

УДК 581.143.6+634.723.1

© 2016

МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ СМОРОДИНИ ЧОРНОЇ

Т.В. Медведєва,

кандидат
біологічних наук

Н.В. Тряпичина,

Т.А. Натальчук,
кандидати сільсько-
господарських наук

Я.С. Запольський

Інститут
садівництва НААН

Мета. Оптимізувати окремі етапи мікроклонального розмноження смородини чорної та розробити комплексні технології прискореного розмноження для нових сортів на основі біотехнологічних методів. **Методи.** Приготування живильних середовищ і культивування рослин *in vitro* виконували за загальноприйнятими методиками. **Результати.** Досліджено індивідуальні особливості отримання асептичної культури смородини чорної сорту Санюта та елітної форми 01-1-9. Підібрано живильні середовища для проліферації та укорінення в культурі *in vitro* і способи адаптації до умов *ex vitro*. **Висновки.** Для отримання асептичної культури смородини чорної як експланти найбільш придатні апікальні та латеральні бруньки, вилучені із зелених пагонів. Додавання аскорбінової кислоти (0,57 mM) у середовище для ініціювання асептичної культури та проліферації запобігає зниженню регенераційної і ростової активності експлантів, спричиненої окисненням фенолів. Адаптація на субстраті «Domoflor mix 3» забезпечує регенерацію 91–98% мікропагонів.

Ключові слова: чорна смородина, асептична культура, експланти, *in vitro*.

Смородина чорна (*Ribesnigrum* L.) — культура, яка характеризується швидкоплідністю, високими врожайністю та якістю ягід, що мають лікувальні властивості. За вмістом вітаміну С ягоди смородини хоча дещо й поступаються шипшині, але в 5 разів перевищують суницю, у 7–8 — малину та аґрус і в поєднанні з вітаміном Р є незамінними в лікуванні серцево-судинних захворювань і надмірних доз опромінення [1].

Культура *in vitro* та мікроклональне розмноження рослин є цінною альтернативою за фітовірусологічного контролю та збереження генетичних ресурсів. У поєднанні з термо- чи хемотерапією цей метод дає можливість оздоровити цінні сорти чи елітні форми, кількість яких обмежена.

Є ряд робіт з мікроклонального розмноження смородини чорної [2–5], але з огляду на те, що регенераційна здатність ізольованих тканин цієї культури залежить від сортової специфіки материнських рослин, складу живильного середовища і концентрації регуляторів росту, оптимізація окремих етапів для конкретних генотипів та розроблення комплексних технологій пришвидшеного

розмноження для нових сортів на основі біотехнологічних методів залишається актуальною.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проводили у відділі вірусології, оздоровлення та розмноження плодових і ягідних культур Інституту садівництва НААН впродовж 2014–2015 рр. Використовували сорти смородини чорної Санюта, Галактика, Дебют та елітні форми 01-1-9 і 99-20-16 власної селекції. Пагони з бруньками, що були в стані спокою, нарізали в січні — березні і прощували в контрольованих умовах перед вилученням експлантів для введення в культуру *in vitro*. Здерев'янілі пагони відбирали в серпні. Як експланти за ініціювання асептичної культури використовували верхівкові та пазушні бруньки.

Стерилізувальним агентом був 0,1%-й розчин хлориду ртуті (HgCl_2). Додатково використовували 70%-й етанол і комерційний розчин «Білізна» у розведенні 1:5. Приготування живильних середовищ і культивування рослин *in vitro* проводили за загальноприйнятими методиками [6]. На етапі введення в культуру та проліферації

1. Вплив режиму стерилізації і типу експланта смородини чорної на ефективність уведення в культуру *in vitro*

Сорт смородини	Вихід стерильних експлантів, %			
	0,1% HgCl ₂ , 4 хв		0,1% HgCl ₂ , 5 хв	
	Зелені пагони	Здерев'янілі пагони	Зелені пагони	Здерев'янілі пагони
Галактика	45	28	49	31
Дебют	39	23	43	27
Санюта	51	26	57	33
01-1-9	63	31	69	35
99-20-16	37	24	41	29

використовували середовище Мурасіге-Скуга (MS) з різними модифікаціями.

