

**МОРФОГЕНЕЗ СМОРОДИНИ ЧОРНОЇ (*RIBES NIGRUM* L.)
В УМОВАХ IN VITRO**

**О. Л. КЛЯЧЕНКО, кандидат біологічних наук, доцент,
О. П. СКОП, студент бакалаврату, напрям підготовки
«Біотехнологія»**

**Національний університет біоресурсів і природокористування
України**

E-mail: Klyachenko@ukr.net

Анотація. У статті викладено теоретичні основи і практичні аспекти мікроклонального розмноження смородини чорної, яке дедалі ширше застосовують у сільському господарстві для збільшення коефіцієнта розмноження і оздоровлення рослин. У даному матеріалі викладено техніку роботи з культурами клітин, тканин, органів рослин та індукції морфогенезу в культурі *in vitro*, а також подано склад поживних середовищ, які найчастіше використовують для мікроклонального розмноження.

Ключові слова: морфогенез, чорна смородина, *in vitro*, мікроклональне розмноження, експлантат, поживне середовище.

Актуальність. Смородина чорна є цінною ягідною культурою. Однак комплекс шкідливих організмів та збудників хвороб, серед яких значного поширення набули віруси, призводить до зниження її високих і сталих врожаїв.

Комплексний підхід до проблеми оздоровлення насаджень дає можливість за короткий термін створити безвірусний вихідний матеріал і отримати якісний посадковий матеріал смородини чорної [2, 6].

Оскільки традиційні методи вегетативного розмноження смородини не виявляють здатності до ефективного оздоровлення рослин, уражених вірусними інфекціями, на сьогодні важливого значення набуває високо результативний метод мікроклонального розмноження – головна складова сучасних біотехнологій клонування рослинного матеріалу. Однак для повної реалізації біологічного потенціалу рослин необхідно проводити всебічне дослідження з оптимізації їх культивування на штучних живильних середовищах в умовах *in vitro* [4].

Досягнення прогресу у сфері генної та клітинної біотехнології рослин пов'язане безпосередньо з розробленням фундаментальних основ культивування клітин і тканин *in vitro*. При цьому особливо

цікавим є підбір оптимального живильного середовища, встановлення типу і розміру експлантатів, а також режиму культивування з метою виявлення тотипотентності. Ця унікальна властивість соматичних клітин проявляється у різних культур, серед яких значну частину становлять рослини з вегетативним типом розмноження. Насамперед до них належать овочеві та декоративні культури, кількість яких з кожним роком зростає. Тому вивчення теоретичних основ і розроблення прикладних аспектів культури клітин і тканин багаторічних рослин, зокрема плодово-ягідних, є досить актуальними для розроблення і створення біотехнологій їх прискореного розмноження, отримання соматичних гібридів і трансгенних рослин [5, 6].

Метою наших досліджень було вивчення поширення патогенних вірусів у насадженнях смородини чорної та розроблення оптимальних методів отримання оздоровленого посадкового матеріалу.

Матеріали і методи дослідження. Об'єктом для досліджень культивування *in vitro* були рослини колекційних українських сортів чорної смородини НУБіП України Пам'ятна та Прем'єра [10].

Одержання асептичного рослинного матеріалу є найголовнішим фактором, тому що необхідно знешкодити патогенну мікрофлору, не порушуючи при цьому перебігу фізіолого-біохімічних процесів у рослинних тканинах.

У дослідженнях було апробовано стерелізувальні розчини: 70% етанол, 0,1%-ий розчин сулеми (HgCl_2), 2,5%-ий розин NaClO . Після оброблення стерелізувальним агентом експлантати промивали тричі стерильною дистильованою водою і вводили в культуру на безгормональне, агаризоване живильне середовище за прописом Мурасіге-Скуга, рН якого утримували на рівні 5,6-5,8 [2].

Результати дослідження та їх обговорення. На підставі проведених досліджень встановлено, що успішне введення в культуру *in vitro* бруньки з 1-2 листками найперше визначається ефективністю стерилізації. Порівняльний аналіз дії різних стерелізувальних агентів показав, що в разі використання 0,1%-го розчину сулеми за експозиції протягом 15хв ми отримали найбільший відсоток регенераційно здатних експлантатів (табл. 1): Прем'єра – 73,3%, Пам'ятна – 86,7%. Усі експлантати виявили морфогенетичну активність (рис. 1).



