating effect of an additional red quasi-monochromatic illumination was observed. In red and black raspberry, laser and LED backlighting with insufficient basic illumination made it possible to obtain the number of roots and their total length per one explant not differing statistically from those at full illumination, but without backlighting.

Key words: *clonal micropropagation in vitro, rhizogenesis, photostimulation, system of phytochromes, red raspberry, black raspberry*

References

1. Kulikov I.M., Vysotsky V.A., Shipunova A.A. *Biotehnologicheskie priemy v sadovodstve: ekonomicheskie aspekty*. [Biotechnological methods in gardening: economic aspects]. *Sadovodstvo i vinogradarstvo*. 2005. no. 5. pp. 24-27.
2. Pronina I.N., Matushkina O.V. *Ekonomicheskie aspekty ispol'zovaniya klonal'nogo mikrorazmnozheniya v sisteme proizvodstva posadochnogo materiala plodovykh i yagodnykh kul'tur*. [Economic aspects of the use of clonal micropropagation in the production system of planting material of fruit and berry crops]. *Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii*. 2011. Vol. 26. pp. 82-88.
3. Verstesy J. Experiments on the propagation of virus-free raspberry propagation material by meristem culture. *Acta Hort.* 1979. Vol. 95. pp. 77-78.
4. Skovorodnikov D.N., Kazakov I.V., Evdokimenko S.N., Sazonov F.F. Application of diphenylurea derivatives in clonal micropropagation of primocane fruiting raspberry and black currants. *Acta Hort. ISHS*. 2012. 946. pp. 135-138.
5. James D.J., Knight V.H., Thurbon I.J. Micropropagation of the red raspberry and the influence of phloroglucinol. *J. Hort. Sci.* 1980. 12. pp. 313-319.
6. Skovorodnikov D.N., Kazakov I.V. *Osobennosti klonal'nogo mikrorazmnozheniya remontantnykh form maliny*. [Features of clonal micropropagation of remontant raspberry forms]. *Sadovodstvo i vinogradarstvo*. 2012. no. 3. pp. 39-42.
7. Muratova S.A., Shornikov D.G., Yankovskaya M.B. *Razmnozhenie sadovykh kul'tur in vitro: metodicheskie rekomendatsii RASKhN, VNIIGiSPR im. I.V. Michurina*. [Reproduction of garden cultures in vitro: methodological recommendations. Russian Academy of Agricultural Sciences, FSSI "I.V. Michurin Federal Science centre"]. *Michurinsk – naukograd RF: OAO «Tambovskaya tipografiya «Proletarskiy svetoch», 2008. 68 p.*
8. Borodina Zh.A., Muratova S.A., Kul'ko S.V., Tokhtar' L.A. *Vliyanie razlichnykh istochnikov uglevodnogo pitaniya na rizogenez ikrocherenkov yagodnykh kul'tur v usloviyakh in vitro*. [Influence of various sources of carbohydrate nutrition on the rhizogenesis of microcuttings of berry cultures in vitro]. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gos. Universiteta. Seriya: Estestvennye nauki*. 2017. Vol. 41. no. 25(274). pp. 21-35.
9. Konev S.V., Volotovskiy I.D. *Fotobiologiya*. [Photobiology]. Minsk: *Iz-vo BGU*, 1979. 384 p.
10. Budagovskiy A.V. *Teoriya i praktika lazernoy obrabotki rasteniy*. [Theory and practice of laser treatment of plants]. *Michurinsk-naukograd RF*, 2008. 548 p.
11. Budagovsky A.V., Solovykh N.V., Budagovskaya O.N., Budagovsky I.A. Response of vegetable organisms to quasi-monochromatic light of different duration, intensity and wavelength. *Quantum Electronics*. 2015. Vol. 45. no. 4. pp. 345-350.
12. Volotovskiy I.D. *Fitokhrom – fotoregulyatornyy retseptor rasteniy*. [Phytochrome is a photoregulatory plant receptor]. Minsk: *Iz-vo "Nauka i tekhnika"*, 1992. 166 p.
13. *Zhizn' zelenogo rasteniya. Vliyanie dlitel'nogo oblucheniya istochnikami sveta s shirokim spektrom*. [The life of a green plant. The effect of prolonged irradiation with sources of light with a wide spectrum]. Available at: <http://www.bibliotekar.ru/7-rasteniya/48.htm>. (accessed: 30.07.2018).
14. Solovykh N.V., Budagovskiy A.V., Yankovskaya M.B. *Vliyanie svetodiodnogo i lazernogo izlucheniya na rost i razmnozhenie yagodnykh kul'tur in vitro na primere maliny chernoy i aktinidii kolomikta*. [Influence of light-diode and laser radiation on the growth and multiplication of berry crops in vitro using the case of raspberry black and actinidia colomicta]. *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka*. 2014. no. 5. pp. 16-21.
15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 1962. Vol.15. no. 13. pp. 473-497.

Information about the authors:

N.V. Solovykh, PhD in Biology, leading researcher,
A.V. Budagovsky, DSc in Engineering, leading researcher

I.V. Michurin Federal Scientific center, 30, Michurin St., Michurinsk, Tambov Region, Russian Federation, 393774,
e-mail: info@fnc-mich.ru