

РЕЗУЛЬТАТИВНОСТЬ ИНИЦИАЦИИ КУЛЬТУРЫ *IN VITRO* СОРТОВ СМОРОДИНЫ ЧЁРНОЙ (*RIBES NIGRUM* L.) СЕЛЕКЦИИ ФГБНУ ВНИИСПК

Т.М. Хромова , м.н.с.

В.В. Шахов, м.н.с.

Л.В. Ташматова, к.с.-х.н.

О.В. Мацнева, н.с.

ФГБНУ ВНИИ селекции плодовых культур, 302530, Россия, Орловская область, Орловский район, д. Жилина, ВНИИСПК, hromova@vniispk.ru

Аннотация

Важным этапом микроклонального размножения является этап инициации, или введения в культуру *in vitro*. Одними из важнейших условий успешности данного этапа являются освобождение растительного материала от источников микробиологического заражения питательной среды и получение надежной регенерации изолированных эксплантов. В данной статье представлены результаты исследований по введению смородины чёрной в культуру *in vitro* в летний и осенний периоды, а также рассмотрена эффективность использования различных стерилизующих веществ (0,1% раствор сулемы и 0,1% раствор мертиолата). Объектами исследования являются перспективные сорта селекции ВНИИСПК: Ажурная, Орловская серенада, Очарование, Чудное мгновение. Культивирование проводилось на модифицированной среде Мурасиге-Скуга с добавлением 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л, аскорбиновой кислоты 10 мг/л, тройного количества хелата железа. рН среды 6,0. Наиболее высокая приживаемость отмечалась у сортов Ажурная (96,2%), Очарование (96,2%) и Чудное мгновение (98,0%). Отмечено, что на приживаемость эксплантов оказывают влияние сортовые особенности, тип стерилизующего агента и период введения в культуру. Исследование результативности применения стерилизующих агентов показало, выход неинфицированных эксплантов выше при использовании 0,1% раствора сулемы. Выход жизнеспособных эксплантов выше при использовании 0,1% раствора мертиолата. Для сортов Ажурная и Очарование введение в культуру может проводиться как в летний, так и в осенний периоды с использованием обоих стерилизаторов. Для сорта Орловская серенада рекомендуется введение в культуру в осенний период с применением того или иного стерилизатора, в летний период – с применением 0,1% сулемы. Для сорта Чудное мгновение в летний период использовать 0,1% раствор мертиолата.

Ключевые слова: чёрная смородина; эффективность инициации; приживаемость; стерилизующий агент

THE EFFECTIVENESS OF THE INITIATION OF CULTURE *IN VITRO* OF VARIETIES OF BLACK CURRANT (*RIBES NIGRUM* L.) OF VNIISPK BREEDING

T. M. Khromova , research fellow

V. V. Shakhov, research fellow

L. V. Tashmatova, cand. agr. sci.

O.V. Mazneva, researcher

Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding, 302530, Russia, Orel region, Orel district, Zhilina, VNIISPK, hromova@vniispk.ru

Abstract

The stage of initiation or introduction into culture *in vitro* is an important stage of micropropagation. The deliverance of plant material from the sources of microbiological contamination of the nutrient medium and obtaining reliable regeneration of isolated explants are the one of the most important conditions for the success of this stage. The results of studies on the introduction of black currants into the culture *in vitro* in summer and autumn has been presented in this article, and the effectiveness of the use of various sterilizing substances (0.1% solution of sulema and 0.1% solution of mertiolate) also has been considered. Varieties of black current of VNIISPK breeding: Azhurnaya, Orlovskaya serenada, Ocharovanie, Chudnoe mgnovenie are promising the objects of research. The cultivation was performed on a modified Murashige-Skoog medium with the addition of 6-BAP in a concentration of 0.5 mg/l, ascorbic acid 10 mg/l, triple the number of chelate of iron. pH of the medium 6.0. The highest survival rate was observed for varieties Azhurnaya (96.2%), Ocharovanie (96.2%) and Chudnoe mgnovenie (98.0%). It is noted that the survival rate of explants is influenced by varietal characteristics, the type of sterilizing agent and the period of introduction into the culture. The study of the effectiveness of the use of sterilizing agents showed that the yield of uninfected explants is higher at use 0.1% solution of sulema. The yield of viable explants is higher at use 0.1% mertiolate solution. The introduction to the culture can be carried out both in summer and in autumn using both sterilizers for varieties of Azhurnaya and Ocharovanie. The introduction to the culture in the autumn with the use of both sterilizers and in the summer with use of 0.1% sulema is recommended for variety Orlovskaya Serenada. The use of 0.1% solution of mertiolate in the summer period have been recommended for variety Chudnoe mgnovenie.

