

## Клональное микроразмножение смородины черной (*Ribes nigrum* L.)

### Clonal propagation of black currant (*Ribes nigrum* L.)

Гусева К. Ю.

Guseva K. Yu.

Алтайский государственный университет, г. Барнаул, Россия. E-mail: kyuguseva@yandex.ru

Altai State University, Barnaul, Russia

**Реферат.** На этапе введения в культуру определена схема, обеспечивающая получение оздоровленного посадочного материала исследуемых сортов. Сорта смородины черной (*Ribes nigrum* L.) 'Памяти Кухарского' и 'Канакхама' характеризуются высокой регенерационной способностью в культуре *in vitro* (доля жизнеспособных эксплантов – 93,5 % и 96,4 % соответственно). На этапе собственно размножения было изучено влияние регуляторов роста (6-бензиламинопурина, гибберелловая кислота) на морфогенез растений-регенерантов смородины. Показано их влияние на такие морфологические показатели развития регенерантов, как высота (см), количество (шт./экспл.), средняя длина корней (см). На этапе укоренения была подобрана концентрация (0,5 мг/л) ауксина ( $\beta$ -индолмасляная кислота), введение которого в питательную среду обеспечивало максимальные показатели ризогенеза: количество и длину корней.

**Ключевые слова.** Клональное микроразмножение, регуляторы роста, смородина черная, собственно размножение, укоренение *in vitro*.

**Summary.** At the stage of transfer to soil, a scheme is defined that provides production of improved plantlets of the studied varieties. 'Kuharsky's Memory' and 'Kanakhama' black currant varieties are characterized by high regenerative capacity *in vitro* (the proportion of viable explants is 93.5 % and 96.4 %, respectively). At the multiplication stage, the influence of growth regulators (6-benzylaminopurine, gibberellic acid) on the morphogenesis of currant plantlets was studied. It shows their impact on such morphological indicators of development of plantlets as the height (cm), quantity, the average length of roots (cm). At the rooting stage, the concentration (0.5 mg/l) of auxin ( $\beta$ -indolylbutyric acid) was selected, the introduction of which into the rooting medium provided the maximum indicators of rhizogenesis: the number and length of roots.

**Key words.** Black currant, conal propagation, growth regulators, proper reproduction, rooting *in vitro*.

#### Введение

Смородина черная (*Ribes nigrum* L.) является ведущей ягодной культурой в Сибири. Ценность данной культуры определяется богатством биохимического состава ягод, высокой урожайностью, зимостойкостью, скороплодностью. В ягодах черной смородины содержатся биологически активные вещества, пектины, фенольные соединения, играющие важную роль в укреплении здоровья населения (Назарюк, 2000; 2009).

Традиционно *R. nigrum* размножают одревесневшими и зелеными черенками. Это требует больших экономических затрат и площадей для выращивания. Кроме того, смородина черная подвержена вирусным заболеваниям. Благодаря методам клонального микроразмножения (размножение в культуре *in vitro*) стало возможным получение безвирусного посадочного материала ягодных культур. Также основными преимуществами биотехнологических методов являются: высокий коэффициент размножения, быстрое размножение ценных клонов, возможность работы в течение всего года и планирования выпуска материала к определенному сроку, надежное выявление патогенов по специфическим белкам и/или нуклеиновым кислотам, длительное хранение материала в условиях *in vitro* и др. (Высоцкий, 2011; Лебедева, 2016).

Методы размножения *in vitro* разработаны для различных представителей рода *Ribes*. Однако они характеризуются видо- и сортоспецифичностью (Эрст, Вечернина, 2008). Основные стадии размножения *Ribes nigrum*: введение эксплантов в культуру *in vitro*, собственно размножение, укоренение *in vitro*.

Первичными эксплантами смородины черной могут служить меристематические верхушки 0,25–1,0 мм, выделенные из верхушечных и пазушных почек (Высоцкий, 1998; Эрст, Вечернина, 2008).

