

УДК 57.085:582.717.7

**АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ  
У РЕГЕНЕРАНТОВ СОРТА «TISEL» RIBES NIGRUM IN VITRO**

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

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

Смородина черная (*Ribes nigrum* L.) – основной вид рода *Ribes* семейства Grossulariaceae [1], занимающий в настоящее время ведущее место среди ягодных культур в Республике Беларусь [2].

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* [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]. Сведения об изменчивости количественных признаков у смородины черной *in vitro* в настоящее время, в основном, сводятся к универсальному протоколу клонального микроразмножения растений этого вида *in vitro*, в целом, без учета генотипических различий между разными сортами смородины черной, которые (генотипические различия) влияют на специфичность ответа растений определенного сорта на изменившиеся условия культивирования.

В настоящей работе приведены результаты сравнительного анализа изменчивости семи количественных признаков 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 6–бензиламинопурина в разных концентрациях, а также ионов железа II в удвоенной концентрации.

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 микро–, 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 [4], разработанным на базе НИЛ КТР ПолесГУ на сортовой голубике высокорослой, и изложенном в заявке о выдаче патента на изобретение №А20111446 от 31.10.2011 года.

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, 5], Андерсона [3, 5] 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. MS + 1,0 мг/л 6–БАП;
5. MS + 1,5 мг/л 6–БАП;
6. MS + 2,0 мг/л 6–БАП;
7. WPM без фитогормонов (контроль);
8. WPM без фитогормонов,  $Fe^{+2} \times 2$ ;
9. WPM + 1,0 мг/л 6–БАП + 0,1 мг/л ИМК,  $Fe^{+2} \times 2$ ;
10. WPM + 1,0 мг/л 6–БАП;
11. WPM + 1,5 мг/л 6–БАП;
12. WPM + 2,0 мг/л 6–БАП;
13. AN без фитогормонов (контроль);
14. AN без фитогормонов,  $Fe^{+2} \times 2$ ;
15. AN + 1,0 мг/л 6–БАП + 0,1 мг/л ИМК,  $Fe^{+2} \times 2$ ;
16. AN + 1,0 мг/л 6–БАП;
17. AN + 1,5 мг/л 6–БАП;
18. AN + 2,0 мг/л 6–БАП.

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°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 [6] с использованием программы статистического анализа данных STATISTICA 6.0 [7]. Двухфакторный дисперсионный анализ данных и расчет доли влияния факторов на изменчивость исследуемых признаков проводили в программе статистического анализа AB-Stat 1.0, разработанной в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси [8].

Сравнительный анализ изменчивости показателей семи исследуемых признаков указывает на то, что питательная среда на основе MS во всех случаях способствует проявлению достоверной и существенной изменчивости всех признаков в присутствии 1–2 мг/л 6–БАП. Установлено, что питательные среды на основе MS и Андерсона в большинстве случаев способствуют проявлению достоверной и существенной изменчивости большинства признаков в присутствии удвоенной концентрации железа II и всех анализируемых признаков в присутствии комбинации 1 мг/л 6–БАП, 0,1 мг/л ИМК и  $Fe^{+2} \times 2$ .

Варьирование значений некоторых анализируемых признаков у регенерантов на контрольных питательных средах WPM, MS и Андерсона, без фитогормонов, наблюдалось в незначительных пределах: 2,2–2,4 см по высоте регенерантов; 1,6–1,7 шт. по количеству побегов у регенерантов; 8,7–9,0 шт. по количеству листьев у регенерантов; 0,12–0,14 г по сырому весу регенерантов.

В присутствии 1–2 мг/л 6–БАП происходило достоверное при  $P < 0,01$  уменьшение высоты регенерантов в 1,7–1,8 раза на основе MS, в 1,5–1,7 раза на основе WPM и в 1,6–1,8 раза на основе Андерсона. При этом в случае питательных сред WPM и Андерсона, наблюдалась тенденция увеличения высоты регенерантов с ростом концентрации 6–БАП в составе питательной среды.

Установлено, что с ростом концентрации 6–БАП в пределах 1–2 мг/л количество побегов у регенерантов на основе MS уменьшалось, но при этом все показатели превышали соответствующие показатели в контроле в 1,4–2,1 раза.

