

УДК 634.631.527

ВЛИЯНИЕ ФИТОСТИМУЛЯТОРОВ НА ФЕНОЛЬНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ ВИНОГРАДА

INFLUENCE OF PHYTOSTIMULATORS ON PHENOLIC METABOLISM OF VINE CALLUS CULTURE

В.В. Вялков, М.А. Сундырева

ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия», г. Краснодар, Россия, e-mail: 935346@bk.ru

V.V. Vyalkov, M.A. Sundryeva

North Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Wine-making, Krasnodar, Russia, e-mail: 935346@bk.ru

Аннотация. Разработка составов питательных сред для повышения эффективности размножения винограда в культуре *in vitro* является актуальной задачей. В то же время первичная оценка влияния различных питательных сред на виноград осложнена высоким уровнем сорто-специфики, потребностью в пересадках растений, выделением во внешнюю среду большого количества токсичных фенольных соединений, в результате чего происходит гибель растения. Таким образом, возможность проверки влияния тех или иных добавок на приживаемость растений на более простом модельном объекте – каллусных культурах – может существенно повысить эффективность подбора компонентов питательных сред. В статье рассмотрено влияние различных физиологически активных веществ на изменение синтеза фенольных соединений в каллусных культурах винограда сорта Красностоп. В результате проделанной работы установлено, что только кумаровая кислота из всех исследуемых добавок вызывает избыточное образование фенольных соединений у каллусной культуры винограда сорта Красностоп. Аскорбиновая кислота увеличивает скорость роста культуры, снижая уровень окислительных процессов. Метилжасмонат повышает фенольный метаболизм, но не приводит к стрессовым реакциям, тогда как салициловая кислота оказывает общий угнетающий эффект.

Ключевые слова: виноград, каллус, фитостимуляторы, фенольный метаболизм, *in vitro*

Summary. The development of culture media compositions to improve the efficiency of grape propagation in *in vitro* culture is an important task. At the same time, the primary assessment of the impact of culture media composition on grapes is complicated by a high level of variety specificity, the need for plant transplantation, and the release of a large amount of toxic phenolic compounds into the culture media, resulting in plant death. Thus, the possibility of testing the effect of certain additives on the survival of *in vitro* plants on callus cultures as a simpler model object can significantly increase the efficiency of selection of culture media components. The article considers the influence of various physiologically active substances on the changes in the synthesis of phenolic compounds in callus cultures of Krasnostop grape variety. As a result of the work, it was found that only coumaric acid from all the studied additives causes excessive formation of phenolic compounds in the callus culture of Krasnostop grapes. Ascorbic acid increases the growth rate of culture, reducing the level of oxidative processes. Methyl jasmonate increases phenolic metabolism, but does not lead to stress reactions, while salicylic acid has a general inhibitory effect.

Keywords: grapevine, callus, phytostimulants, phenolic metabolism, *in vitro*

DOI: 10.32904/2712-8245-2023-26-49-53

Введение. Возрастающий спрос на различные виды сельскохозяйственной продукции требует значительного увеличения объёмов производства, что

подразумевает расширение посевных площадей. Такая задача требует производства высококачественного посадочного материала. Клональное микроразмножение растений является перспективным направлением получения здорового посадочного материала садовых растений и винограда для последующей закладки маточных насаждений. Хотя методики выращивания большинства видов сельскохозяйственных культур общеизвестны, их модификация затруднена из-за того, что микрорастения крайне уязвимы к изменениям состава питательной среды [1]. Выращивание растений винограда в культуре *in vitro* осложняется и спецификой стрессовой реакции данного растения: при неподходящем составе питательной среды растение выделяет во внешнюю среду большое количество токсичных фенольных соединений, которые отравляют, в том числе, и само растение, в результате чего происходит гибель растения [2]. Учитывая высокую сортовую специфику в требованиях растений винограда к составу питательной среды [3], возможность проверки влияния тех или иных добавок на приживаемость растений является весьма актуальной.

