

УДК 634.723.1:631.81. [631.53:581.143.6

Е. В. КОЛБАНОВА¹, Н. В. КУХАРЧИК¹, Л. Ю. ТЫЧИНСКАЯ², В. П. СОКОЛ²

**ПОТРЕБЛЕНИЕ И НАКОПЛЕНИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ
РАСТЕНИЯМИ-РЕГЕНЕРАНТАМИ СМОРОДИНЫ ЧЕРНОЙ (*RIBES NIGRUM*)
НА ЭТАПАХ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ И УКОРЕНЕНИЯ *IN VITRO***

¹Институт плодоводства, аг. Самохваловичи, e-mail: kolbanova@tut.by,

²Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, e-mail: tychinlyu@gmail.com

(Поступила в редакцию 06.02.2014)

Введение. Микроэлементы представляют собой группу незаменимых минеральных элементов, выполняющих важные функции в жизнедеятельности растительных организмов. Они принимают участие в окислительно-восстановительных процессах, фотосинтезе, азотном и углеводном обменах, входят в состав активных центров ферментов и витаминов. Недостаток микроэлементов может угнетать рост и развитие растений. При исключении марганца из питательной среды в тканях растений возрастает уровень основных элементов минерального питания, нарушается их соотношение [1]. Дефицит цинка приводит к уменьшению укоренения из-за снижения метаболизма ауксина, поскольку цинк требуется в биосинтезе триптофана – предшественнике ауксина [2]. Уменьшение железа и магния в фазе индукции ризогенеза увеличивает число корней и их длину, что объясняется ролью данных элементов в биохимических процессах растений [3]. Дефицит бора сдерживает корнеобразование, препятствуя клеточному делению и растяжению и соответственно, росту корней [4]. В то же время в работе Н. Trindade, M. S. Pais [5] показано 10%-ное увеличение ризогенеза в случае полного удаления бора из питательной среды.

Правильно подобранные минеральные компоненты питательной среды и их концентрации способствуют оптимизации роста растений в культуре *in vitro*. Потребность в конкретных элементах питания отличается для разных культур и этапов развития растения [6–9].

Таким образом, изучение потребления элементов питания конкретными культурами на разных этапах развития дает возможность обоснованной модификации питательных сред в процессе культивирования *in vitro* плодовых и ягодных культур.

Цель исследования – установление потребления и накопления микроэлементов растениями-регенерантами смородины черной при культивировании *in vitro* для дальнейшей оптимизации условий их выращивания.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования служила смородина черная (*Ribes nigrum* L.) сортов Память Вавилова и Церера. На этапе микроразмножения использовали питательную среду: макро- и микросоли по Мурасиге и Скуга (MS) с добавлением витаминов В₁, В₆ и РР по 0,5 мг/л, аскорбиновой кислоты – 1,0 мг/л, глицина – 2,0 мг/л, мезоинозита – 100 мг/л, сахарозы – 30 г/л и 0,5 мг/л 6-бензиладенина (6-БА), рН 5,6–5,7. На этапе укоренения использовали питательную среду: ½ макро- и микросоли по MS с добавлением витаминов В₁, В₆ и РР по 0,5 мг/л, аскорбиновой кислоты – 1,0 мг/л, сахарозы – 20 г/л и 0,5 мг/л индолилмасляной кислоты (ИМК), рН 5,6–5,7. Длительность субкультивирования (пассаж) на этапе микроразмножения составляла 5 недель, на этапе ризогенеза – 6 недель. Растения культивировали в пробирках размером 200×22 мм с объемом питательной среды 10 мл.

Условия культивирования растений *in vitro*: освещение (лампы Phillips ЛД-54, 36 W) 2,5–3 тыс. лк, температура 21–23 °С и фотопериод 16/8 ч.

Минеральный состав исходных агаризованных питательных сред и остаточных питательных сред на этапах микроразмножения и укоренения, содержание микроэлементов в высушенных образцах смородины черной исследовали методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой VISTA PRO (Varian, США) в ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси».

Методика пробоподготовки питательной среды и растений

1. Взвешивается каждая пробирка с образцом питательной среды.
2. Пинцетом извлекается растение из пробирки.
3. Взвешивается пробирка с оставшейся питательной средой.
4. Для полного извлечения питательной среды пробирка нагревается на водяной бане, жидкое содержимое переливается в химический стакан, пробирка трижды промывается дозированным количеством (5 мл) разбавленной азотной кислоты (1:1), а затем деионизованной водой. Все смывы собираются в одном стакане.

5. Содержимое каждого стакана упаривается на электрической плитке до объема меньше 10 мл, а затем переливается в колбу емкостью 10 мл. Смывы со стакана переносятся в ту же колбу, объем доводится до 10 мл. Для учета привнесения изучаемых элементов в процессе пробоподготовки готовится «нулевая» проба, которая проходит все стадии пробоподготовки. В качестве минерализуемого субстрата используется деионизованная вода.