На этапе введения в культуру разные исследователи использовали в основном такой регулятор роста, как 6-бензиламинопуридин (6-БАП). Согласно исследованиям З. Т. Тарашвили, лучшие результаты на данном этапе были получены на среде с концентрацией 6-бензиламинопурина (6-БАП) – 0,5–1,0 мг/л (Тарашвили, 1985).

В работе А. А. Эрст показана возможность введения в культуру смородины золотистой на примере сорта 'Валентина' и установлено, что наиболее подходящей питательной средой для культивирования является среда по прописи Мурасиге–Скуга (МС), дополненная регуляторами роста – 5 мкМ 6-бензиламинопурина и 5 мкМ гибберелловой кислоты, содержащая в качестве источника углерода 3%-ю глюкозу. Использование такого состава питательной среды позволило увеличить длину развивающихся *in vitro* побегов (Эрст, 2010).

На этапе собственно размножения, как правило, используют среду МС. При этом основную роль при отработке оптимальных условий культивирования эксплантов *in vitro* играет соотношение и концентрация внесенных в питательную среду цитокининов и ауксинов. В работе Г. К. Оразбаевой и др. концентрация  $\beta$ -индолилмасляной кислоты в пределах 0,05–0,10 мг/л в сочетании с 0,5 мг/л 6-БАП оказали положительное влияние на размер регенерировавших побегов черной смородины.

Е. В. Колбанова и др. предлагают использовать на данном этапе питательную среду МС с добавлением сахарозы – 3 г/л, 6-БАП – 0,5 мг/л (Оразбаева и др., 2012; Колбанова и др., 2014).

Таким образом, в настоящее время методы клонального микроразмножения растений *in vitro* широко используются в системе ускоренного производства оздоровленного посадочного материала плодовых и ягодных культур. По сравнению с традиционными способами размножения применение биотехнологических приемов позволяет в короткие сроки получить в большом количестве посадочный материал, генетически идентичный материнскому растению, работать в лабораторных условиях круглый год и планировать выпуск растений к определенному сроку, длительно сохранять растительный материал в условиях *in vitro*.

В связи с этим целью данного исследования явилось изучение особенностей клонального микроразмножения смородины черной на этапах собственно размножения и укоренения *in vitro*.

### Материалы и методы исследования

Материалом исследования являлись 5–7-летние растения смородины черной 'Памяти Кухарского' и 'Канахама' селекции отдела «НИИСС им. М. А. Лисавенко» ФГБНУ ФАНЦА. Эксперимент проведен в 2017–2018 гг. в лаборатории биотехнологии растений Алтайского центра прикладной биотехнологии ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет». Метод работы основывался на общепринятых классических приемах работы с культурой изолированных тканей и органов растений (Вечернина, 2014). Первичными эксплантами служили верхушечные и пазушные почки однолетних одревесневших побегов. Поверхностную стерилизацию исходного растительного материала проводили по следующей схеме: 1) 70 %-й этанол – 3–5 с; 2) 0,1 %-й раствор лизоформина (20 мин.); 3) четырехкратное промывание в стерильной дистиллированной воде. Меристемы (1–1,5 мм, выделенные из почек с использованием стереомикроскопа МБС-9) помещали на питательную среду по прописи Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением регулятора роста 6-БАП в концентрации 5,0 мкМ и аскорбиновой кислоты (1 мг/л) в качестве антиоксиданта. В качестве источника углерода в среду добавляли глюкозу (30 г/л).

Экспланты культивировали в следующих условиях: фотопериод – 16/8 часов (свет/темнота), освещенность – 2–3 клк,  $22 \pm 1$  °С. Длительность пассажа составляла 30 суток. Фиксировали следующие показатели: коэффициент размножения (количество развившихся побегов у одного экспланта, шт./экспл.), длина побега, мм. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета при-

кладных программ Microsoft Office Excel 2007. В таблицах показаны средние арифметические величины и доверительные интервалы. Доверительность оцениваемых показателей принимали на уровне значимости  $P < 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

На этапе введения растений в культуру *in vitro* (изолирования тканей и органов растений) с последующим культивированием на искусственной питательной среде должны быть выполнены два обязательных условия: проведено освобождение растительного материала от источников микробиологического заражения питательной среды и получена надежная регенерация растений от изолированных эксплантов.

