

ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ АСЕПТИЧНОЇ КУЛЬТУРИ
***RIBES NIGRUM* L.**

А. А. Клюваденко, кандидат сільськогосподарських наук,

С. Ю. Білоус, кандидат біологічних наук,

О. В. Оверченко, молодший науковий співробітник

*Обґрунтована актуальність мікроклонального розмноження *Ribes nigrum* L. Розроблено схему стерилізації з використанням як стерилізанта 0,1 %-ного розчину $HgCl_2$, що забезпечує отримання до 100 % стерильних, морфогенно-активних експлантатів *Ribes nigrum* L. сортів Пам'ятна, Лелека та Мрія 5 і створює передумови для дослідження подальшої їх регенерації в культурі *in vitro*.*

Ключові слова: *Ribes nigrum* L., культура *in vitro*, експлантат, поживне середовище, рослина-регенерант, стерилізація, культивування

Смородина чорна (*Ribes nigrum* L.) – багаторічна кущова рослина родини ломикаменевих (Saxifragaceae), заввишки 1,0–1,5 м. Величина і форма куща залежить від сорту [7]. Чорна смородина найпоширеніша ягідна культура в Україні. Ряд дослідників довели безперечну цінність чорної смородини (*Ribes nigrum* L.) для потреб населення та медицини [3, 5, 7, 11]. Плоди чорної смородини за кількістю вітамінів є найбагатшими серед ягідних культур, ціняться як харчовий і лікувально-профілактичний продукт, що є найдешевшим джерелом вітаміну С, який у поєднанні з вітаміном Р незамінний при лікуванні серцево-судинних захворювань і надмірних доз опромінення. Вміст вітаміну С в ягодах становить від 90 до 300 мг на 100 г сирої маси. Присутні в них вітаміни А (каротин), В₁ (тіамін), К₁, Р (цитрин), РР₁, кумарини, фурукумарини, цукри, азотні кислоти, ефірна олія, ароматичні, а також неорганічні речовини, в тому числі калій, кальцій, магній, кремній, фосфор [3, 9]. У ягодах чорної смородини

відкрито також специфічні речовини антирадіанти, які здатні зв'язувати і виводити із організму елементи радіоактивного розпаду, особливо стронцій (Sr) [11, 12].

У смородини багаті на вітамін С не лише ягоди, але й бруньки, листки, бутони і квітки. Вони є основною сировиною для виготовлення вітамінних лікувальних препаратів [1].

Проблема вирощування якісного садивного матеріалу нових урожайних сортів *Ribes nigrum* L. посідає провідне місце у сучасному садівництві [5, 8].

Метод мікроклонального розмноження, аналогічний вегетативному способу розмноження, дає змогу вирішити проблему, отримання оздоровленого садивного матеріалу та збільшити коефіцієнт розмноження у тисячі разів за рік [2, 4, 6].

Хоча існують технології розмноження деяких сортів смородини [5, 9], та практичний досвід прискореного мікроклонального розмноження важливих плодово-ягідних культур маловивчених, до того ж регенераційна здатність ізольованих тканин чорної смородини залежить від сортової специфіки материнських рослин, складу живильного середовища і концентрації регуляторів росту. Тому актуальним є удосконалення окремих етапів для конкретних генотипів та розробка комплексних технологій прискореного розмноження для нових урожайних сортів *Ribes nigrum* L. на основі біотехнологічних методів.

Найперспективнішими для прискореного розмноження *in vitro* є три сорти чорної смородини: Пам'ятна, Лелека, Мрія 5 селекції кафедри садівництва Національного університету біоресурсів і природокористування України, селекціонера П. З. Шеренгового [10].

