

АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ БИОПРОДУКЦИОННЫХ ПАРАМЕТРОВ У РЕГЕНЕРАНТОВ СОРТА «TISEL» *RIBES NIGRUM IN VITRO* В ПРИСУТСТВИИ ИОНОВ ЖЕЛЕЗА В РАЗНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ

Т.П. КУНАХОВЕЦ, О.А. КУДРЯШОВА, А.А. ВОЛОТОВИЧ

*Полесский государственный университет,
г. Пинск, Республика Беларусь, volant777@tut.by*

Введение. Смородина черная (*Ribes nigrum* L.) – основной вид рода *Ribes* семейства Grossulariaceae [1]. В диком виде встречается по всей Европе, в Азии, Северной и Южной Америке, в Сибири, на Дальнем Востоке, в Монголии [12].

Смородина – пищевое растение [13]. Многие виды смородины также являются лекарственными растениями. Их плоды содержат витамины С (до 570 мг %), В₂, В₆, В₉, D, E, P, K, PP, каротиноиды, биофлавоноиды, сахара (до 6%), органические кислоты (4,5%), микроэлементы и другие вещества [15]. Листья содержат витамин С до 250 мг% [17]. Зародыши, листья и ягоды смородины являются источниками фенольных соединений, используемых в медицине [4]. Смородина – эфиромасличное растение, т. к. в листьях и почках находятся большое количество железок, богатых эфирным маслом – до 0,6% [7]. Некоторые виды рода *Ribes* имеют декоративное значение [16].

В настоящее время смородина черная занимает ведущее место среди ягодных культур в Республике Беларусь [9]. Скороплодность, ежегодная урожайность, богатый биохимический состав ягод, неприхотливость к условиям произрастания, технологичность и высокий коэффициент размножения обуславливают ее преимущество перед другими садовыми культурами [11].

Сорт ‘Tisel’ относится к ранним сортам черной смородины польской селекции [2]. Известен высокой урожайностью и высоким содержанием витамина С. Получен при самоопылении смородины сорта ‘Titania’, являющейся ведущим авторским сортом, культивируемым в Европе. ‘Tisel’ унаследовал высокую устойчивость к основным грибным болезням.

Черная смородина относится к культурам, легко размножаемым традиционными методами (например, одревесневшими или зелеными черенками, а также отводками). Тем не менее для производства свободного от инфекций посадочного материала смородины черной в промышленных объемах в настоящее время предлагается технология клонального микроразмножения *in vitro* растений данного вида [1]. В частности, для асептического введения, инициации побегообразования и стабилизации смородины черной *in vitro* предлагается агаризованная питательная среда на основе Мурасиге–Скуга (MS) [1, 3], содержащая 0,4 мг/л 6–бензиламинопурина (6–БАП) и 0,1 мг/л ИМК; для размножения регенерантов – среда MS с 0,8 мг/л 6–БАП, а для укоренения регенерантов смородины черной – среда MS с 1,0 мг/л ИМК [1]. Тем не менее любая технология требует корректировки при работе с каждым отдельным сортом.

В настоящей статье приведены результаты анализа изменчивости семи количественных показателей у регенерантов смородины черной сорта ‘Tisel’ *in vitro* на питательных, агаризованных средах, с органическими соединениями, на макро–, микросолевого основе WPM (Woody Plant Medium – среда для культивирования древесных растений), Андерсона и Мурасиге–Скуга (MS), в присутствии ионов железа II в стандартной и двойной концентрациях.

Методика и объекты исследования. Исследования проводили на базе биотехнологической лаборатории НИЛ клеточных технологий в растениеводстве УО «Полесский государственный университет» (далее НИЛ КТР ПолесГУ) в ноябре 2013 г. – январе 2014 г.

Асептическое введение и стабилизацию смородины черной сорта ‘Tisel’ *in vitro* на макро–, макро– солевой основе, с органическими соединениями по MS [1, 3], в присутствии либо 0,5–1,0 мг/л 6–БАП, либо при сочетании 0,5–1,0 мг/л 6–БАП и 0,10–0,25 мг/л ИМК осуществляли на базе НИЛ КТР ПолесГУ в марте–июне 2013 года, в соответствии с методом [10], разработанным на базе НИЛ КТР ПолесГУ на сортовой голубике высокорослой и изложенном в патенте на изобретение ВУ 18431 С1 2014.08.30.