Key words: black currant; initiation efficiency; survival; sterilizing agent

Введение

Для получения безвирусного материала многих видов растений все чаще используется одна из моделей клонального микроразмножения – индукция развития меристем из почек (Высоцкий, 2011). Она включает в себя несколько этапов, одним из которых является этап инициации *in vitro*. Этот этап включает в себя:

1. выбор маточных растений;
2. поверхностную стерилизацию растительного материала;
3. вычленение экспланта и помещение его на питательную среду;
4. культивирование экспланта в климатической комнате.

Ключевыми моментами на этом этапе являются освобождение растительного материала от источников заражения меристем и питательной среды и получение надежной регенерации растений от изолированных эксплантов. В настоящее время для выполнения первого условия исследователями рекомендуется довольно большое число стерилизующих агентов и схем стерилизации. Для различных культур, в том числе и для смородины чёрной, часто используют ртутьсодержащие препараты: сулему, мертиолат; хлорсодержащие: гипохлорит кальция, «Белизна»; 33% перекись водорода, нитрат серебра (Шевелуха, 1998; Колбанова, Кухарчик, 2011; Семенас, 2012; Оразбаева и др., 2012; Мацнева, 2018).

В качестве источника меристем для черной смородины рекомендуют использовать апикальные и латеральные почки с однолетних побегов в период выхода из покоя (февраль – начало апреля) и в период затухания роста (конец августа – начало сентября) (Сковородников, 2011; Кухарчик, 2016; Шахов и др., 2017).

Таким образом, мы видим, что для инициации черной смородины в культуре *in vitro* на этапе введения используют разнообразные методики, но часто на успех этого периода оказывают влияние и генетические особенности того или иного сорта.

Целью настоящих исследований являлось изучение развития эксплантов сортов чёрной смородины селекции ФГБУ ВНИИСПК на первом этапе клонального микроразмножения в зависимости от генотипа, типа стерилизующего веществ и срока введения в культуру.

Материалы и методика исследований

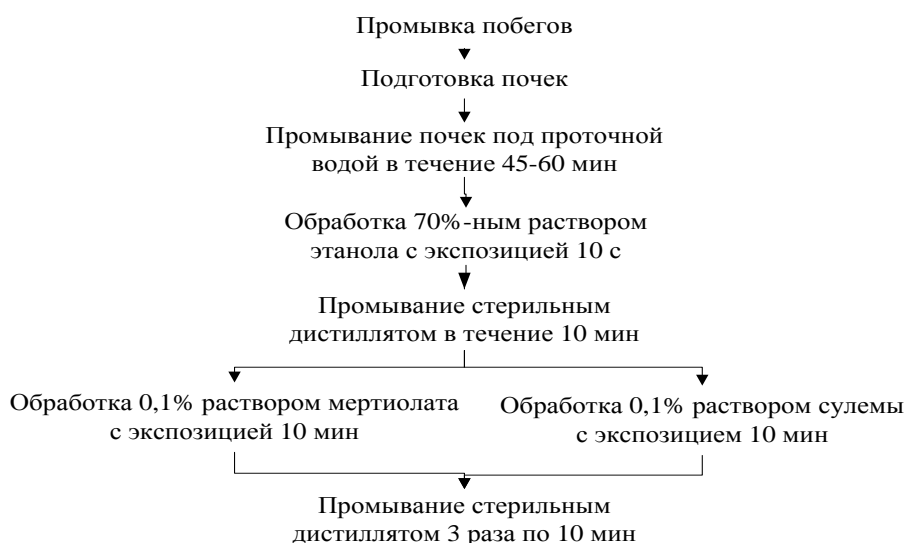
Объекты исследований: перспективные сорта смородины чёрной среднего срока созревания селекции ВНИИСПК: Ажурная, Орловская серенада, Очарование, Чудное мгновение. Все перечисленные сорта отличаются стабильной урожайностью, зимостойкостью, скороплодностью и самоплодностью, устойчивостью к мучнистой росе, пригодностью к механизированной уборке.