Сорт Пам'ятна – новий середньостиглий сорт чорної, отриманий від схрещування сортів Голосіївська і Народна у 1985 році. Він відзначається високою врожайністю (16 т/га), самоплідністю, комплексною стійкістю проти збудників грибних захворювань, невибагливістю до умов вирощування, придатністю до комбайнового збирання врожаю. Ягоди великі, середні масою 1,7 г, великі – до 4,5 г, приємного кисло-солодкого смаку з вираженим

ароматом. Ягоди дозрівають одночасно, не обсіпаються. Кущ середньорослий, слаборозкидистий, у молодому віці компактний, незагущений. Пагони товсті, світло-жовті, з укороченим міжвузлям. Кисті середні і короткі, добре виповнені, густо розміщені майже на всій довжині пагона. Середня урожайність 3,7 кг з куща (18,2 т/га). Перспективний сорт для інтенсивної промислової і аматорської культури в умовах Лісостепу та Полісся України з щільним розміщенням рослин у ряді (0,5–0,75 м) [10].

Сорт Лелека – ранньостиглий, відзначається високою стабільною врожайністю – 18 т/га, характеризується підвищеною зимостійкістю, стійкістю проти борошнистої роси і стеблової іржі, придатний для комбінованого збирання врожаю. Ягоди великі, одномірні, середньою масою 1,5 г, великі – до 3,5 г, приємного кисло-солодкого смаку. Кущ середньорослий, компактний, з вузькою основою. Середня врожайність 4,4 кг з куща (18 т/га). Ягоди дозрівають практично одночасно, придатні для споживання свіжими, заморожування і різних видів техпереробки в соки, желе, джеми, виноматеріали. Рекомендовано для вирощування в промисловому і аматорському ягідництві Степу та Лісостепу України [10].

Сорт Мрія 5 – новий, середнього строку дозрівання. Кущ середньорослий, слаборозкидний, кисті досить щільно розміщені на пагонах. Ягоди великі, одномірні, округлі, чорні, середньою масою 1,9 г, великі – до 4,5 г, приємного кисло-солодкого смаку. Дегустаційна оцінка 4,3–4,7 бала. Шкірочка середньої щільності і міцності з сухим відривом. Плоди дозрівають одночасно, придатні для різних видів техпереробки. Сорт відрізняється стабільною врожайністю, стійкістю проти борошнистої роси та стобчастої іржі [10].

Мета роботи – вивчення особливостей отримання асептичної культури тканин та органів нових урожайних сортів *Ribes nigrum* L. на початковому етапі культивування *in vitro*.

Матеріали і методи дослідження. Для введення в культуру *in vitro* використовували фенотипово-нормальні рослини-донори *Ribes nigrum* L. сортів Пам'ятна (№1), Лелека (№2) та Мрія 5 (№3) [10], вирощені в умовах відкритого

грунту. Як первинний експлантат використовували нерозкриті і розкриті бруньки та частини пагонів із пазушними та апікальними бруньками.

Ведення в культуру проводили в лютому-березні. При всіх способах стерилізації пагони попередньо очищали від листя, нарізали на фрагменти по 1,5-3,0 см і промивали в мильному розчині протягом 15 хв (інтенсивно помішуючи). Зразки відмивали під проточною водою 10-20 хв та переносили у посудину з стерильною дистильованою водою. Всі наступні етапи стерилізації проводили в умовах ламінарного боксу. Як стерилізуючі речовин використовували 70 %-ний розчин етанолу (C_2H_5OH) – 30 с, 1,7, 2,5 % розчини натрію гіпохлориту ($NaClO$) – (10-15 хв), 1,0 %-ний розчин нітрату срібла ($AgNO_3$) – 10 хв та 0,1 %-ний розчин сулеми ($HgCl_2$) з експозицією 8, 12, 15 хв. Після кожної стерилізації, незалежно від типу стериліанта та експозиції, тричі по 10 хв відмивали експлантати у стерильній дистильованій воді.

Після стерилізації бруньки звільняли від покривних лусок і переносили на живильне середовище за прописом Мурасіге і Скуга (МС) [4] без додавання регуляторів росту. Рослинний матеріал культивували у термальній кімнаті за температури $24 \pm 2^\circ C$, відносній вологості повітря (ВВП) 75-80 % -ні, з 16-годинним фотоперіодом за умов освітлення 3–4 тис. Лк.