Решением данной проблемы является выращивание каллусной культуры [4]. Преимуществом данного способа является возможность получить экспланты из любого участка растения, а не только из меристем. Каллус может поддерживаться в течение длительного времени. С другой стороны, получить микрорастения путём эмбриогенеза весьма трудно, что, одновременно с общей сложностью применения технологии выращивания растений в культуре *in vitro*, приводит к тому, что каллусные культуры не используют для микроразмножения, отводя им роль модельных систем [5, 6] или продуцентов вторичных метаболитов [7].

Целью проведённого исследования являлось исследование влияния добавления ряда фитостимуляторов на фенольный метаболизм каллусной культуры винограда сорта Красностоп.

Объекты и методы исследований. Каллусная культура была получена из фрагментов стебля, высаженных на питательную среду Мурасиге и Скуга [8] со сниженным в 1,5 раза содержанием макросолей. Культивация каллусной культуры осуществлялась в течение трёх недель, после чего каллусы пересаживались на питательные среды того же состава с добавлением фитостимуляторов (таблица 1), а также их сочетаний.

Таблица 1. Варианты добавок в состав питательной среды

Добавка	Концентрация, мкМ	Объём раствора, добавляемый в 1 л среды
Метлижасмонат (MeJa)	5 мкМ	1 мл
Салициловая кислота (SA)	100 мкМ	1,4 мл
Аскорбиновая кислота (AsA)	0,5 мМ	1 мл
Пролин (Pro)	100 мкМ	1,2 мл
Кумаровая кислоты (Coum)	0,1 мМ	1,7 мл

Всего было заложено 11 вариантов эксперимента (включая контрольный вариант). На каждый вариант приходилось 12 каллусов.

Эксперимент длился в течение 3 недель, после чего каллусные культуры исследовали по следующим параметрам: ростовая активность, общее содержание фенольных соединений, содержание флавоноидов.

Измерение ростовой активности происходило посредством прямого сравнения изменения объёма каллусной культуры в начале и в конце эксперимента.

Общее содержание фенольных соединений оценивали модифицированным методом Фолина-Чокальтеу [9]. Содержание флавоноидов измерялось [10].

Обсуждение результатов. Через 1 месяц культивирования произошло увеличение объёма каллусов всех вариантов опыта от 30 до 200 раз относительно изначального (рисунок 1).

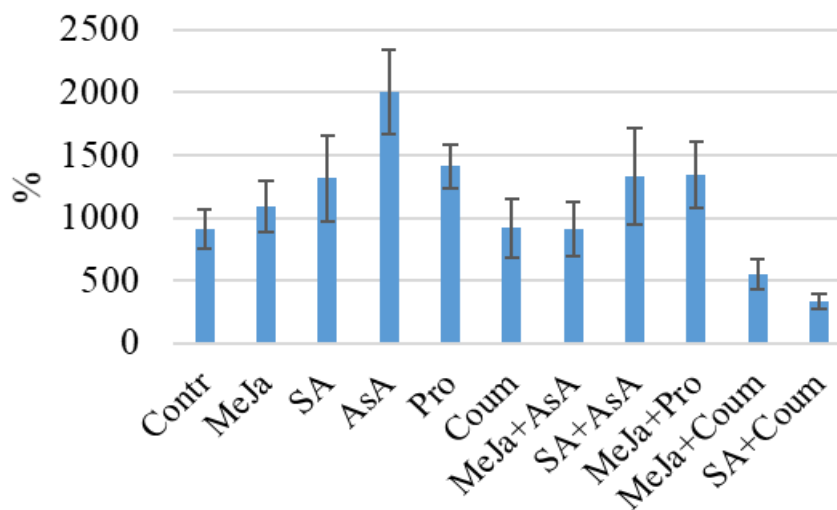


Рисунок 1. Процент прироста объёма каллусной культуры относительно объёма на момент закладки эксперимента

Установлено, что максимальный прирост каллусов обеспечивало добавление в среду AsA. Минимальный прирост наблюдался в варианте с сочетанием SA и Coum. К тому же, у каллусных культур было отмечено значительное потемнение тканей. Ещё одним наблюдением является то, что применение комбинированных добавок обеспечивало меньший прирост объёма каллусов в сравнении с одиночными добавками, при этом сочетания гормонов с Coum ограничивали ростовую активность в наибольшей степени.

