

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ В УСКОРЕНИИ СЕЛЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА СМОРОДИНЫ ЧЁРНОЙ

Д.Н. СКОВОРОДНИКОВ

ФГБОУ ВПО Брянская ГСХА,
243365 Россия, Брянская обл.,
Выгоничский р-он, с. Кокино,
ул. Советская, 1

E-mail: skovorodnikov_d@mail.ru

В работе продемонстрирована возможность использования клонального микроразмножения элитных форм и сортов смородины в селекционном процессе. Показана реакция испытанных генотипов на вводимые в состав питательной среды регуляторы роста растений.

Ключевые слова: ягодные культуры, смородина чёрная, культура ткани, клональное микроразмножение, регуляторы роста растений.

Введение

Клональное микроразмножение - современный способ вегетативного размножения растений в стерильных условиях *in vitro*, основанный на свойстве тотипотентности изолированных клеток. Этот метод в сочетании с термо- и хемотерапией нашел широкое применение в системе производства оздоровленного посадочного материала смородины чёрной [1, 2, 3, 4, 5, 6]. Высокий коэффициент размножения позволяет включать его в селекционные программы плодово-ягодных культур для ускоренного тиражирования ценных генотипов [7].

Клональное микроразмножение смородины чёрной созданной на Кокинском опорном пункте ВСТИСП осуществляется в Научно-образовательном центре биотехнологии Брянской ГСХА. В работу включаются как выделенные элиты, так и перспективные сорта. Актуальность проводимой работы обусловлена трудностью размножения ряда генотипов традиционными способом (одревесневшими черенками), особенно форм полученных с использованием межвидовой гибридизации.

Культивирование смородины *in vitro* дает возможность получать от единичных элитных образцов смородины до нескольких десятков и/или сотен растений в течение одного года, что в свою очередь позволяет приступать к селекционной оценке уже на следующий год исследования.

Методика исследования

Объектами исследования являлись 4 сорта и 4 элитных формы смородины чёрной.

Растительный материал стерилизовали в 0,1% растворе мертиолята и 0,3% SDS в течение 3 минут, с последующей пятикратной промывкой в стерильной дистиллированной воде.

В качестве источников эксплантов использовали целые пазушные почки или их фрагменты (3-5 мм) без нескольких кроющих чешуй. Культивирование эксплантов осуществляли на питательной среде Мурасиге-Скуга (1962) [8] в пробирках Флоринского с добавлением в качестве источника цитокинина 0,2 мг/л CPPU: ^-(2-хлор-4-пиридил)-^-фенилмочевина (C₁₂H₁₀QN₃O).

На этапе размножения в среду вводили 6-БАП в концентрациях 1 мг/л и витаминно-минеральный комплекс «Компливит» (2 мг/л).

Пробирки, для сохранения стерильности и уменьшения испарения воды из питательной среды, закрывали пищевой пленкой в два слоя.

Результаты исследования

Клональное микроразмножение состоит из ряда последовательных этапов: введения в культуру *in vitro* (инициации), собственно размножения, укоренения и адаптации полученных растений к нестерильным условиям. Наиболее критичными считают первый и заключительный этапы культивирования [6]. Как правило, эффективность каждого последующего этапа размножения зависит от предыдущего.

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

Введение в культуру *in vitro* 8 генотипов смородины черной осуществляли в осенний период (сентябрь), когда пазушные почки были дифференцированы по цветочному типу и имели плотно прилегающие чешуи. Применение в качестве антисептика мертиолята позволило получить стерильную растительную культуру у всех генотипов. Частота контаминации первичных эксплантов у исследованных сортов и элитных форм варьировала от 13,2% у сорта Исток до 64% у сорта Гамаюн (табл. 1).

Таблица 1

Результаты введения в культуру *in vitro* смородины черной

№ п/п	Генотип	Изолированно эксплантов, шт.	Частота контаминации, %	Средний размер эксплантов, мм
1	Вера	40	20.0	18.9±3.4
2	Дебрянск	50	28.0	10.8±3.1
3	Исток	38	13.2	10.1±2.0
4	Гамаюн	25	64.0	8.2±3.1
5	9-36-1/02	41	39.0	9.8±1.7
6	4-44-2/08	50	46.0	9.0±3.6
7	3-7-1/08	36	41.6	11.0±2.6
8	10-38-1/02	63	39.7	6.8±1.7

Приживаемость изолированных почек по всем генотипам через месяц их культивирования составила около 90-100%, что объясняется благоприятным воздействием регулятора роста цитокининовой природы - CPPU. Эффективность данного вещества на этапе введения в культуру *in vitro* смородины продемонстрирована ранее в лаборатории биотехнологии Брянской ГСХА [9, 10].