Исследования проводились согласно общепринятым методикам (Джигадло, 2005; Кухарчик, 2016).

Введение в культуру *in vitro* осуществлялось в летний (июнь) и осенний (начало сентября) сроки введения.

В качестве исходного материала летом использовались активно растущие верхушки однолетних побегов, осенью – верхушки побегов в период затухания роста.

Стерилизацию растительного материала проводили по схеме:



После стерилизации экспланты помещались в раствор аскорбиновой кислоты (3 г/л) с целью снижения эффекта фенольного окисления среды.

После вычленения экспланты высаживались на среду Мурасиге-Скуга с добавлением БАП в концентрации 0,5 мг/л, аскорбиновой кислоты 10 мг/л, тройного количества хелата железа. рН среды 6,0.

Культивирование эксплантов проводилось при освещённости 2000...2500 лк, температуре 22°C, фотопериоде 16/8 ч.

Результаты и их обсуждение

Необходимым условием на этапе инициации является освобождение источников эксплантов от возможного заражения. Стерилизация проводилась двумя видами стерилизующих агентов: 0,1% раствором мертиолата и 0,1% раствором сулемы.

В ходе исследования отмечено, что на эффективность инициации культуры *in vitro* оказывают влияние эффективность действия стерилизующих веществ, сроки введения в культуру и сортовые особенности.

При введении меристем в летний период отмечалось выделение фенолов в питательную среду у всех исследуемых сортов, что объясняется активными ростовыми процессами. Для снятия негативного воздействия на приживаемость проводилась пересадка эксплантов на свежую питательную среду через 24 ч. Осенью фенольного окисления питательной среды в месте соприкосновения с эксплантом не наблюдалось.

В зависимости от стерилизующего вещества в летний и осенний периоды введения учитывалось количество инфицированных и нежизнеспособных эксплантов (таблицы 1, 2).

Таблица 1 – Результативность применения 0,1% сулемы на этапе введения в культуру сортов смородины чёрной, %

Сорт	Периоды введения					
	Летний период			Осенний период		
	Некроз	Контаминация	Приживаемость	Некроз	Контаминация	Приживаемость
Ажурная	3,8	–	96,2	12,0	2,0	86,0
Орловская серенада	6,0	6,0	88,0	6,0	10,0	84,0
Очарование	3,8	–	96,2	12,0	6,0	82,0
Чудное мгновение	39,6	1,9	58,5	2,0	–	98,0
Среднее	13,3	2,0	84,7	8,0	4,5	87,5

Таблица 2 – Результативность применения 0,1% мертиолата на этапе введения в культуру сортов смородины чёрной, %

Сорт	Периоды введения					
	Летний период			Осенний период		
	Некроз	Контаминация	Приживаемость	Некроз	Контаминация	Приживаемость
Ажурная	5,7	1,9	92,5	10,4	8,3	81,3
Орловская серенада	6,1	51,0	42,9	2,0	4,0	94,0
Очарование	8,2	4,1	87,7	–	6,5	93,5
Чудное мгновение	–	18,9	81,1	5,7	–	94,3
Среднее	5,0	19,0	76,0	4,5	4,7	90,8

Из всех предложенных вариантов стерилизации и периодов введения в среднем по сортам наибольшее число жизнеспособных эксплантов получено в осенний период. При этом существенных различий по приживаемости при стерилизации обоими агентами не выявлено: при обработке сулемой – 87,5%, мертиолом – 90,8% на фоне небольшой контаминации (4,5 и 4,7% соответственно).

Наибольшее число погибших эксплантов наблюдали в летний период при использовании 0,1% раствора сулемы (13,3%), что объясняется большей открытостью меристем и более жёстким воздействием стерилизующего агента на растительные ткани. В то же время, данное вещество имело более выраженный стерилизующий эффект (доля контаминации – 2,0%).

Сравнительный анализ действия стерилизаторов на растительные материал показал большую токсичность 0,1% раствора сулемы независимо от периода введения (13,3% и 8,0%). В связи с этим, в последующих исследованиях можно использовать более низкую концентрацию сулемы.

Прослеживается сортовая специфичность эксплантов на этапе введения в культуру *in vitro*. Наиболее результативной оказалась инициация сортов Ажурная и Очарование: 96,2%, 92,6% при стерилизации сулемой; 92,5% и 87,8% при стерилизации мертиолатом. Низкая приживаемость отмечена у сортов Орловская серенада (42%) при обработке мертиолатом, Чудное мгновение (58,5%) – сулемой.