При введении в культуру *in vitro* исследуемые сорта характеризовались высокой регенерационной способностью: доля жизнеспособных эксплантов сорта 'Памяти Кухарского' составила 93,50 %, сорта 'Канахама' – 96,40 %. Процент контаминировавших эксплантов сорта 'Канахама' составил – 0,95 %, сорта 'Памяти Кухарского' – 0,80 %. Доля некротировавших эксплантов также была минимальна: сорт 'Канахама' – 2,65 %, сорт 'Памяти Кухарского' – 5,61 % (рис. 1, 2).

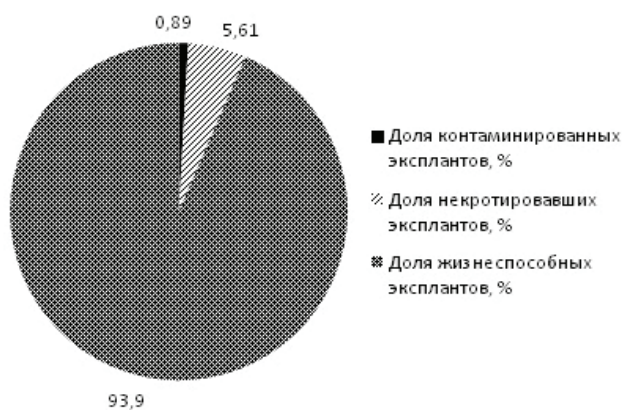


Рис. 1. Доля контаминированных, некротировавших и жизнеспособных эксплантов смородины черной 'Памяти Кухарского' при введении в культуру *in vitro*.

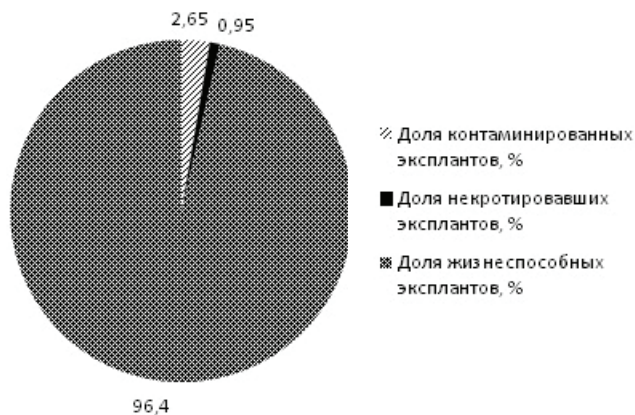


Рис. 2. Доля контаминированных, некротировавших и жизнеспособных эксплантов смородины черной 'Канахама' при введении в культуру *in vitro*.

За основу в наших исследованиях взята питательная среда по прописи Мурасиге и Скуга.

На этапе собственно размножения изучалось влияние различных концентраций (1,0; 3,0; 5,0; 10,0 мкМ) цитокинина, 6–бензиламнопурина (БАП), а также гибберелловой кислоты (ГК<sub>3</sub>) (2,5 и 5,0 мкМ) на рост и развитие микропобегов смородины черной. Эффективно при культивировании смородины черной добавление в питательную среду БАП и ГК<sub>3</sub>. Так, в работе Ruzic D. показано, что совместное использование вышеуказанных гормонов оказалось эффективным при культивировании *in vitro* черной смородины и ежевики (Ruzic, Lazic, 2006).

При изучении влияния БАП и ГК<sub>3</sub> на этапе собственно размножения на рост и развитие пазушных почек установлено, что максимальный стимулирующий эффект для изучаемых сортов достигается при введении в среду 5 мкМ БАП (табл. 1). Относительно высокие концентрации БАП (10 мкМ) индуцируют развитие большего количества пазушных почек, т.е. повышают коэффициент размножения.