Адаптацію до умов *ex vitro* укорінених пагонів, що досягли розміру 2 см і більше, проводили з початку квітня в теплиці на торф'яному субстраті «Domoflor mix 3» (Литва) з додаванням незначної кількості перліту.

Результати досліджень. Отримання стерильної культури є першим і дуже важливим етапом під час мікроклонального розмноження, особливо для ягідних культур, оскільки їх тривале вегетативне розмноження, як правило, призводить до масового зараження насаджень патогенною мікрофлорою, що гальмує розвиток експланта на живильному середовищі. Верхівкові та пазушні бруньки із зелених та здерев'янілих пагонів стерилізували 0,1%-м розчином хлориду ртуті як найефективнішим стерилантом для смородини згідно з літературними даними [2]. Експозиція стерилізації становила 4 і 5 хв.

Найвищий вихід асептичного матеріалу (69%) отримали для ЕФ 01-1-9 із бруньок, які вилучали із зелених пагонів (табл. 1). Здерев'янілі пагони виявилися не дуже вдалим джерелом експлантів через високий фон епіфітної мікрофлори. Загалом вихід стерильних експлантів був невисоким за обох режимів стерилізації. Крім того, у процесі подальшого культивування виявилася

латентна інфекція, унаслідок якої були втрачені регенеранти сортів Галактика, Дебют та елітної форми 99-20-16. То ж наступні етапи з технологічної ланки мікроклонального розмноження виконували із сортом Санюта та елітною формою 01-1-9. Про високий рівень контамінації (до 64%) за введення смородини в культуру *in vitro* свідчить автор [7].

Вважаємо, що попередня обробка джерела експлантів комплексом пестицидів і утримання вихідного матеріалу в контрольованих умовах перед введенням у культуру *in vitro* може істотно знизити рівень контамінації. Крім того, для отримання більшої кількості асептичного матеріалу варто збільшити експозицію стерилізації, адже було показано, що за обробки експлантів розчином 0,1% HgCl₂ упродовж 15 хв ефективність стерилізації становила 70–100%.

Для регенерації мікропагонів експланти були інокульовані на середовище MS, що містило 0,5 мг/л бензиламінопурину (БАП), який найчастіше застосовують для стимулювання пагоноутворення. Індолілмасляну та гіберелову кислоти додавали по 0,1 мг/л. Приживлюваність ізольованих бруньок підраховували через 30 дів культивування (табл. 2).

Для обох досліджуваних генотипів більший відсоток приживлюваності мали латеральні бруньки, вилучені із зелених пагонів,

2. Приживлюваність експлантів смородини чорної після введення в культуру *in vitro*

Генотип	Приживлюваність експлантів, %			
	Зелені пагони		Здерев'янілі пагони	
	Апікальні бруньки	Латеральні бруньки	Апікальні бруньки	Латеральні бруньки
Санюта	73	81	62	53
ЕФ 01-1-9	86	93	67	61

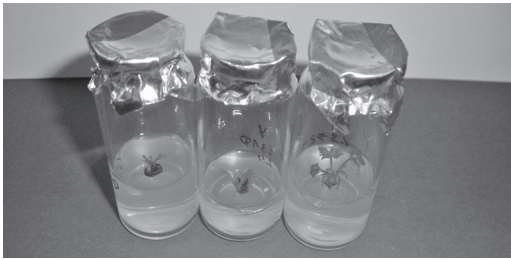


Рис. 1. Процес регенерації з первинного експланта смородини чорної сорту Санюта в культурі *in vitro*

та апікальні — зі здерев'янілих. Порівняно із сортом Санюта приживлюваність експлантів ЕФ 01-1-9 була дещо вищою. Загалом же апікальні і латеральні бруньки можуть бути надійним джерелом експлантів за ініціювання асептичної культури чорної смородини. Отримані нами результати не суперечать даним, отриманим для смородини сортів Голубка та Алтайская десертная [8].

Упродовж першого місяця культивування на модифікованому живильному середовищі MS з ізолюваних експлантів розвивалися мікропагони, які пересаджували на середовище для формування розеток (рис. 1).