Внешний вид эксплантов описывался спустя 3...4 недели при пересадке на свежую питательную среду. Характеризовались внешний вид и цвет растений, степень сформированности побегов, наличие дополнительных побегов, наличие или отсутствие некротических повреждений и витрификации.

В летний период введения экспланты сорта Ажурная, прошедшие стерилизацию раствором мертиолата, достигали размера 3...5 мм, отдельные растения – до 9 мм. Побеги светло-зелёные, слабо развиты, дополнительные не образовывались. На отдельных листочках наблюдали очаги некроза. Экспланты, прошедшие стерилизацию раствором сулемы, достигали размеров 3...8 мм, имели зелёную окраску и сформированные побеги. Витрификация в обеих повторностях не наблюдалась (рисунок 1).

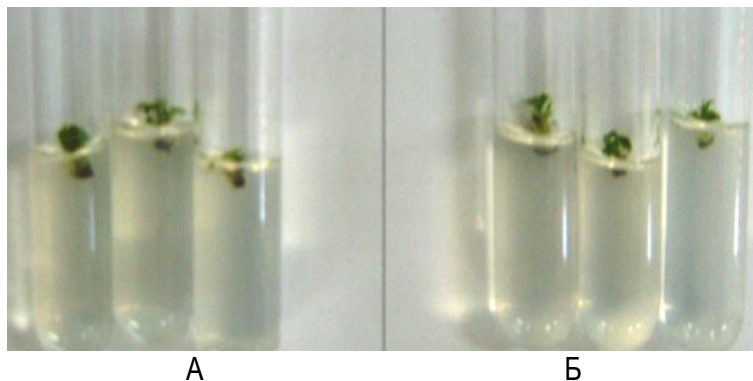


Рисунок 1 – Экспланты сорта Ажурная (летний срок введения) после обработки мертиолатом (А) и сулемой (Б)

В осенний срок введения экспланты сорта Ажурная, обработанные раствором мертиолата, характеризуются разной степенью развития и достигали размера 7 мм. Растения светло-зелёные, витрификация отсутствовала. Наблюдалось отмирание нижней части побега. Экспланты, обработанные сулемой, более развитые, до 9 мм. Витрификация отсутствовала. Дополнительные побеги не образовывались.

Экспланты сорта Орловская серенада в обоих вариантах опыта не имели существенных различий по внешнему виду. Размер побегов – от 4 до 6 мм, растения зелёные, хорошо сформированные, без следов некроза и витрификации. Образование дополнительных побегов не наблюдалось (рисунок 2).

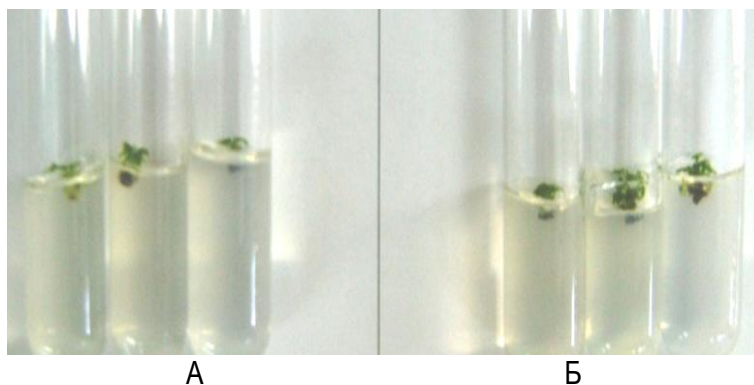


Рисунок 2 – Экспланты сорта Орловская серенада (летний период введения) после обработки мертиолатом (А) и сулемой (Б)

В осенний период введения экспланты сорта Орловская серенада в обоих вариантах стерилизации характеризовались отсутствием витрификации, относительно равномерным развитием. Отдельные побеги имели длину до 7 мм. У некоторых эксплантов наблюдалось образование каллуса с последующим отмиранием нижней части побега, негативное действие устранялось при дальнейшей пересадке на свежую питательную среду.

Экспланты растений сорта Очарование в летний период в варианте с использованием сулемы характеризовались сформированностью побегов, зелёным цветом листочков. Витрификация отсутствовала. Размер – от 3 до 6 мм. В варианте с использованием мертиолата растения высотой от 2 до 5 мм, от светло-зелёных до зелёных. Побеги у отдельных эксплантов были слабо сформированы, витрификация отсутствовала (рисунок 3).