Установлена закономерность убывания показателей количества листьев с ростом концентрации 6–БАП в пределах 1–2 мг/л у регенерантов на основах MS или WPM, в то время как на основе Андерсона с ростом концентрации 6–БАП в пределах 1–2 мг/л наблюдалось увеличение показателей признака в 1,1–1,4 раза по сравнению с контролем. В присутствии разных концентраций 6–БАП у регенерантов на основе MS наблюдалось достоверное превышение показателей количества листьев над контрольными в 1,3–1,8 раза.

Установлено, что в присутствии разных концентраций 6–БАП у регенерантов на основе MS наблюдалось достоверное увеличение показателей признака ‘сырой вес регенерантов’ в 1,2–2,0 раза, в то время как на основе Андерсона, с ростом концентрации 6–БАП в пределах 1,0–1,5 мг/л показатели признака уменьшались в 1,1–1,3 раза (достоверно при  $P < 0,01$ , в случае 1,5 мг/л 6–БАП), а при дальнейшем увеличении концентрации 6–БАП до 2 мг/л достоверно при  $P < 0,01$  превышали показатели в контроле в 1,2 раза.

Сравнительный анализ укореняемости регенерантов на контрольных питательных средах разного состава, без фитогормонов, установил наиболее высокие показатели признака у регенерантов на основе MS (100%), в то время как на основе Андерсона укореняемость регенерантов составила 90%, а на основе WPM – всего 76%. Несмотря на уменьшение показателей укореняемости регенерантов на основе контрольной питательной среды WPM или Андерсона, по сравнению с контрольной средой MS, показатели количества корней и длины корней у регенерантов на WPM и Андерсона были достоверно при  $P < 0,01$  выше, соответственно, в 1,7–1,8 раза и в 1,4 раза, по сравнению с соответствующими показателями у регенерантов на MS.

В присутствии 1,0–1,5 мг/л 6–БАП у регенерантов на основе MS происходило образование корней только в 3–10% случаев, по сравнению с контролем, а также наблюдалось достоверное при  $P < 0,01$  уменьшение количества корней в 1,6–2,6 раза, и длины корней – в 1,7–5,1 раза, обратно пропорционально росту концентрации 6–БАП. Во всех остальных случаях в присутствии 6–БАП процесс образования корней у регенерантов прекращался.

Двухфакторный дисперсионный анализ установил в большинстве случаев высокодостоверное при  $P < 0,01$  влияние исследуемых факторов ‘основа питательной среды’ и ‘концентрация 6–БАП’ на изменчивость всех анализируемых признаков, за исключением высоты регенерантов, с долями влияния от 13–57%, в зависимости от признака.

Установлено высокодостоверное при  $P < 0,01$  влияние совокупности факторов ‘основа питательной среды’ и ‘концентрация 6–БАП’ на изменчивость признаков ‘сырой вес регенеранта’, ‘укореняемость регенерантов’, ‘количество корней’ и ‘длина корней у регенерантов’ с долями влияния 28%, 32%, 31% и 37%, соответственно.

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

Достоверно установлено (при  $P < 0,01$ ), что присутствие в составе питательной среды на основе MS и Андерсона двойной концентрации ионов железа влияет на такие признаки, как сырой вес регенерантов, укореняемость, уменьшая их в 1,2–1,9 раза, по сравнению с контролем. Изменение высоты побегов в сторону уменьшения наблюдалось также на среде MS и составило 1,3 раза, в то время как показатель длины корней в 1,2 раза превышает контрольный. Этот же показатель и признак ‘количество корней’ изменился в меньшую сторону по сравнению с контролем на среде Андерсона в 1,3 раза.

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 раза на основе трех питательных сред. При таком же уровне достоверности количество корней в 2,3 раза и их длина в 1,5 раза были меньше контрольных показателей на основе WPM, а на основах MS и Андерсона корней не наблюдалось.

## 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. Жидехина Т.В. Перспективные направления селекции черной смородины / Т.В. Жидехина // Садоводство и виноградарство. – 2001. – № 3. – С. 29–30.
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. 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.
5. Сидорович Е.А. Клональное микроразмножение новых плодово–ягодных растений / Е.А. Сидорович, Е.Н. Кутас – Мн., 1996. – 246 с.
6. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 350 с.
7. Боровиков В.П. STATISTICA: Искусство анализа данных на компьютере / В.П. Боровиков. – СПб: Питер, 2001. – 688 с.
8. Анощенко Б.Ю. Программы анализа и оптимизации селекционного процесса растений / Б.Ю. Анощенко // Генетика. – М.: Наука, 1994. – Т.30. – Приложение. – С. 8–9.