Отмечено положительное влияние на морфологию развивающихся побегов ГК<sub>3</sub>. Только при культивировании пазушных почек смородины черной на среде, содержащей по 5 мкМ БАП и ГК<sub>3</sub>, у сорта 'Памяти Кухарского' длина побегов увеличилась почти в 2,5 раза по сравнению со средой, содержащей только 5 мкМ БАП (4,2 ± 0,6 мм против 10,4 ± 0,5 мм), у сорта 'Канахама' – в 2,4 раза (4,8 ± 0,4 мм против 11,5 ± 0,7 мм) (рис. 3).

Только при культивировании пазушных почек смородины золотистой на среде, содержащей по 5 мкМ БАП и ГК<sub>3</sub>, длина побегов увеличилась почти вдвое по сравнению со средой, содержащей только 5 мкМ БАП (8,2 ± 1,4 мм против 4,8 ± 0,6 мм) (рис. 4, 5).

Таблица 1

Влияние БАП на коэффициент размножения *Ribes nigrum* L. *in vitro*, n=10

БАП, мкМ	Сорт	
	Смородина черная 'Памяти Кухарского'	Смородина черная 'Канахама'
0	0	0
1,0	1,6 ± 0,5	2,1 ± 0,8
3,0	2,9 ± 0,6	3,0 ± 0,6
5,0	3,7 ± 0,7	3,8 ± 0,6
10,0	4,2 ± 0,5	4,4 ± 0,7

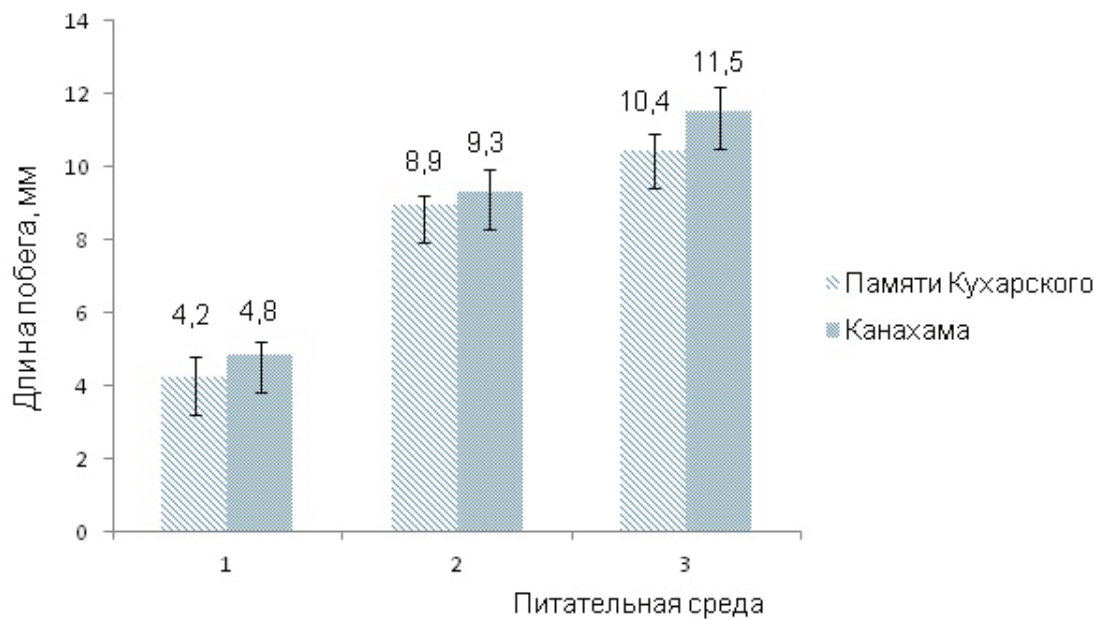


Рис. 3. Влияние БАП и ГК<sub>3</sub> на длину побега смородины черной: варианты питательных сред (1 – MS + 5 мкМ БАП; 2 – MS + 5 мкМ БАП + 2,5 мкМ ГК<sub>3</sub>; 3 – MS + 5 мкМ БАП + 5 мкМ ГК<sub>3</sub>).