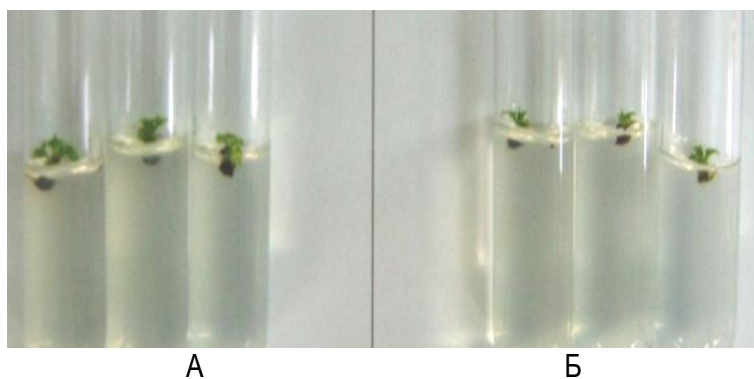


Рисунок 3 – Экспланты сорта Очарование (летний период введения) после обработки мертиолатом (А) и сулемой (Б)

Экспланты растений сорта Очарование в осенний период отличались неравномерным ростом и слабым развитием. Размер микропобегов от 6 до 7 мм. Витрификация отсутствовала.

Растения сорта Чудное мгновение в варианте с использованием мертиолата имели достаточно сформированные побеги зелёного цвета от 4 до 5 мм. В варианте с использованием сулемы на листьях отдельных эксплантов наблюдались участки некроза. В целом же растения зелёные, со сформированными побегами от 3 до 6 мм (рисунок 4).

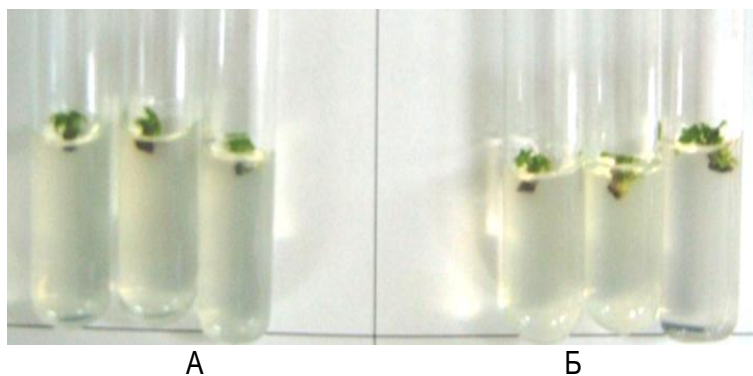


Рисунок 4 – Экспланты сорта Чудное мгновение (летний период введение) после обработки мертиолатом (А) и сулемой (Б)

В осенний период введения растения сорта Чудное мгновение характеризовались более интенсивной регенерацией дополнительных побегов и активным ростом. Длина микропобегов до 10 мм. Витрификация отсутствовала.

Выводы

На основании проведённых исследований можно сделать следующие выводы:

На приживаемость эксплантов оказывают влияние три фактора: сортовые особенности, тип стерилизующего агента и период введения в культуру.

Наилучшим периодом введения эксплантов смородины чёрной является период затухания роста однолетних побегов (середина сентября).

Выход неинфицированных эксплантов выше при использовании 0,1% раствора сулемы.

Выход жизнеспособных эксплантов выше при использовании 0,1% раствора мертиолата.

В осенний период для всех исследуемых сортов возможно применение обоих стерилизующих веществ.

В летний период введения сорта Орловская серенада для исключения заражённости эксплантов рекомендуется использование 0,1% раствора сулемы, у сорта Чудное мгновение для снижения процента гибели меристем – 0,1% раствора мертиолата