Следующим этапом являлось измерение общего содержания фенольных соединений (рисунок 2). Относительно контрольного варианта, все добавки привели к возрастанию общего содержания фенольных соединений. При этом наибольшее содержание демонстрирует вариант с добавлением в состав питательной среды MeJa+AsA. При этом обнаруживается следующая закономерность: MeJa как в виде одиночной добавки, так и в сочетании с другими приводил к существенному увеличению содержания фенольных соединений в сравнении с вариантами, где он добавлен не был. В то же время, при высоком

значении общего содержания фенольных соединений, серьёзного потемнения тканей в описанных вариантах не наблюдалось.

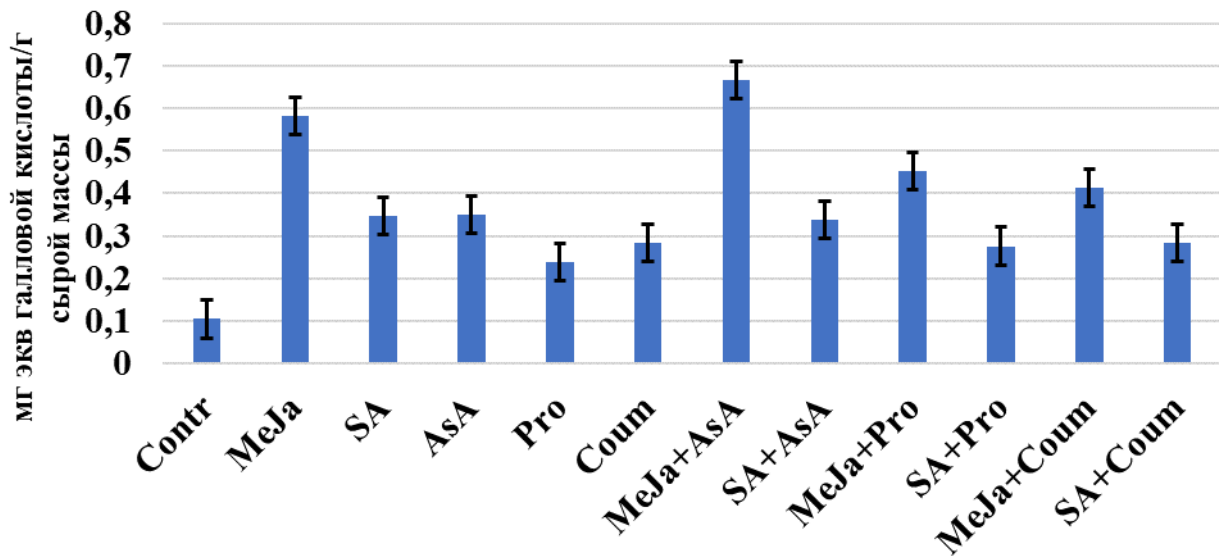


Рисунок 2. Общее содержание фенольных соединений в каллусах винограда

Наименьшее содержание фенольных соединений наблюдалось в варианте с добавлением Pro. Измерение содержания флавоноидов позволило установить причины несоответствия результатов оценки прироста объёма каллусной культуры и общего содержания фенольных соединений (рисунок 3)