Усі роботи з культури ізолюваних тканин та органів здійснювали за загальноприйнятими у біотехнології методами [2, 4] у трикратній повторності. Всі результати статистично обробляли за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel.

Результати та їх обговорення. Невід'ємною частиною на перших етапах мікроклонального розмноження є стерилізація рослинного матеріалу. Якість її значною мірою залежить від стериліанта, його концентрації та експозиції. При доборі стерилізуючої речовини найвагомішими факторами є те, щоб вона знешкоджувала патогенну мікрофлору і якомога менше шкодила перебігу фізіологічних процесів всередині рослинних тканин.

У процесі дослідження підбирали стерилізуючий розчин, який легко вимивався з тканин дистильованою водою або розкладався, та не отруював тканини рослин. За основний показник ефективності стерилізуючої речовини

було прийнято кількість асептичних та життєздатних експлантів, що нормально розвивались в культурі *in vitro*.

У дослідженнях були апробовані різні концентрації розчинів натрію гіпохлориту (NaClO), срібла нітрату (AgNO_3) та сулеми (HgCl_2). Для досягнення поставленої мети ці стериланти використовували у різних співвідношеннях. Кожен стерилант проявляв різну дію на експлантати (таблиця).

Способи стерилізації експлантатів *Ribes nigrum* L.

№ з.п.	Розчин стериланта	Сорт	Експозиція, хв	Кількість експлантів, шт.	Кількість асептичних, життєздатних експлантів, (14 доба), %
I	1,7%-ний розчин NaClO ;	№1	15	10	10
		№2	15	10	17
		№3	15	10	20
II	2,5%-ний розчин NaClO ;	№1	10	10	33
		№2	10	10	14
		№3	10	10	17
III	1%-ний розчин AgNO_3	№1	10	10	14
		№2	10	10	11
		№3	10	10	0
IV	0,1%-ний розчин HgCl_2	№1	8	10	47
			12	10	60
			15	10	100
		№2	8	10	40
			12	10	65
			15	10	70
		№3	8	10	55
			12	10	67
			15	10	80

Примітка: №1 – сорт Пам'ятна, №2 – сорт Лелека, №3 – сорт Мрія 5

Дослідження показали, що за умов використання як стериланта 2,5 %-ний NaClO з експозицією 10 хв для сорту №1 ефективність стерилізації становила 33 %, для сорту №2 – 14 %, для сорту №3 – 17 %. При використанні 1,7 %-ний розчину NaClO протягом 15 хв для сорту №1 ефективність стерилізації становила 10 %, для сорту №2 – 17 %, для сорту №3 – 20 %. При стерилізації 1 %-ним розчином AgNO_3 з часом експозиції 10 хв у всіх варіантах відзначали найнижчий відсоток асептичних експлантатів, нездатних до регенерації повноцінних асептичних мікропагонів: для сорту №1 – 14 %, №2 – 11 %, №3 –

0 %. З проведених експериментів видно, що спроби використання як стерилізуючих розчинів NaClO та AgNO_3 не призвели до позитивного результату, оскільки при м'яких умовах стерилізації загибель експлантів відбувалася через зараження культури (рис. а), а більш жорстких – через окислення рослинних тканин.