Действие CPPU на изолированные экспланты проявлялось в увеличении размеров почек и сформированных цветочных зачатков, а также регенерации дополнительных почек и побегов из запасных меристем. Сильное разрастание изолированных тканей наблюдалось на эксплантах сорта Вера, размер которых через месяц культивирования достигал в среднем 18,9 мм, тогда как по остальным генотипам этот показатель варьировал в достаточно узком диапазоне - от 6,8 мм у элитной формы 10-38-1/02 до 11 мм у отбора 3-7-1/08.

Образование и рост почек происходили по периферии исходного экспланта. При изолировании крупных почек, значительное количество побегов регенерировало в пазухах покровных чешуй, и обнаруживались только при их раскрытии.

После регенерации дополнительных побегов, их экспланты переносили на питательную среду МС с добавлением в качестве источника цитокинина 6-БАП в концентрации 1 мг/л. Период от начала изолирования до второго этапа культивирования *in vitro* составил около трех-четырех недель. Например, для малины по нашим наблюдениям, одно субкультивирование длится от 1 до 1,5 месяцев.

Через 2-3 недели образовавшиеся побеги разделялись и пересаживались на свежую среду для размножения. Размер побегов и их количество варьировали в зависимости от генотипа смородины. Так, самые маленькие побеги образовались у сорта Исток. Следует отметить, что этот сорт обладает слабой способностью к размножению одревесневшими черенкам, а также отличался самой низкой приживаемостью первичных эксплантов (табл. 1). Высокий коэффициент размножения и крупные побеги были получены у сортов Вера и Гамаюн (табл. 2). Размер побегов в некоторой степени

зависел от величины исходного изолированного экспланта - чем крупнее он был, тем более высокие побеги образовывались на нем.

Таблица 2

Коэффициенты размножения и высота растений смородины чёрной

№ п/п	Генотип	Высота растений, мм	Коэффициент размножения
1	Вера	8.5±3-1	3.3±0.6
2	Дебрянск	6.3±2.4	2.7±0.3
3	Исток	4.5±1.2	1.7±0.2
4	Гамаюн	7.8±2.4	2.6±0.8
5	9-36-1/02	7.8±2.9	2.2±0.3
6	4-44-2/08	6.8±2.2	2.6±0.5
7	3-7-1/08	4.8±1.3	1.9±0.1
8	10-38-1/02	5.8±1.7	2.4±0.4

За исключением сорта Исток коэффициент размножения у остальных исследуемых сортов ко второму-третьему пассажи увеличился и за 2-3 месяца все генотипы удалось размножить до количества 50-100 растений. Применительно к сорту Исток потребовалось искать способ увеличения размера побегов и коэффициента размножения. Поэтому для этого сорта мы снизили в пять раз концентрацию цитокинина 6-БАП до 0,2 мг/л, что впоследствии дало положительный результат: размер растений через один месяц культивирования увеличился.

Продолжительность каждого пассажа длилась от 3 до 5 недель. За это время у высаженных на среду микрорастений успевали образовывать дополнительные побеги, пригодные для черенкования. На основании полученных нами результатов на восьми генотипах смородины чёрной можно утверждать, что из таких показателей как коэффициент размножения и высота растений, последний имеет более важное значение, т.к. даже при низком коэффициенте размножения у сорта смородины, можно, используя короткие по продолжительности субкультивирования, получать от одного исходного экземпляра более ста растения.

Для стимуляции корнеобразования культивируемых растений смородины *in vitro* в состав питательной среды вводят регуляторы роста ауксиновой природы (ИУК, ИМК) и, кроме того, понижают содержание минеральных веществ в два раза.

Нами отмечено, что смородина чёрная может легко образовывать корни и на безгормональной среде, особенно при использовании крупных растений. Поэтому микрочеренки размноженных сортов смородины на заключительном этапе культивирования *in vitro* были помещены на разбавленную вдвое среду без ауксинов, с добавлением витаминно-минерального комплекса «Компливит» в концентрации 2 г/л для усиления ростовых процессов культуры.