В качестве объекта исследований использовали размножаемые *in vitro* регенеранты (экспланты) сорта ‘Tisel’ смородины черной. Общее количество анализируемых регенерантов для каждого варианта опыта составило не менее 120 шт. (четыре стеклянные емкости, по 30 регенерантов в каждой).

Регенеранты получали в результате культивирования эксплантов (состоящих из двух метамеров) в колбах конических (объемом по 100 мл) с 25 мл стерильной агаризованной, питательной среды на микро-, макро- солевой основе, с органическими соединениями (кроме фитогормонов) по WPM [3, 14], Андерсона [3, 14] и MS [1, 3], содержащей разные концентрации железа и гормонов, в соответствии с приведенными ниже вариантами опыта:

1. MS без фитогормонов (контроль);
2. MS без фитогормонов, $Fe^{+2} \times 2$;
3. MS + 1,0 мг/л 6-БАП + 0,1 мг/л ИМК, $Fe^{+2} \times 2$;
4. WPM без фитогормонов (контроль);
5. WPM без фитогормонов, $Fe^{+2} \times 2$;
6. WPM + 1,0 мг/л 6-БАП + 0,1 мг/л ИМК, $Fe^{+2} \times 2$;
7. AN без фитогормонов (контроль);
8. AN без фитогормонов, $Fe^{+2} \times 2$;
9. AN + 1,0 мг/л 6-БАП + 0,1 мг/л ИМК, $Fe^{+2} \times 2$.

Учет анализируемых показателей – высота регенерантов, количество побегов, количество листьев, сырой вес регенеранта, укореняемость регенерантов, количество корней и длина корней – проводили через 10 недель культивирования на стеллажах световой установки культурального помещения биотехнологической лаборатории при температуре $+25^{\circ}C$, фотопериоде день/ночь – 16 ч / 8 ч, освещенности 6000 лк (4 люминесцентных лампы OSRAM L36W/76 Natura), относительной влажности воздуха 70 %.

Общий математический анализ данных проводили по стандартным методам вариационной статистики [8] с использованием программы статистического анализа данных STATISTICA 6.0 [6]. Двухфакторный дисперсионный анализ данных и расчет доли влияния факторов на изменчивость исследуемых показателей проводили в программе статистического анализа AB-Stat 1.0, разработанной в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси [5].

Результаты и их обсуждение. В таблице 1 приведены результаты изменчивости анализируемых количественных показателей у регенерантов сорта «Tisel» *in vitro*. Выделены значения, достоверно (при $P < 0,05$ и $P < 0,01$) отличающиеся от величины анализируемых показателей у регенерантов в соответствующем контроле.

Анализ высоты регенерантов указывает на то, что при присутствии в составе питательной среды 1 мг/л 6-бензиламинопурина и 0,1 мг/л ИМК (варианты 3, 6, 9) происходит существенное достоверное (при $P < 0,01$) уменьшение величины показателей в 1,6–2,0 раза, по сравнению с величинами данного показателя с контролем (табл. 1). Достоверное ($P < 0,05$) влияние концентрации железа в питательной среде было установлено во 2 варианте (MS без фитогормонов, $Fe^{+2} \times 2$), где высота побегов была в 1,3 раза меньше по сравнению с аналогичной средой, содержащей стандартную концентрацию.

Сравнительный анализ количества побегов установил варьирование значений показателя в пределах 1,57–1,67 на питательных средах WPM, MS и Андерсона, без фитогормонов (табл. 1). В присутствии 1 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л ИМК ($Fe^{+2} \times 2$) происходило достоверное возрастание данного показателя в 1,6 раза на основе MS ($P < 0,05$) и Андерсона ($P < 0,01$; табл. 1). В случае питательной среды на основе WPM наблюдалась тенденция увеличения показателей в присутствии двойной концентрации железа, а также фитогормонов БАП и ИМК. Касательно анализа влияния железа на количество побегов можно отметить, что с повышением его концентрации величина данного показателя уменьшается (табл. 1).