У зв'язку з цим були проведені дослідження на можливість використання 0,1 %-ного розчину сулеми як стерилізуючого агента. У результаті при використанні цього стерилізанта всі експлантати проявляли морфогенетичну активність. Найефективнішим для експлантів тканин *Ribes nigrum* L. сортів Пам'ятна, Лелека та Мрія 5 виявилось використання 0,1 %-ного розчину HgCl_2 з часом експозиції 15 хв. За таких умов вже на 7-10-ту добу культивування *in vitro*, отримано 100 % регенераційно-здатних експлантів для сорту №1 (рис. б), 70 % – №2, та 80 % – №3. За експозиції 8-12 хв експланти характеризувались схильністю до зараження грибними та бактеріальними патогенами. Також після 5-7-ої доби в умовах ізолюваної культури тканин та органів *Ribes nigrum* L. у 10 % регенераційно-здатних експлантів зафіксовано прояв бактеріального ураження, що може бути зумовлене внутрішньою інфекцією в рослинних тканинах, яке вкрай ускладнює процес отримання асептичної культури (рис. в). Для уникнення небажаного ефекту до складу ЖС вносили комплексний антибіотик цифотаксим ($200 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) [8].

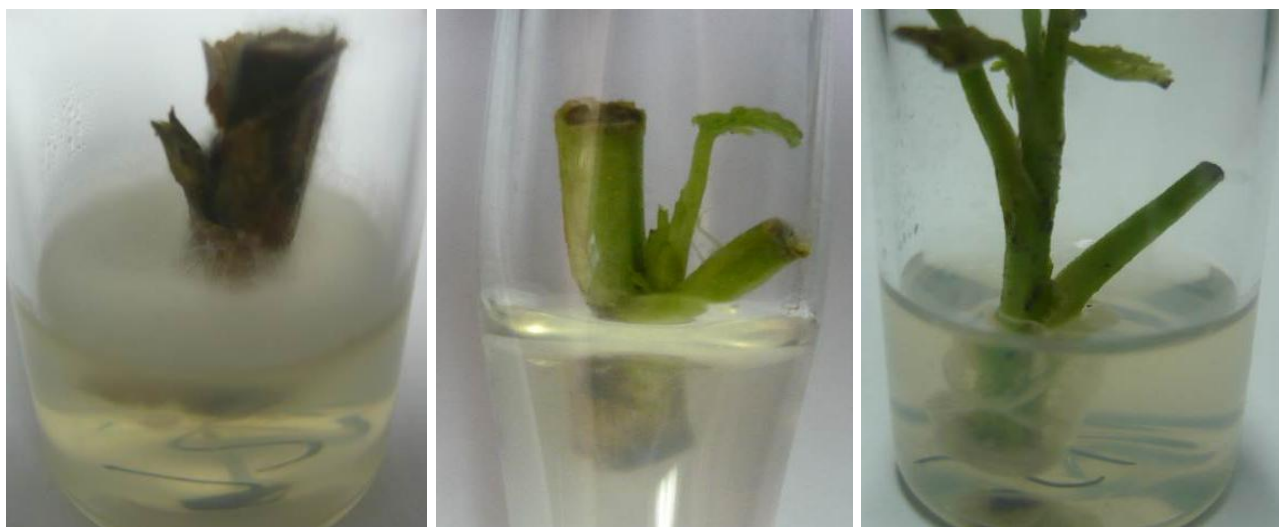


Рис. *Ribes nigrum* L. на етапі введення в культуру *in vitro*:

а – грибне ураження (5-та доба); б – проростання сплячої бруньки (7-ма доба); в – бактеріальне ураження (7-ма доба);

Ріст і розвиток первинних експлантатів варіював залежно від стерилізуючої речовини, що використовували на початку введення та типу експлантату. Найкраще проявляли себе фрагменти молодих пагонів з брунькою.

Висновки. У результаті проведених досліджень було встановлено, що оптимальними експлантатами для введення в культуру *in vitro* є молоді пагони з брунькою *Ribes nigrum* L. сортів Пам'ятна, Лелека та Мрія 5, відібрані з рослин-донорів у березні. Розроблена схема стерилізації з використанням 70%-ного розчину етанолу протягом 30 с, 0,1%-ного розчину HgCl_2 , з експозицією 15 хв, відмиванням тричі по 10 хв, що дозволила отримати максимальну кількість (до 100 %) стерильних, морфогенно-активних експлантатів *Ribes nigrum* L.