Мелкие побеги отрастали на безгормональной среде достаточно медленно, поэтому решено было использовать перед этапом укоренения промежуточный этап элонгации - удлинения побегов. Для этого концентрацию цитокинина в среде уменьшали до 0,2 мг/л. При такой низкой концентрации уменьшается образование пазушных почек, но усиливается рост главного побега. После укоренения растения смородины быстро трогаются в рост, образуя крупные листовые пластинки с характерной для смородины морфологией.

Выводы

В значительной мере успех заключительного этапа клонального микроразмножения связан с качеством полученного материала в завершении этапа укоренения. Установлено, что высокие (более 2 см), хорошо облиственные и укорененные побеги существенно лучше приживаются, чем мелкие. В сравнении с другими ягодными культурами, например малиной, смородина обладает хорошей способностью к укоренению побегов, в связи с чем растения быстрее адаптируются и начинают рост.

Вторым по значимости фактором, влияющим на итоговый выход размноженного материала, является влажность воздушной среды при культивировании высаженных из пробирок растений. В связи с тем, что устьичный аппарат в условиях *in vitro* не функционирует, а у растений преобладает гетеротрофный способ питания, то в первые недели после высадки нужно каждый день осуществлять опрыскивание растений и не допускать подсыхания субстрата.

За счет открывания крышек на пробирках перед высадкой растений можно улучшить адаптацию полученных растений.

В зависимости от генотипа растений, размер их после месяца культивирования значительно различался. Так растения смородины сорта Гамаюн образовывали более крупные побеги, чем у сорта Вера при одних и тех же условиях культивирования.

In work use possibility micropropagation of elites and currant varieties in selection process is shown. Reaction of the tested genotypes on entered into structure of a nutrient medium of growth plant regulators is shown.

Список литературы

1. Тарашвили, З.Т. Ускоренное размножение черной и красной смородины методом *in vitro*: Автореф. дис...канд. с.-х. наук: 06.01.07 / З.Т. Тарашвили Науч.-исслед. зон. ин-т садоводства Нечернозем. полосы: М., 1985. - 22 с.
2. Поликарпова, Ф.Я. Методические указания по клональному микроразмножению чёрной и красной смородины Ф.Я. Поликарпова, В.А. Высоцкий, З.Т. Тарашвили - М., 1986. - 15 с.
3. Леонтьева-Орлова, Л.А. Совершенствование метода клонального микроразмножения смородины и оценка развития растений в нестерильных условиях: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.07 / Л.А. Леонтьева-Орлова; Научно-исследовательский зональный институт садоводства нечерноземной полосы. - Москва, 1991. - 22 с.
4. Суркова, О.Ю. Анализ распространения вредоносности, этиологии вирусных и вирусоподобных болезней красной и черной смородины и разработка мер борьбы с ними в средней полосе России: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.11 / О.Ю. Суркова; Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства. - Москва, 1994. - 20 с.
5. 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.-х. акад-я. - Мичуринск, 1995 - 57 с.
6. Колбанова, Е.В. Методика микроразмножения смородины чёрной *in vitro* / Е.В. Колбанова, Н.В. Кухарчик // Плодоводство: Сб. науч. ст. / Инт-т плодоводства нац-й акад-ии наук Беларуси. - Самохваловичи, 2006. - Т.2. - Ч.2. - С. 163-168.
7. Hall, H., Hummer, K.E., Jaimieson, A., Jennings, S., Weber, C. 2009. Plant Breeding Reviews: Raspberry Breeding and Genetics. New Jersey: Wiley Blackwell. 32:39-382.
8. Murashige T. & Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum*. 1962. V.15. №.13. P. 473-497.
9. 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.
10. Skovorodnikov, D.N. Application of diphenylurea derivatives in clonal micropropagation of primocane fruiting raspberry and black currants / D.N. Skovorodnikov, I.V. Kazakov, S.N. Evdoki-menko, F.F. Sazonov // *Acta Hort. ISHS*. 2012. - 946. - P. 135-138.

CLONAL MICROPROPAGATION IN ACCELERATING THE BREEDING PROCESS OF BLACK CURRANTS

D.N. SKOVORODNIKOV

Bryansk State Agricultural Academy
243365, Russia, Vygonichy district,
Bryansk region, Kokino,
str. Sovetskay, 1

e-mail: skovorodnikov_d@mail.ru

The paper demonstrated the use of the clonal micropropagation of elite forms and varieties of currants in the selection process. Shows the response of the tested genotypes on the input of the medium plant growth regulators.

Keywords: berry crops, black current, tissue culture, clonal micropropagation, plant growth regulators.