Аналогичная тенденция влияния концентрации железа наблюдалась при анализе количества листьев (варианты 2,5,8) по сравнению с контролем. Наиболее высокие значения количества листьев, достоверно превышающие контрольные при $P < 0,01$ наблюдались при сочетании $Fe^{+2} \times 2$, 1 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л ИМК на основе MS и Андерсона. В первом случае количество листьев превышало контрольный показатель в 1,7 раза, во втором – в 1,6 раза (табл. 1).

Анализ изменчивости сырого веса регенерантов установил достоверное (при $P < 0,01$) уменьшение в 1,2 раза величины показателя на основе MS и Андерсона в присутствии двойной концентрации железа. На основе WPM с $Fe^{+2} \times 2$ сырой вес был такой же, как и на контрольной питательной среде. С добавлением 6-БАП в концентрации 1 мг/л и ИМК (концентрация 0,1 мг/л) сырой вес регенерантов достоверно ($P < 0,01$) увеличился в 1,6 раза на основе MS, а на основе WPM – в 1,25 раза (табл. 1). На среде Андерсона, напротив, в присутствии 6-БАП и ИМК наблюдалось уменьше-

ние показателя в 1,1 раза ($P < 0,05$) по сравнению с контролем (табл. 1). В целом, на контрольных средах сырой вес регенерантов варьировал в небольшом диапазоне 0,12–0,14 г.

При анализе количества корней у регенерантов была выявлена тенденция положительного влияния увеличенной концентрации ионов железа. На основе MS показатель составил 2,84 шт., а на основе WPM – 4,77 шт., в то время как в контроле количество корней у регенерантов составляло 2,71 и 4,53 шт. соответственно. Установлена закономерность убывания показателей с добавлением БАП и ИМК у регенерантов на основах MS, WPM и Андерсона (табл. 1). При этом у регенерантов на основах MS и Андерсона корней не наблюдалось ($P < 0,01$), а уменьшение в 2,3 раза контрольного показателя по количеству корней наблюдалось на основе WPM (табл. 1).

Довольно противоречивые данные были получены при изучении влияния концентрации железа на длину корней: в вариантах 2 и 5 (MS без фитогормонов, $Fe^{+2} \times 2$; и WPM без фитогормонов, $Fe^{+2} \times 2$ соответственно) наблюдалось достоверное ($P < 0,01$) увеличение показателя в 1,2 раза. На питательной среде Андерсона без фитогормонов с $Fe^{+2} \times 2$ наблюдалось обратное: длина корней уменьшилась в 1,3 раза ($P < 0,01$) по сравнению с контролем (табл. 1).

По укореняемости регенерантов во всех случаях в присутствии увеличенной концентрации железа наблюдалось уменьшение показателей анализируемого показателя. В вариантах WPM, MS и Андерсона без фитогормонов с $Fe^{+2} \times 2$ укореняемость была в 1,2–1,5 раза меньше по сравнению с контрольной ($P < 0,01$). При добавлении 1 мг/л 6–БАП и 0,1 мг/л ИМК данный показатель сводился к 0 ($P < 0,01$) на основах MS и Андерсона, либо был незначителен – 3,11% на основе WPM (табл. 1).

Двухфакторный дисперсионный анализ установил высокодостоверное при $P < 0,01$ влияние исследуемых факторов (микро– и макро–солевая основа и фитогормональный состав среды) по отдельности, а также их совокупности на изменчивость показателей «сырой вес регенеранта», «укореняемость регенерантов», «количество корней» и «длина корней у регенерантов» (табл. 2). При этом доли влияния исследуемых факторов составили, соответственно, 14–41%, 0,3–97%, 17–63% и 4–12%. Наиболее высокими долями влияния на изменчивость всех анализируемых показателей обладал фактор «фитогормональная основа питательной среды» (табл. 2).

Основа питательной среды и концентрация ионов железа оказывали достоверное (при $P < 0,01$) влияние на изменчивость показателей «сырой вес регенерантов», «процент укореняемости», «количество корней» и «длина корней» у регенерантов, с долями влияния факторов 14%, 0,3%, 19% и 22%, соответственно анализируемым показателям (табл. 2).