Процес регенерації з первинних експлантів та проліферації смородини часто супроводжується виділенням ними в живильне середовище продуктів окиснення фенолів, які пригнічують регенераційні і ростові процеси. Щоб знизити окиснювальну активність ферментів, використовують антиоксиданти — аскорбінову та лимонну кислоти, глутатіон, полівінілпіролідон, дітіотриетол та ін. У наших дослідженнях здорові експланти вдалося отримати, додаючи до складу середовища на перших і наступних етапах культивування аскорбінову кислоту в концентрації 0,57 мМ. Скорочення тривалості пасажу до 30-ти днів зменшує негативні явища, пов'язані з окисненням фенолів, і сприяє інтенсивному росту мікропагонів. Як свідчать літературні дані, триваліше утримання мікропагонів смородини на середовищі для культивування призводить до зниження ростової активності на 11–20% [9].

Для стимулювання розвитку адвентивних пагонів додавали в живильне середовище БАП в концентрації 0,5, 0,8 і 1,0 мг/л. Уміст індолілмасляної кислоти залишався сталим у всіх варіантах. Визначали коефіцієнт пагоноутворення та довжину мікропагонів (табл. 3).

З підвищенням концентрації БАП збільшувався коефіцієнт пагоноутворення, але при цьому спостерігалось зменшення висоти мікропагонів у розетках з домінуванням 1–2-х високих. Щоб отримати вищі пагони, у середовищі для розмноження збільшували концентрацію гіберелової кислоти до 1,0 мг/л. Висота мікропагонів при цьому збільшилася незначною мірою, а поодинокі рослини, що були вищими, ставали лігніфікованими, і їх здатність до розмноження знижувалася. Оптимальною на етапах розмноження виявилася концентрація ГК 0,5 мг/л, укорінення — 0,1 мг/л.

Під час культивування смородини часто спостерігали явища хлорозу листків, що відзначали і дослідники [5]. Додавання подвійної концентрації хелату заліза позбавляє цих негативних явищ. На утворення конгломератів сприятливий вплив мала також заміна сахарози глюкозою або використання цих 2-х вуглеводів у рівних кількостях. На горизонтально орієнтованих пагонах вдалося отримати вищий коефіцієнт розмноження порівняно з пагонами, орієнтованими вертикально. Висадження мікропагонів на середовище не поодинокими рослинами, а невеликими кластерами сприяє збільшенню коефіцієнта розмноження.

Укорінення мікропагонів стимулювали на середовищі, що містило індуктор ризогенезу ІМК в концентрації 0,1 мг/л. Концентрацію сахарози знижували до 20 г/л. Процес укорінення тривав 20–30 днів. Смородина досить легко укорінюється і на безгормональному середовищі, якщо висота мікропагонів досягає 2 см і вище. В обох генотипах відсоток укорінених рослин становив 95–100. Рослини з розвинутою кореневою системою висаджували в касети для адаптації (рис. 2).

Адаптація, як і ініціювання асептичної

3. Вплив концентрації БАП на проліферацію смородини чорної

Генотип	Уміст БАП, мг/л	Коефіцієнт пагоноутворення	Середня довжина пагонів, мм
Санюта	0,5	2,5±0,37	11,3±1,53
	0,8	3,2±0,19	19,5±2,21
	1,0	3,5±0,25	14,7±1,64
ЕФ 01-1-9	0,5	2,8±0,29	13,4±1,59
	0,8	3,4±0,34	18,7±2,54
	1,0	3,6±0,26	16,5±2,05



Рис. 2. Адаптація рослин смородини чорної до умов *ex vitro*

культури, хоча і з різних причин, є головною проблемою всієї технології мікроклонального розмноження. Рослини, вирощені в умовах *in vitro*, мають слаборозвинені провідну систему ксилеми і продиховий апарат. Приживлюваність регенерантів у нестерильних умовах передусім залежить від здатності

мікропагонів витримувати низьку вологість. Оскільки листкові пластинки позбавлені епікутикулярного воску, вони швидко зневоднюються за перенесення з умов *in vitro* в умови *ex vitro* і гинуть [10]. Тому вибір умов адаптації має істотне значення. Велика увага при цьому приділяється якості субстрату, який має бути легким для хорошої аерації коренів, поживним та вологостримувальним. Цим вимогам відповідає субстрат «Domoflor mix 3» (Литва).