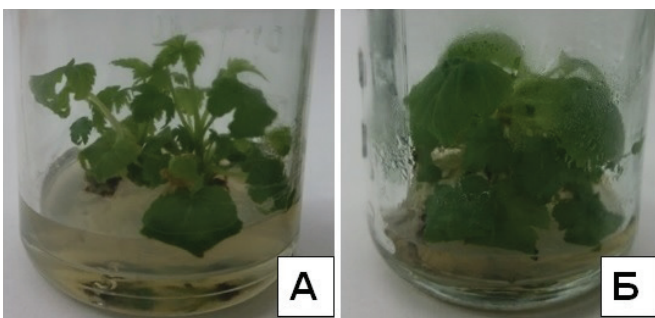


Рис. 4. Побеги *Ribes nigrum* L. 'Памяти Кухарского' *in vitro* на средах MS, содержащих БАП 5 мкМ (А); БАП 5 мкМ + ГК<sub>3</sub> 5 мкМ (Б).

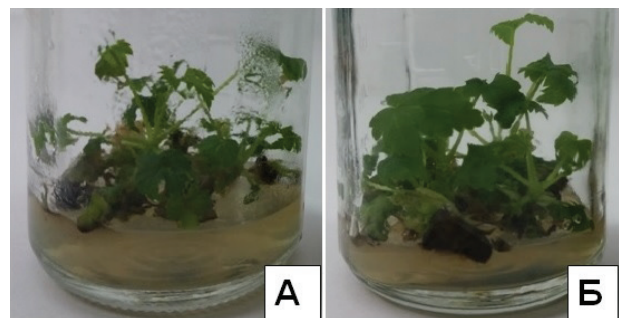


Рис. 5. Побеги *Ribes nigrum* L. 'Канахама' *in vitro* на средах MS, содержащих БАП 5 мкМ (А); БАП 5 мкМ + ГК<sub>3</sub> 5 мкМ (Б).

Смородина черная легко образует корни и на безгормональной среде, однако мелкие побеги без добавления регулятора роста отрастают медленно. Поэтому перед этапом укоренения используют промежуточный этап элонгации – удлинения побегов. Для этого в состав питательной среды вводят невысокую концентрацию цитокинина, что усиливает рост главного побега и уменьшает образование пазушных почек (Sedlak, Paprsein, 2012).



Для стимуляции корнеобразования культивируемых растений смородины *in vitro* в состав питательной среды рекомендуют вводить регуляторы роста ауксиновой природы и, кроме того, понижать содержание минеральных веществ в два раза. Авторами рекомендовано использование на этапе укоренения ауксина – β-индолилмасляной кислоты в концентрации 0,5 мг/л (Колбанова и др., 2014). На этапе ризогенеза *in vitro* доля укоренившихся микропобегов составила 100 % (табл. 2).

Таблица 2

Укоренение *in vitro* микропобегов смородины черной на питательной среде 1/2 МС с 0,5 мг/л ИМК

Параметр	Сорт	
	Смородина черная 'Памяти Кухарского'	Смородина черная 'Канахама'
Доля укоренившихся микропобегов, %	100 ± 0	100 ± 0
Среднее количество корней микропобега, шт.	5,90 ± 0,58	6,10 ± 0,64
Средняя длина корней микропобега, см	1,70 ± 0,15	1,85 ± 0,17
Средняя высота микропобега, см	1,59 ± 0,11	1,65 ± 0,16

В наших исследованиях средняя высота растения не превышала 1,59 см у сорта 'Памяти Кухарского' и 1,65 см у сорта 'Канахама'. Среднее количество корней на одно растение у сорта 'Памяти Кухарского' было не ниже 5,90 шт./экспл. и у сорта 'Канахама' – 6,10 шт./экспл. Средняя длина корней составила 1,85 см у сорта 'Канахама' и 1,70 см у сорта 'Памяти Кухарского'. Корневая система у обоих сортов была хорошо разветвленной, с большим количеством боковых корней.