Выводы. Общий анализ изменчивости семи исследуемых показателей указывает на то, что питательные среды на основе MS и Андерсона в большинстве случаев способствуют проявлению достоверной и существенной изменчивости большинства показателей в присутствии двойной концентрации железа и всех показателей в присутствии 1 мг/л 6–БАП, 0,1 мг/л ИМК и $Fe^{+2} \times 2$.

На контрольных питательных средах WPM, MS и Андерсона наблюдалось незначительное варьирование анализируемых показателей: высота побегов – 2,24–2,45 см; количество побегов на экспланте – 1,57–1,63 шт.; количество листов варьировало от 8,77 до 9,07 шт.; сырой вес регенерантов – 0,12–0,14 г; количество корней составило 2,71–4,76 шт.; длина корней – 1,53–2,07 см; укореняемость составила от 76,22% до 100% (полной укореняемости).

Достоверно установлено (при $P < 0,01$), что присутствие в составе питательной среды на основе MS и Андерсона двойной концентрации ионов железа уменьшает сырой вес регенерантов и их укореняемость в 1,2–1,9 раза, по сравнению с контролем. Высота побегов на среде MS при этом также уменьшается в 1,3 раза, в то время как длина корней возрастает в 1,2 раза, по сравнению с контролем. Длина корней и количество корней на среде Андерсона при этом уменьшаются в 1,3 раза по сравнению с контролем.

В присутствии 1 мг/л 6–БАП, 0,1 мг/л ИМК и $Fe^{+2} \times 2$ происходило достоверное при $P < 0,01$ уменьшение высоты регенерантов в 1,6–2,0 раза на основах WPM, MS и Андерсона. На основе WPM количество и длина корней достоверно при $P < 0,01$ уменьшались в 2,3 и 1,5 раза соответственно, по сравнению с контролем. На основах MS и Андерсона корней не наблюдалось.

Таблица 1 – Изменчивость количественных показателей у регенерантов сорта 'Tisel' *Ribes nigrum in vitro*

Вариант опыта	ВР, см	КП, шт.	КЛ, шт	СВР, г	ПУ, %	КК, шт	ДК, см
MS без фитогормонов (контроль)	2,45±0,21	1,63±0,07	9,07±0,15	0,13±0,01	100±0,01	2,71±0,01	1,53±0,02
MS без фитогормонов, Fe ⁺² ×2	1,85±0,09**	1,29±0,14	7,12±0,28	0,11±0,01**	67,80±1,11**	2,84±0,02	1,89±0,05**
MS +БАП _{1,0} +ИМК _{0,1} , Fe ⁺² ×2	1,58±0,06**	2,57±0,30*	15,27±0,58**	0,21**	0**	0**	0**
WPM без фитогормонов (контроль)	2,24±0,01	1,57±0,09	9,03±1,06	0,12±0,01	76,22±2,32	4,53±0,20	2,07±0,04
WPM без фитогормонов, Fe ⁺² ×2	2,34±0,15	1,60±0,25	8,53±0,19	0,12±0,01	73,33±1,92	4,77±0,04	2,40±0,23**
WPM+ БАП _{1,0} +ИМК _{0,1} , Fe ⁺² ×2	1,27±0,07**	2,13±0,28	10,67±1,29	0,15**	3,11±1,16**	2,00±0,12**	1,55±0,03**
AN без фитогормонов (контроль)	2,27±0,23	1,67±0,17	8,77±0,72	0,14±0,01	90,00±2,89	4,76±0,03	2,07±0,04
AN без фитогормонов, Fe ⁺² ×2	2,53±0,18	1,10±0,06	7,20±0,46	0,12**	73,30±1,92**	3,77±0,44**	1,64±0,02**
AN+ БАП _{1,0} +ИМК _{0,1} , Fe ⁺² ×2	1,12±0,06**	2,70±0,15**	14,13±0,78**	0,13*	0**	0**	0**
НСР _{0,05}	0,33	0,75	2,35	0,01	3,53	0,31	0,17
НСР _{0,01}	0,44	1,01	3,15	0,01	4,72	0,42	0,23