Адаптацію укорінених пагонів, що досягли розміру 2 см і більше, до умов *ex vitro* проводили з початку квітня. Для підтримання високого рівня вологості (до 90–100%) лотки з висадженими рослинами накривали поліетиленовою плівкою, яку поступово відкривали і повністю знімали на 7–10-й день. Температура в теплиці на початку адаптації була в межах 15–18°C. За таких умов вихід адаптованих рослин становив 91–98%.

Висновки

Для отримання асептичної культури смородини чорної найбільш придатні як експлантати апікальні та латеральні бруньки, вилучені із зелених пагонів.

Додавання аскорбінової кислоти в концентрації 0,57mM у середовище для ініціювання асептичної культури та проліферації запобігає зниженню регенераційної та ростової активності експлантів у результаті окиснення фенолів.

Для культивування смородини оптимальним є середовище Мурасіге-Скуга, що містить БАП (0,8–1,0 мг/л), ГК (0,5 мг/л) і подвійну концентрацію хелату заліза.

Укорінення експлантів досліджуваних генотипів відбувається впродовж 20–30-ти днів на середовищі, що містить 0,1 мг/л ІМК і становить 95–100%.

Адаптація на субстраті «Domoflor mix 3» забезпечує регенерацію 91–98% мікропагонів.

Бібліографія

1. Сіленко В.О. Придатність сортів смородини (*Ribes nigrum* L.) селекції НУБІП України до механізованого збирання ягід/В.О. Сіленко, П.М. Гав'юк//Сорто-вивчення та охорона прав на сорти рослин. — 2013. — № 3. — С. 13–17.
2. Ключаваденко А.А. Особливості отримання асептичної культури *Ribes nigrum* L./А.А. Ключаваденко, С.Ю. Білоус, О.В. Оверченко//Наук. доп. НУБІП. — 2014. — 9 с.
3. Колбанова Е.В. Методика мікророзмноження смородини чорної *in vitro*/Е.В. Колбанова, Н.В. Кухарчик//Плодоводство: сб. науч. ст./Институт плодородства национальной академии наук Беларуси. — Самохваловичи, 2006. — Т. 2. — Ч. 2. — С. 163–168.
4. «*In vitro*» propagation of black currant 'Perla-Neagra' and 'Amurg' cultivars/D. Clapa, A. Fira, C. Plopa, A. Bărbos//Scientific papers of the R.I.F.G.Piteshti. — 2009. — V. XXV. — P. 207–212.
5. Ruzić D. Micropropagation as means of rapid multiplication of newly developed blackberry and black currant cultivars/D. Ruzić, T. Lazić//Agriculturae Conspectus Scientificus. — 2006. — V. 71. — № 4. — P. 149–153.
6. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений/Р.Г. Бутенко. — М., 1964. — 272 с.
7. Сковородников Д.Н. Клональное микроразмножение в ускорении селекционного процесса смородины черной//Научн. вест. Серия Естественные науки. — 2012. — № 21(140). — С. 58–61.
8. Клональное размножение растений черной смородины (*Ribes nigrum* L.) *in vitro*/Г.К. Оразбаева, В.Т. Хасанов, А.Р. Искаков, В.К. Швидченко//Вестн. науки КазАТУ им. С. Сейфуллина. — 2012. — № 1(72). — С. 245–257.
9. Матушкина О.В. Особенности размножения смородины *in vitro*/О.В. Матушкина, И.Н. Пронина//Современное состояние культуры смородины и крыжовника: сб. науч. тр. — Мичуринск, 2007. — С. 285–289.
10. Медведева Т.В. Проблемы акклиматизации культивированных *in vitro* растений/Т.В. Медведева//Физиология і біохімія культурних рослин. — 2008. — Т. 40, № 4. — С. 299–309.

Надійшла 17.10.2016.