6. Извлеченное растение (п. 2) сушится на фильтровальной бумаге в течение суток, взвешивается, а затем сушится в вентилируемом сушильном шкафу при 105°C до постоянной массы (около 2 ч).

7. Высушенное растение взвешивается непосредственно в лайнерах для проведения микроволновой кислотной минерализации.

8. Кислотная минерализация проводится с использованием микроволновой системы MARS-5 по программе, рекомендуемой для растительного сырья фирмой SEM Corporation. Минерализаты собираются в колбы емкостью 10 мл, объем каждого образца доводится до 10 мл и проводятся измерения.

9. Полученные результаты анализа проб питательных сред (п. 5) и растений (п. 8) пересчитываются в концентрацию (мг/кг) элементного содержания по формуле:

$$C = \frac{n \times V_{\text{разв}}}{P},$$

где n – полученный результат содержания элемента в жидкой пробе с учетом данных по содержанию этого элемента в «нулевом» растворе, мг/л; $V_{\text{разв}}$ – объем пробы, 10 мл; P – вес образца, г (питательной среды или растения).

Измерения содержания микроэлементов в питательных средах проводили для 3 образцов в каждом опыте, в растениях – для 6 образцов.

Результаты и их обсуждение. Потребление микроэлементов растениями-регенерантами смородины черной из питательных сред для микроразмножения не превышает половины их содержания в исходной среде. Потребление Zn и Mn из питательной среды (в % от исходного) для обоих сортов было самым большим по сравнению с другими микроэлементами. В количественном выражении (мг/кг) питательная среда наиболее обедняется Mn (в среднем на 2,24 и 1,81 мг/кг соответственно по сортам) и наименее – B (на 0,26 и 0,21 мг/кг) (табл. 1).

Таким образом, добавление микроэлементов B, Fe, Zn и Mn в питательную среду MS в полном объеме [10] на этапе микроразмножения смородины черной нецелесообразно, так как потребление этих элементов значительно ниже их содержания в среде для культивирования.

Из питательной среды для укоренения растения-регенеранты также максимально использовали Mn (1,75 и 2,13 мг/кг в зависимости от сорта), далее по мере убывания следуют Fe, Zn и B (табл. 2).

Т а б л и ц а 1. Содержание микроэлементов в питательной среде для размножения и потребление их растениями-регенерантами смородины черной за одно субкультивирование, мг/кг

Микроэлемент	Содержание микроэлементов в питательной среде для размножения и потребление их растениями						
	исходное	Память Вавилова			Церера		
		остаточное содержание в среде	потребление		остаточное содержание в среде	потребление	
			мг/кг	%		мг/кг	%
B	0,96	0,70	0,26	25	0,75	0,21	22
Fe	6,38	5,57	0,81	13	5,69	0,69	11
Zn	3,00	1,75	1,25	42	1,97	1,03	34
Mn	6,59	4,35	2,24	34	4,78	1,81	27

Т а б л и ц а 2. Содержание микроэлементов в питательной среде для укоренения и потребление их растениями-регенерантами смородины черной за одно субкультивирование, мг/кг

Микроэлемент	Содержание микроэлементов в питательной среде для укоренения и потребление их растениями						
	исходное	Память Вавилова			Церера		
		остаточное содержание в среде	потребление		остаточное содержание в среде	потребление	
			мг/кг	%		мг/кг	%
B	0,55	0,16	0,39	71	0,31	0,24	44
Fe	3,73	2,23	1,51	40	1,63	2,10	56
Zn	1,70	0,66	1,04	61	0,26	1,44	85
Mn	3,56	1,81	1,75	49	1,43	2,13	60

На этапе ризогенеза количество микросолей, добавляемых в питательную среду MS, изначально уменьшено в 2 раза. Поэтому по сравнению с этапом микроразмножения, где потребление микроэлементов было максимальным для Zn (42 и 34 % в зависимости от сорта), а для остальных элементов гораздо ниже, на этапе ризогенеза данный показатель по всем изучаемым элементам существенно выше и в большинстве случаев превышает 50 %. Следует отметить, что различие в потреблении отдельных элементов растениями разных сортов на этапе укоренения в данном эксперименте было значительно больше, чем на этапе размножения. Одним из объяснений полученных результатов может быть разное соотношение корневой и вегетативной массы у растений-регенерантов разных сортов на этапе ризогенеза, а накопление микроэлементов в разных частях растений-регенерантов не изучалось.

Поскольку были проведены измерения содержания микроэлементов не только в питательных средах, но и в извлеченных из исследуемых образцов растениях, целесообразно сравнить соответствующие показатели, усредненные на 1 образец: убыль каждого элемента из питательной среды и соответствующее накопление его в 1 растении. Эти результаты приведены в табл. 3.