Примечания. * – достоверно отличается от контроля при P<0,05; ** – при P<0,01; нуль "0" обозначает отсутствие данных; ВР – высота регенерантов, см; КП – количество побегов, шт; КЛ – количество листов, шт; СВР – сырой вес регенеранта, г; ПУ – процент укореняемости, %; КК – количество корней, шт; ДК – длина корней, см; НСР – наименьшая существенная разница при уровнях значимости P<0,05 и P<0,01; MS – среда Мурашиге-Скуга; WPM – среда woody plant medium; AN – среда Андерсона; БАП – бензиламинопуриин; ИМК – индоллил-3-масляная кислота; Fe⁺²×2 – удвоенная концентрация ионов железа, то же для таблицы 2

Таблица 2 – Двухфакторный дисперсионный анализ изменчивости количественных показателей у регенерантов сорта 'Tisel' *Ribes nigrum in vitro*

ИВ	df	ВР		КП		КЛ		СВР		ПУ		КК		ДК	
		СК	ДВ,%	СК	ДВ,%	СК	ДВ,%	СК	ДВ,%	СК	ДВ,%	СК	ДВ,%	СК	ДВ,%
Общее	26	7,74	100,00	9,12	100,00	228,06	100,00	0,02	100,00	39935,04	100,00	85,55	100,00	18,75	100,00
Фактор А	2	0,00	0,04	0,02	0,23	5,23	2,29	0,00**	14,08	120,70**	0,30	16,58**	19,37	4,05**	21,58
Фактор В	2	5,54**	71,52	6,28**	68,89	162,22**	71,13	0,01**	40,73	38856,84**	97,30	62,84**	73,45	12,10**	64,51
АВ	4	1,14*	14,77	0,90	9,92	33,18**	14,55	0,01**	44,41	815,38**	2,04	4,60**	5,38	2,24**	11,93
Повторности	2	0,00	0,01	0,44	4,88	0,41	0,18	0,00	0,63	52,22	0,13	0,22	0,26	0,13	0,69
Случайные отклонения	16	1,06	13,66	1,47	16,08	27,02	11,85	0,00	0,14	89,90	0,23	1,31	1,54	0,24	1,29

Примечания. ИВ – источник варьирования; df – число степеней свободы; СК – средний квадрат; ДВ – доля влияния фактора; фактор А – состав среды (MS – среда Мурашиге-Скуга; WPM – среда woody plant medium; AN – среда Андерсона); фактор В – фитогормональный состав среды (включая удвоенную концентрацию ионов железа П).

* - значимо при $P < 0,05$;

** - при $P < 0,01$.

Двухфакторный дисперсионный анализ установил в большинстве случаев высокодостоверное при $P < 0,01$ влияние исследуемых факторов «состав среды» и «фитогормональный состав среды» на изменчивость всех анализируемых показателей, кроме количества побегов, с долями влияния от 2 до 44% в зависимости от показателя.

Установлено высокодостоверное при $P < 0,01$ влияние исследуемого фактора «состав среды» на изменчивость показателей «сырой вес регенеранта», «укореняемость регенерантов», «количество корней» и «длина корней у регенерантов» с долями влияния 14%, 0,3%, 19% и 22% соответственно.