Рис. 1. Регенераційно здатні експлантати смородини чорної

За використання 2,5%-го розчину NaClO (експозиція 10 хв) спостерігали низький відсоток стерильного матеріалу. Ефективність стерилізації в цьому випадку для сорту Прем'єра становила 40%, а для сорту Пам'ятна 33,5%. Необхідно відзначити, що при цьому спостерігалися грибна і бактеріальна інфекції навколо експлантатів на живильному середовищі (рис. 2).



Рис. 2. Грибна та бактеріальна інфекції експлантатів

1. Ефективність способів стерилізації при введенні експлантатів смородини чорної в культуру *in vitro*

Назва сорту	Час стерилізації, хв	Загальна кількість експлантатів, шт.	Кількість життєздатних асептичних експлантатів, шт.	Ефективність стерилізації на 14-у добу культивування, %
Прем'єра	15	30	22	73,3
Пам'ятна	15	30	26	86,7

Для перепасирування в культурі *in vitro* вже стерильних розеток використовували живильне середовище за прописом МС без додавання регуляторів росту. Кількість висадженого матеріалу становила 60 штук для всіх досліджуваних генотипів та видів стерилізації. Рослинний матеріал культивували в термальній кімнаті за температури 25°C із 16-годинним фотоперіодом. Протягом 7-14 днів вибраковували інфіковані рослини, асептичні рослини-клони переносили на середовище МС з додаванням фітогормонів для подальшого культивування [2].

Для вирощування експлантату важливим етапом є успішне проходження процесів морфогенезу. У цей час особливо увагу треба приділяти оптимізації умов живлення. Для цього до складу поживного середовища додавали, крім мінеральних солей і вуглеводів, амінокислоти та фітогормони.

Коли додавали в живильне середовище гормональний комплекс БАП, кінетин, ГК – 0,2 г/л [5], спостерігали утворення найбільшої кількості добре розвинених мікроклінів (Прем'єра – 90%, Пам'ятна –

80%). Нормально розвинені проростки мали потовщене стебло, насичене зелене забарвлення. Висота рослини сягала 1,5-2см (рис. 2)



Рис. 2 Нормально розвинені проростки смородини чорної

Проте при додаванні до середовища гормонів росту НОК, БАП, ГК у кількості 0,1-0,2 мг/л у 40% мікроклонів спостерігалось пригнічення росту та утворення калюсної маси білого забарвлення [8].

2. Вплив регуляторів росту на етапі розмноження експлантів смородини чорної

Гормональний склад середовища, мг/л	Загальна кількість, шт.	Отримано проростків			
		Прем'єра		Пам'ятна	
		шт.	%	шт.	%
БАП, ГК, Кінетин – 0,1	30	27	90%	24	80%
НОК, БАП, ГК-0,1	30	18	60%	13	43,3%
НОК,БАП, ГК – 0,2	30	16	53,3%	10	33,3%

Наступним етапом нашої роботи була індукція коренеутворення у пагонів. Для розмноження і вкорінення рослин-регенерантів чорної смородини *in vitro* використовували модифіковане нами живильне середовище, в якому концентрацію мінеральних солей за прописом Мурасіге і Скуга зменшували в 2 рази. Кількість сахарози – 0,5-1,0%. Для коренеутворення використовували β-індолілмасляну кислоту (ІМК), ІОК або НОК у концентрації 0,5-1,0 мг/л [7].



Рис 3. Укорінення рослин-регенерантів смородини чорної

При адаптації рослин-регенерантів до ґрунтових умов здійснювали такі заходи. Кореневу систему рослини відмивали від агару у слабкому розчині перманганату калію (KMnO_4), і під час посадки підрізали до довжини 2-2,5 см. Рослини накривали поліетиленовою плівкою для створення умов 100%-ої вологості. Через 2 тижні вологість зменшували до 70-80% [3]. Початок нового зростання адаптованих рослин-регенерантів свідчить про завершення процесу адаптації. Результати приживлюваності (вкорінення) пробіркових рослин чорної смородини на різних типах субстрату показали, що всі досліджувані типи субстратів перевищили контроль. Згідно з нашими дослідженнями найбільш сприятливим для приживлюваності пробіркових рослин чорної смородини в нестерильних умовах був субстрат із торфу і перліту (1:1).