Литература

1. Высоцкий В.А. Биотехнологические методы в современном садоводстве. // Плодоводство и ягодоводство России. 2011, Т.26. С. 3-10
2. Джигadlo, Е.Н., Джигadlo, М.И., Голышкина, Л.В. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами. Орел: Изд-во ВНИИСПК. 2005. 49с.
3. Колбанова, Е.В., Кухарчик, Н.В. Клональное микроразмножение смородины черной сорта Санюта. Плодоводство и ягодоводство России. 2011, Т.26. С. 222-229.
4. Кухарчик Н.В., Кастрицкая М. С., Семенас С. Э, Колбанова Е. В., Красинская Т. А., Волосевич Н. Н., Соловей О. В., Змушко А. А., Божидай Т.Н, Рундя А. П., Малиновская А. М. Размножение плодовых и ягодных растений в культуре *in vitro*. / под общ. ред. Н. В. Кухарчик. Минск: Беларуская навука. 2016. 208 с.
5. Мацнева О.В., Ташматова Л.В., Шахов В.В. Эффективность применения стерилизующих агентов для эксплантов земляники. Селекция и сорторазведение садовых культур. 2018. Т5, №1. С.71-73.

6. Оразбаева Г.К., Хасанов В.Т., Исаков А.Р., Швидченко В.К. Клональное размножение растений чёрной смородины (*Ribes nigrum* L.) *in vitro*. Вестник науки КазАТУ им. С.Сейфуллина. 2012. №1(72). С. 115-124.
7. Семенас С.Э., Кухарчик Н.В. Методика клонального микроразмножения сортов земляники. Плодоводство. 2000. Т. 13. С.138-145.
8. Сквородников Д.Н., Сазонов Ф.Ф. Особенности клонального микроразмножения смородины черной. Плодоводство и ягодоводство России. 2011, Т.26. С. 396-400.
9. Шахов В.В., Ташматова Л.В., Мацнева О.В. Сравнительная характеристика сроков введения эксплантов чёрной смородины (*Ribes nigrum* L.) в культуру *in vitro*. Современное садоводство – Contemporary horticulture. 2017. №4. 102-105. DOI: 10.24411/2218-5275-2017-00039
10. Шевелуха В.С. Сельскохозяйственная биотехнология. М.: Высшая школа. 1998. 416 с.

References

1. Vysotsky, V.A. (2011). Biotechnological methods in contemporary horticulture. *Pomiculture and small fruits culture in Russia*, 26, 3-10. (In Russian, English abstract).
2. Dzhigadlo, E.N., Dzhigadlo, M.I. & Golyshkina, L.V. (2005). *Methodical recommendations for using biotechnological methods in work with fruit, berry and ornamental crops*. Orel: VNIISPK. (In Russian).
3. Kolbanova, E.V., & Kukharchik, N.V. (2011). Clonal micropropagation of black current variety Sanuta. *Pomiculture and small fruits culture in Russia*, 26, 222-229. (In Russian, English abstract).
4. Kukharchik, N.V., Kastrikskaya, M.S., Semenas, S.E., Kolbanova, E.V., Krasinskaya, T.A., Volosevich, N.N., Solovei, O.V., Zmushko, A.A., Bozhidai, T.N., Rundya, A.P. & Malinovskaya, A.M. (2016). *Reproduction of fruit and berry plants in culture in vitro*. Minsk: Belaruskaya navuka. (In Russian)..
5. Matzneva, O.V., Tashmatova, L.V., & Shakhov, V.V. (2018). Efficiency of using sterilizing agents for strawberry explants. *Breeding and variety cultivation of fruit and berry crops*, 5(1), 71-73. (In Russian, English abstract).
6. Orazbaeva, G.K., Khasanov, V.T., Isakov, R.A., & Shvidchenko, V.K. (2012). Clonal reproduction of black currant plants (*Ribes nigrum* L.) *in vitro*. *The bulletin of science of S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University*, 1(72), 115-124. (In Russian).
7. Semenas, S.E., & Kukharchik, N.V. (2000). Methods of micropropagation of strawberry cultivars. *Fruit growing*, 13, 138-145. (In Russian).
8. Skovorodnikov, D.N., & Sazonov, F.F. (2011). Features of clonal micropropagation of black currant. *Pomiculture and small fruits culture in Russia*, 26, 396-400. (In Russian, English abstract).
9. Shakhov, V.V., Tashmatova, L.V., & Matzneva, O.V. (2017). Comparative characteristic of timing of black currant explant introduction into culture *in vitro*. *Sovremennoe sadovodstvo – Contemporary horticulture*, №4, 102-105. <https://doi.org/10.24411/2218-5275-2017-00039> (In Russian, English abstract).
10. Shevelukha, V.S. (Ed.) (1998). *Agricultural biotechnology*. Moscow: High School. (In Russian)