Установлены оптимальные для клонального микроразмножения сорта «Tisel» составы питательных сред: на основах Андерсона и MS, в присутствии 1,0 мг/л БАП; 0,1 мг/л ИМК и удвоенного содержания ионов железа II.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lambardi, M. Protocol for micropropagation of selected economically–important horticultural plants / M. Lambardi, E. Ozudogru, S. Jain. – Springer Protocols: Humana press, 2013. – 490 p.
2. Pluta, S. 'Tiben' and 'Tisel' – new blackcurrant cultivars released in Poland / S. Pluta, E. Zurawicz // Acta Hort. – Vol. 585. – P. 221–223.
3. Trigiano, R.N. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises / R.N. Trigiano, D.J. Gray. – US/MA, CRC Press LLC., 1999–2000. – 454 p.
4. Vagiri, M. Health promoting compounds in black currants – the start of a study concerning ontogenetic and genetic effects / M. Vagiri, E. Johansson, K. Rumpunen // X International Rubus and Ribes Symposium. – 2011. – Vol. 1. – P. 427–431.
5. Аношенко, Б.Ю. Программы анализа и оптимизации селекционного процесса растений / Б.Ю. Аношенко // Генетика. – М.: Наука, 1994. – Т.30. – Приложение. – С. 8–9.
6. Боровиков, В.П. STATISTICA: Искусство анализа данных на компьютере / В.П. Боровиков. – СПб: Питер, 2001. – 688 с.
7. Бурмистров, А.Д. Ягодные культуры / А.Д. Бурмистров. – Москва: Агропромиздат, 1985. – 272 с.
8. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 350 с.
9. Жидехина, Т.В. Перспективные направления селекции черной смородины / Т.В. Жидехина // Садоводство и виноградарство. – 2001. – № 3. – С. 29–30.
10. Кудряшова, О.А. Метод стабильного введения сортовой голубики высокой *Vaccinium corymbosum* L. в культуру in vitro / О.А. Кудряшова, А.А. Волотович // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2012. – № 2. – С. 40–43.
11. Носкова, Т.В. Биологические особенности формирования урожая и его качества у сортов смородины на шпалере в ЦЧР: дис. ... к-та с.-х. наук: 06.01.05 / Носкова Т.В. – Мичуринск–наукоград, 2012. – 175 л.
12. Определитель растений юга Красноярского края / М.И. Беглянова [и др.] ; под общ. ред. М.И. Бегляновой. – Новосибирск: Наука, 1979. – 670 с.
13. Савельев, А.Т. Дикорастущие плодовые, ягодные и орехоплодные растения наших лесов / А.Т. Савельев, А.П. Шиманюк; под общ. ред. А.Т. Савельева. – Москва : Лесная промышленность, 1969. – 160 с.
14. Сидорович, Е.А. Клональное микроразмножение новых плодово-ягодных растений / Е.А. Сидорович, Е.Н. Кутас – Минск, 1996. – 246 с.
15. Степанова, Е.М. Черная смородина витаминная культура / Е.М. Степанова. – Москва : Пищепромиздат, 1950. – 57 с.
16. Таран, И.В. Зеленое строительство в малых городах / И.В. Таран, А.М. Агапова; под ред. А.В. Куминова. – Новосибирск : Наука, 1987. – 200 с.
17. Яковлева, Г.П. Энциклопедический словарь лекарственных растений и продуктов животного происхождения / Г.П. Яковлева, К.Ф. Блинова. – Санкт–Петербург: Специальная литература, 1999. – 408 с.

**THE ANALYSIS OF VARIABILITY OF QUANTITATIVE TRAITS AT «TISEL»
CULTIVAR OF *RIBES NIGRUM* REGENERANTS
IN VITRO IN THE PRESENCE OF IRON IONS IN DIFFERENT CONCENTRATION**

T.P. KUNAKHOVETS, O.A. KUDRYASHOVA, A.A. VOLOTOVICH

Summary

Results of the comparative analysis of variability of seven quantitative traits of blackcurrant regenerants of «Tisel» cultivar *in vitro* on nutrient, agarized mediums of WPM, Anderson and MS, in the presence of iron ions in standard and double concentrations are given. It is established that the presence of double concentration of iron ions at structure of nutrient medium on the basis of MS and Anderson authentically at $P < 0.01$ influences on the variability of crude weight and quantities of regenerant roots, reducing their indicators by 1.2–1.9 times, in comparison with control. Also reliable reduction of shoots height by 1.3 times on the MS medium while the indicator of roots length by 1.2 times exceeded the control was observed. The same indicator and the quantity of roots have reduced by 1.3 times in comparison with control on Anderson medium. Results of the dispersive analysis of data are given also. There are found optimal mediums for clonal micro propagation of «Tisel» cultivar. All of them are on the basis of MS and Anderson, with 1 mg per liter of BAP, 0.1 mg per liter of IBA and of double concentration of iron ions.

© Кунаховец Т.П., Кудряшова О.А., Волотович А.А.

Поступила в редакцию 24 сентября 2014г.