Отже, в ході досліджень ми оптимізували технологію розмноження *in vitro* смородини чорної сортів Прем'єра та Пам'ятна.

Висновки і перспективи

1) Установлено, що найефективнішою стерелізувальною речовиною для досліджуваних сортів чорної смородини є 0,1%-ий розчин HgCl_2 за експозицією 15 хв. Кількість регенераційно здатних експлантів становила 80-90%.

2) Для активації органогенезу смородини чорної нами оптимізовано склад живильного середовища МС. Показано, що активація росту пазушних меристем та індукція ризогенезу рослин смородини сортів смородини Пам'ятна та Прем'єра відбувається в разі застосування комплексу таких регуляторів росту, як БАП, кінетин, ГК – 0,2 г/л.

3) Отримані рослини-регенеранти досліджуваних сортів смородини чорної з оптимально розвиненою кореневою системою та вегетативною масою висаджували на стерильний субстрат для подальшої адаптації в умовах закритого ґрунту, серед компонентів

якого найбільш ефективною була суміш торфу і проліну у співвідношенні 1:1.

Список використаних джерел

1. Атрощенко Г. П. Научные основы ускоренного оздоровления и размножения смородины при производстве элиты: Автореф. дис. ... докт. с.-х. наук: 06.01.07 / Г. П. Атрощенко; Мичуринская гос-я с.-хю акад-я. – Мичуринск, 1995 – 57 с.
2. Колбанова Е. В. Методика микроразмножения смородины чёрной *in vitro* / Е. В. Колбанова, Н. В. Кухарчик // Плодоводство: Сб. науч. ст. / Инст-т плодоводства нац-й акад-ии наук Беларуси. – Самохваловичи, 2006. – Т.2. – Ч.2. – С. 163-168.
3. Колбанова Е. В., Кухарчик Н. В. Технология создания оздоровленного маточного насаждения смородины чёрной в республике беларусь РУП «Институт плодоводства», ул. Ковалева, 2, пос. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь, e-mail: Kolbanova@tyt.by, Kychnataly@rambler.ru
4. Матушкина О. В. Особенности размножения смородины *in vitro* / О. В. Матушкина, И. Н. Пронина // Современное состояние культур смородины и крыжовника: Сборн. науч. труд. Мичуринск: Мичуринск, 2007. – С. 285-289.
5. Мельничук М. Д. Фітовірусологія. навчальний посібник. – К.: Поліграф Консалтинг, 2005. – 200с.
6. Оразбаева Г. К. Клональное размножение растений черной смородины (*Ribes nigrum* L.) *in vitro* / Г. К. Оразбаева, В. Т. Хасанова, А. Р. Исаков, В. К. Швидченко // Вестник науки КазАТУ им. С. Сейфулина, - 2012.-№1.
7. Сіленко О. В. Придатність сортів смородини (*Ribes nigrum* L.) селекції НУБіП України до механізованого збирання ягід / В. О. Сіленко, П. М. Гав'юк / Сортовивчення та сортознавство. – 2013. - №3. - С. 13-17.
8. Сковородников Д. Н. Особенности клонального микроразмножения смородины чёрной / Д. Н. Сковородников, Ф. Ф. Сазонов // Плодоводство и ягодоводство России: Сб. науч. работ / ВСТИСП. – М., 2011.-Т. XXVI. – С. 395-400.
9. Титаренко Т. Е. Оптимизация методов введения в культуру *in vitro* некоторых ягодных культур-смородины черной (*Ribes nigrum* L.), смородины красной (*Ribes rubrum* L) и крыжовника (*Ribes uvacrispa* L.) / Т. Е. Титаренко // Біотехнологія. Наука. Освіта. Практика: тез. доп. IV Междунар. Науч.-практ. Конф. (Днепропетровск, 11-13 ноября 2008р.). – Днепропетровск, 2008. – С. 174-175.
10. Шеренговий П. З. Моє життя в моїх сортах / П. З. Шеренговий. - Вінниця, 2011. - 168 с.