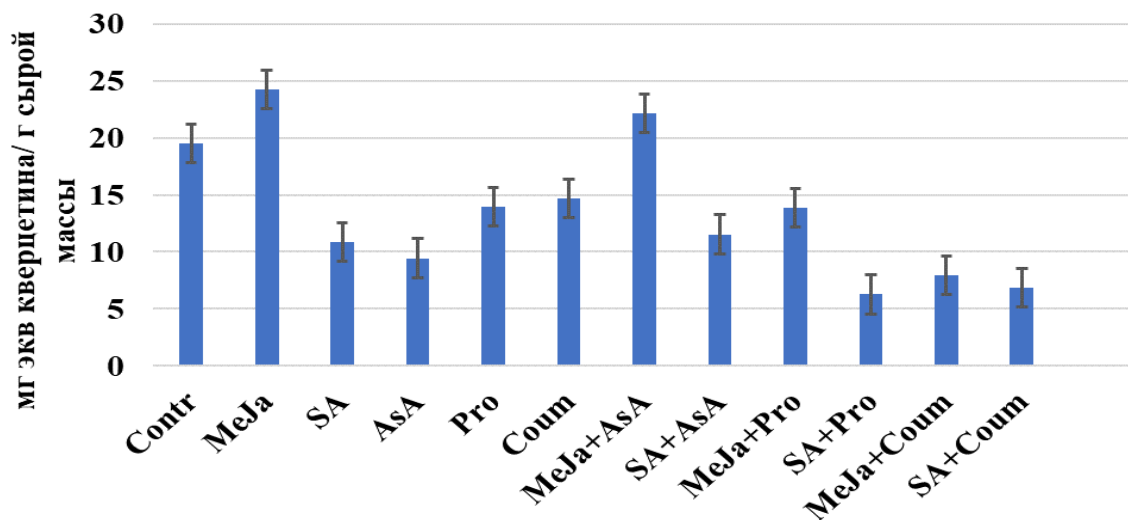


Рисунок 3. Содержание флавоноидов в каллусах винограда

Большинство вариантов демонстрируют снижение содержания флавоноидов, относительно контроля. Исключением является вариант с добавлением MeJa и сочетания MeJa+AsA. Этим можно объяснить хороший прирост объёма, продемонстрированный данными вариантами одновременно с высоким содер-

жанием фенольных соединений: метаболизм каллусной культуры, вероятно, был направлен именно на образование флавоноидов, а не токсичных соединений. С другой стороны, варианты с различными сочетаниями SA и других фитогормонов приводили к заметному снижению содержания флавоноидов, относительно вариантов с одиночными добавками, что, однако, не приводило к существенному снижению ростовой активности так, как и общее содержание фенольных соединений было невысоким.

Варианты с Coum как в качестве одиночной добавки, так и в сочетании с другими, продемонстрировали одни из самых низких значений содержания флавоноидов при средних результатах содержания фенольных соединений.

Выводы. В результате проделанной работы установлено, что только кумаровая кислота из всех исследуемых добавок вызывает фенольный стресс у каллусной культуры винограда сорта Красностоп. Аскорбиновая кислота увеличивает скорость роста культуры, снижая уровень окислительных процессов. Метилжасмонат повышает фенольный метаболизм, но не приводит к стрессовым реакциям, тогда как салициловая кислота оказывает общий угнетающий эффект.

Литература

1. Браткова Л.Г., Цаценко Н.Н. Клональное микроразмножение винограда // Достижения науки и техники АПК. 2015. Т. 29. № 6. С. 49–52.
2. Яблонская М.И., Книшкайте А.В., Романова Е.В. Проблема окисления фенолов при клональном микроразмножении // Инновационные процессы в АПК. 2014. С. 86–87.
3. Бугаенко Л.А., Иванова-Ханина Л.В. Морфогенез винограда в культуре *in vitro* // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия. 2011. Т. 24. № 2. С. 73–82.
4. Kabiri F. Study on the factors effective in callus induction in grape // Research in Pomology. 2021. Т. 5. № 2. С. 63–71.
5. Ji X. Grape VvMAPK9 positively regulates salt tolerance in Arabidopsis and grape callus through regulating the antioxidative system // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2022. Т. 148. № 3. С. 609–622.
6. Zheng H.Z. Nitrogen and phosphorus co-starvation inhibits anthocyanin synthesis in the callus of grape berry skin // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2020. Т. 142. № 2. С. 313–325.
7. Liu W. Effect of grape genotype and tissue type on callus growth and production of resveratrols and their piceids after UV-C irradiation // Food Chemistry. 2010. Т. 122. № 3. С. 475–481.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Т.15. С. 473–497.
9. Методическое и аналитическое обеспечение исследований по садоводству / Л.М. Лопатина, И.А. Драгавцева, Е.В. Луценко [и др.]. Краснодар: Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства Россельхозакадемии. 2010. 300 с.
10. Chang Chia-Chi. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods // Journal of Food and Drug Analysis. 2002. Т.10. № 3. С. 178–182.