Таким чином, успішне отримання асептичних первинних експлантатів *Ribes nigrum* L. сортів Пам'ятна, Лелека та Мрія 5 створюють передумови для дослідження подальшої їх регенерації в культурі *in vitro*, здійснення підбору складових живильного середовища для накопичення вегетативної маси, ризогенезу *in vitro* та адаптації оздоровлених рослин *ex vitro*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Белов В. Ф. Питомниководство ягодных культур / В. Ф. Белов. – М.: Россельхозиздат, 1985. – 152 с.
2. Калинин Ф. Л. Технология микроклонального размножения растений / Ф. Л. Калинин, Г. П. Кушнir, В. В. Сарнацкая. – К.: Наукова думка, 1992. – 232 с.
3. Кондратенко Т. Є. Селекція та виробництво плодів смородини чорної / Т. Є. Кондратенко, П. З. Шеренговий // Садівництво. – 2007. – № 60. – С. 159–168.
4. Кушнір Г. П. Мікроклональне розмноження рослин: теорія і практика / Г. П. Кушнір, В. В. Сарнацька. – К.: Наукова думка, 2005. – 270 с.
5. 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.

6. Клональное размножение растений черной смородины (*Ribes nigrum* L.) *in vitro* / Г. К. Оразбаева, В. Т. Хасанов, А. Р. Исаков [др.] // Вестник науки КазАТУ им. С. Сейфуллина. – 2012. – № 1. – С. 245-257.

7. Позняков В. Д. Смородина и крыжовник / В. Д. Позняков, А. Г. Вазюля. – М.: Россельхозиздат, 1990. – 261 с.

8. Поликарпова Ф. Я. Методические указания по клональному микроразмножению черной и красной смородины. / Ф. Я. Полікарпова, В. А. Высоцкий, З. Т. Тарашвили. – М.: Наука, 1986. – 16 с.

9. Сіленко В. О. Придатність сортів смородини (*Ribes nigrum* L.) селекції НУБіП України до механізованого збирання ягід / В. О. Сіленко, П. М. Гав'юк / Сортівивчення та сортознавство. – 2013.– №3. – С. 13-17.

10. 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 2008 р.).– Днепропетровск, 2008.– С. 174–175.

11. Шеренговий П. З. Моє життя в моїх сортах / П. З. Шеренговий. – Вінниця, 2011. – 168 с.

12. Ягудина С. И. Смородина / С. И. Ягудина. – Ташкент: Фан, 1976. – 120 с.

13. Ярославцев Е. И. Ягодные культуры / Е. И. Ярославцев // Справочник. М.: Агропромиздат, 1988. – 239 с.

Особенности получения асептической культуры *Ribes nigrum* L.

А. А. Клюваденко, С. Ю. Белоус, О. В. Оверченко

Обоснована актуальность микроклонального размножения *Ribes nigrum* L. Разработана схема стерилизации с использованием в качестве стерильанта 0,1 %-ного раствора HgCl_2 , что обеспечивает получение до 100 % стерильных, морфогенно-активных эксплантатов *Ribes nigrum* L. сортов Пям'ятна, Лелека и Мрія 5 создают предпосылки для исследования дальнейшей их регенерации в культуре *in vitro*.

Ключевые слова: *Ribes nigrum* L., культура *in vitro*, эксплантат, питательная среда, растение-регенерант, стерилизация, культивирование

Features of aseptic culture of *Ribes nigrum* L.

A. Klyuvadenko, S. Bilous, O. Overchenko

Actuality of micropropagation of *Ribes nigrum* L. was proved. The scheme of sterilisation with using 0,1 % solution of HgCl_2 , gives 100% clean, morphogenic explants of *Ribes nigrum* L. sorts of Pamatna, Leleka and Mria5 create preconditions for further studies of regeneration in vitro.

Key words: *Ribes nigrum* L., culture in vitro, explants, nutrient medium, plant-regenerants, sterilization, cultivation