### Заключение

В настоящее время методы клонального микроразмножения растений *in vitro* широко используются в системе ускоренного производства оздоровленного посадочного материала плодовых и ягодных культур. По сравнению с традиционными способами размножения применение биотехнологических приемов позволяет в короткие сроки получить в большом количестве посадочный материал, генетически идентичный материнскому растению, работать в лабораторных условиях круглый год и планировать выпуск растений к определенному сроку, длительно сохранять растительный материал в условиях *in vitro*.

Для стерилизации пазушных почек эффективно использовать 0,1 %-й раствор лизоформина (20 мин.) в сочетании с предварительной обработкой эксплантов 70 %-м этиловым спиртом. На этапе собственно размножения сортов *R. nigrum* оптимальной является питательная среда МС, дополненная БАП (5 мкМ), ГК<sub>3</sub> (5 мкМ), аскорбиновой кислотой (1,0 мг/л) и 3 %-ной глюкозой, на этапе укоренения – 1/2 МС, дополненная 0,5 мг/л ИМК.

### ЛИТЕРАТУРА

- Вечернина Н. А.** Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений: монография. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2014. – 251 с.
- Высоцкий В. А.** Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала и селекции плодовых и ягодных растений: Автореф. дис. ... д. с.-х. наук. – М., 1998. – 44 с. **Высоцкий В. А.** Биотехнологические приемы в современном садоводстве // Плодоводство и ягодоводство России, 2011. – Т. 26. – С. 3–10.
- Колбанова Е. В., Кухарчик Н. В., Тычинская Л. Ю., Сокол В. П.** Потребление и накопление микроэлементов растениями-регенерантами смородины черной (*Ribes nigrum*) на этапах микроразмножения и укоренения *in vitro* // Весті Національної академії наук Білорусі, 2014 – № 4. – С. 32–35.
- Лебедев А. А., Сковородников Д. Н.** Оптимизация условий клонального микроразмножения *Ribes nigrum* L. (*Grossulariaceae*) // Бюллетень Брянского отделения Русского ботанического общества, 2016. – № 1 (7). – С. 61–64.
- Назарюк Н. И.** Оценка новых алтайских сортов черной смородины в лесостепной зоне Алтайского края: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. – Барнаул, 2000. – 163 с.

**Назарюк Н. И.** Сладкоплодные сорта черной смородины // Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии им. В. Р. Филиппова, 2009. – № 3. – С. 91–94.

**Оразбаева Г. К., Хасанов В. Т., Искаков А. Р., Швидченко В. К.** Клональное размножение растений черной смородины (*Ribes nigrum* L.) *in vitro* // Вестник науки КазАТУ им. С. Сейфуллина, 2012 – № 1 (72). – С. 115–124.

**Тарашвили З. Т.** Ускоренное размножение черной и красной смородины методом *in vitro*: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. – М., 1985. – 22 с.

**Эрст А. А., Вечернина Н. А.** Размножение смородины золотистой *in vitro* // Вестник Алтайского государственного аграрного университета, 2008. – № 4 (42). – С. 10–14.

**Эрст А. А.** Особенности размножения *Ribes aureum* Pursh и *Vaccinium Uliginosum* L. в культуре *in vitro*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Новосибирск, 2010. – 165 с.

**Ruzic D., Lazic T.** Micropropagation as means of rapid multiplication of newly developed blackberry and black currant cultivars // Agric. Consp. Sci., 2006 –V. 71. – № 4. – P. 149–153.

**Sedlak J., Paprsein F.** *In vitro* establishment and proliferation of red currant cultivars // Hort. Sci., 2012. – Vol. 39. – № 1. – P. 21–25.