Т а б л и ц а 3. Убыль микроэлементов из питательной среды 1 образца в процессе субкультивирования и содержание их в 1 растении (в скобках), мг × 10⁻²

Сорт, этап	*P _{1раст} , мг	B	Fe	Zn	Mn	Σ
Память Вавилова, размножение	83,1	0,26 (0,22)	0,79 (1,21)	1,27 (1,24)	2,26 (2,23)	4,58 (4,90)
Церера, размножение	85,6	0,24 (0,22)	0,87 (1,28)	1,11 (1,30)	1,99 (2,30)	4,21 (5,10)
Память Вавилова, укоренение	109,6	0,41 (0,23)	1,63 (1,62)	1,10 (1,11)	1,87 (2,23)	5,01 (5,19)
Церера, укоренение	110,4	0,25 (0,26)	2,18 (2,43)	1,49 (1,56)	2,21 (2,61)	6,13 (6,86)

*P_{1раст} – вес 1 извлеченного из питательной среды и высушенного растения (среднее по 6 образцам).

Данные табл. 3 демонстрируют хорошее соответствие между результатами, полученными по питательной среде и по растениям-регенерантам. При очень близкой средней массе растений на этапе микроразмножения накопление отдельных микроэлементов для разных сортов, а также суммарное содержание микроэлементов в расчете на 1 растение (последняя колонка) практиче-

ски совпадают. Как было показано и выше, максимальное содержание характерно для Mn, примерно одинаковое – для Fe и Zn, минимальное – для В.

На этапе укоренения наблюдается увеличение содержания элементов в растениях-регенерантах. При этом, несмотря на рост массы растений на этапе укоренения (приблизительно на 30 %), для смородины сорта Память Вавилова все показатели, за исключением Fe, мало отличаются от этапа микроразмножения. Однако для растений сорта Церера на этапе укоренения как общее накопление микроэлементов, так и содержание отдельных микроэлементов значительно выше. Так, содержание Fe увеличивается почти в 2 раза относительно этапа микроразмножения, что не может быть обусловлено только увеличением среднестатистической массы растения. Для обоих сортов характерно также преобладание потребления (накопления) Fe по сравнению с Zn. Рекордом в этом плане опять же является Mn.

Можно отметить, что в питательных средах и в самих растениях-регенерантах смородины черной на обоих этапах обнаружена медь (Cu), однако, поскольку содержание этого элемента крайне мало и находится на уровне чувствительности метода, достаточно корректные количественные измерения были невозможны.

Заключение. Определены уровни потребления и накопления микроэлементов растениями-регенерантами смородины черной при культивировании *in vitro*. В количественном выражении (мг/кг) питательная среда для микроразмножения при культивировании растений-регенерантов смородины черной наиболее обедняется Mn и наименее – В, на этапе укоренения растения-регенеранты также максимально используют Mn, далее в порядке убывания – Fe, Zn и В. Убыль микроэлементов из питательной среды (в одном образце) и их накопление в одном растении практически совпадают. В питательных средах и в самих растениях-регенерантах на этапах микроразмножения и укоренения обнаружена медь.

Литература

1. Полевой В. В. // Физиол. растений. М., 1989. С. 464.
2. Dell B. E., Wilson S. A. // Plant and Soil. 1985. Vol. 88, N 3. P. 377–384.
3. Fang W. C., Kao C. H. // Plant Sci. 2000. Vol. 158, N 1/2. P. 71–76.
4. Lukaszewski K. M., Blevins D. G. // Plant Physiol. 1996. Vol. 112, N 3. P. 1135–1140.
5. Trindade H., Pais M. S. // In Vitro Cell. Devel. Biol. Plant. 1997. Vol. 33, N 1. P. 1–5.
6. George E. F., Sherrington P. D. // Plant propagation by tissue culture. London. Exegetics. 1984. Cap. 5. P. 125–171.
7. Schmitz U., Lörz H. // Plant Sci. 1990. Vol. 66. P. 95–111.
8. Dantas A. K., Majada J. P., Fernandez B., Canal M. J. // Plant Growth Regul. 2001. Vol. 33, N 3. P. 237–243.
9. Dussert S., Verdeil J. L., Rival A. et al. // Plant Sci. 1995. Vol. 106. P. 185–193.
10. Murashige T., Skoog F. // Physiol. Plantar. 1962. Vol. 15. P. 473–497.

E. V. KOLBANOVA, N. V. KUKHARCHIK, L. YU. TYCHINSKAYA, V. P. SOKOL

ABSORPTION AND ACCUMULATION OF MICROELEMENTS BY BLACK CURRANT (*RIBES NIGRUM*) PLANTS DURING PROPAGATION AND ROOTING *IN VITRO*

Summary

Absorption and accumulation of microelements by black currant plants during the propagation *in vitro* were established. The highest rate of the absorption of the tested microelements (mg/kg) from the nutrient medium by plants on the stage of shoot proliferation was noticed for Mn, while the lowest rate – for microelement B. Black currant plants absorbed a lot of Mn during *in vitro* rooting, then they intaked Fe, Zn and B (in the order of decreasing). Average losses of microelements concentration in the nutrient medium (per one tube) and their accumulation in the plant basically agreed. Cu was detected during multiplication and rooting *in vitro* in both the nutrient medium and plants.