References

1. Atroschenko G.P. Scientific basis for accelerated healing and reproduction currant in the production of the elite: Author. Dis. ... Doctor.

agricultural Sciences: 06.01.07 / G.P. Atroschenko; Michurin State Agriculture Academy. – Michurinsk, 1995 – 57 p.

2. Kolbanova E.V. Methods of microreproduction of black currant *in vitro* / E.V. Kolbanova, N.V. Kucharchik // Horticulture: Coll. Scientific. Art. / Horticulture Institute of National Academy of Science of Belarus. – Samokhvalovich, 2006. – Vol. 2. – P. 2. – P. 163-168.

3. Matushkina O.V. Features of black currant reproduction *in vitro* / O.V. Matushkina, I.N. Pronina // Current status of crops currant and gooseberry: the national team. Scientific work. Michurinsk: Michurinsk, 2007. - P. 285-289.

4. Melnichuk M.D. Viruses of plants. Manual. - K: Poligraf Consalting, 2005. – 200 p.

5. Orazbayeva G.K. Clonal plants reproduction of black currant (*Ribes nigrum* L.) *in vitro* / G.K. Orazbayeva, V.T. Khasanov, A.R. Isakov, V.K. Shvidchenko // Bulletin of Science KazATU them. S. Seifullin, - 2012. - № 1.

6. Silenko O.V. Suitability varieties of currants (*Ribes nigrum* L.) breeding NUBiP Ukraine for mechanical harvesting berries / V.A. Silenko, P.M. Hav`yuk / Sort studying. – 2013. - №3. - P. 13-17.

7. Skovorodnikov D.N. Features of clonal micropropagation of black currant / D.N. Skovorodnikov, F.F. Sazonov // Fruit and berry-culture of Russia: Coll. scientific. work / VSTISP. – M., 2011. - Vol. XXVI. – P. 395-400.

8. Titarenko T.E. The optimization of methods of introduction in culture *in vitro* some berries – black current (*Ribes nigrum* L.), red current (*Ribes rubrum* L.) and gooseberry (*Ribes uvacrispa* L.) / T.E. Titarenko // The biotechnology. Science. Education. Practice: Thesis of Report of IV International Scientific-Practical Conference (Dnepropetrovsk, 11-13 November, 2008). – Dnepropetrovsk, 2008. – P. 174-175.

9. Sherengoviy P.Z. My life is in my grades / P.Z. Sherengoviy. - Vinnitsia, 2011. - 168 p.

МОРФОГЕНЕЗ СМОРОДИНЫ ЧЕРНОЙ (*RIBES NIGRUM* L.) В УСЛОВИЯХ IN VITRO

О. Л. Кляченко, О. П. Скоп

Аннотация. В статье изложены теоретические основы и практические аспекты микроклонального размножения смородины черной, которое все шире применяют в сельском хозяйстве для увеличения коэффициента размножения и оздоровления растений. В данном материале изложено технику работы с культурами клеток, тканей, органов растений и индукции морфогенеза в культуре *in vitro*, а также представлены состав питательных сред, которые чаще всего используют при микроклональном размножении.

Ключевые слова: морфогенез, черная смородина, *in vitro*, микроклональное размножение, эксплантат, питательная среда.

MORPHOGENESIS BLACK CURRANT (RIBES NIGRUM L.) IN CONDITIONS IN VITRO

O. Klyachenko, O. Skop

Abstract. *The article provides the theoretical bases and practical aspects of microclonal reproduction of black currants, which is increasingly used in agriculture to upgrade the rate of reproduction and recovery of plants. The author describes the technique of working with cell cultures, tissues, organs of plants, as well as the induction of morphogenesis in the crop in vitro. It is also described the composition of culture media, which are often used in microclonal reproduction.*

Keywords: *morphogenesis, black currant, in vitro, microclonal reproduction, explants, culture medium.*