

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДА IN VITRO ПРИ РАЗМНОЖЕНИИ ВИНОГРАДА

С.А. Корнацкий

Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Виноград, наряду с картофелем и земляникой, считается одной из модельных культур, на которых еще в семидесятые годы 20 века началась отработка метода in vitro в практике отечественного растениеводства. Как известно, основой метода клонального микроразмножения является возможность гормональной стимуляции непрерывного в течение календарного года формирования и развития латеральных меристем у начального экспланта в асептических условиях на искусственных питательных средах [2, 4, 8,]. Практическая реализация метода позволяет максимально полно раскрыть потенциал растительного организма к размножению, тиражировать растения требуемых генотипов, получая при этом большое количество однородного посадочного материала и сокращая тем самым сроки распространения новых сортов и клонов по сравнению с традиционными методами в несколько раз [5–7].

Чаще всего в настоящее время, как и ранее, для культивирования винограда in vitro используют питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) или ее различные модификации [9, 10]. Однако, как показало изучение состояния вопроса, нередко появляются взаимно противоположные мнения относительно типа и концентраций фитогормонов, а также ряда элементов минерального питания и их количеств. Это, безусловно, определено связано с очень разнообразной генетикой винограда и большим количеством сортов, реализация морфо-биологического потенциала которых в стерильных условиях сильно различается как среди сортов, так и в сравнении развития этих же сортов in vitro и в обычных условиях [1, 3].

Цель работы – поиск наиболее рациональных подходов к микроразмножению винограда на основе модернизации питательной среды и техники культивирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в биотехнологической лаборатории агробиотехнологического департамента Аграрно-технологического института Российского университета дружбы народов в 2018–2019 гг. В качестве объекта исследований был взят сорт винограда Кодрянка. Для введения в культуру использовали начальные экспланты размером 2–3 мм, вычлененные из проросших почек на черенках после периода покоя в феврале месяце. Перед посадкой исходный материал поверхностно стерилизовали 1%-ным раствором азотнокислого серебра в течение 8 минут. На этапе введения изучали следующие варианты питательных сред: 1) Мурасиге и Скуга (базовая – контроль), 2) Мурасиге и Скуга (модифицированная 2-х кратным увеличением количества KH_2PO_4) с низкими концентрациями цитокининов: 6-бензиламинопурина (6-БАП) – 0,05 мг/л и 2-изопентиладенина (2-ИПА) – 0,1 мг/л. На этапе размножения к изучению была добавлена питательная среда WPM (базовая) и 2-хкратно увеличены концентрации цитокининов: 6-БАП – 0,1 мг/л и 2-ИПА – 0,2 мг/л. Повторность в каждом варианте обоих опытов была 20-ти кратная. pH питательной среды перед автоклавированием устанавливали в значении 5,0. Культивирование мериклонов проводили в светоконате при температуре воздуха +22...+ 24° С, освещенности 5000–6000 люкс и продолжительности фотопериода 16 часов. На 30-й день после посадки учитывали приживаемость эксплантов и визуальную оценку наличия патогенной микрофлоры, через 60 суток культивирования мериклонов регистрировали агробиологические параметры (длину стебля, количество листьев, число корней и их длину).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Опыт по введению эксплантов сорта Кодрянка в культуру был поставлен после ряда неудачных попыток выполнения этой операции при недостаточном количестве исходного материала. В целом, использование стандартной в таком случае методики позволяло получать достаточно высокий выход развивающихся стерильных эксплантов на начальном этапе. Однако, вскоре после пробуждения почек и отрастания коротких побегов они приобретали антоциановый оттенок, их рост затормаживался, далее

окраска растений менялась на коричневую и они в своем большинстве погибали к исходу второго месяца после введения в культуру. Пересадки выживших на питательную среду того же состава также были безуспешны. В этой ситуации возникло предположение о дисбалансе основных элементов питания в составе питательной среды, в частности нехватке фосфора. Питательная среда Мурасиге-Скуга была модифицирована удвоением количества K_2HPO_4 (340,0 мг/л), что имело положительный эффект на фоне оптимальных для этого этапа концентраций цитокининов (табл. 1). В ходе опыта удалось получить достаточно убедительный результат по выходу жизнеспособных культур. Еще более важным отличием эксплантов от контроля в этом случае была их естественная зеленая окраска, что свидетельствовало о нормализации ростовых процессов. К окончанию учетного периода экспланты в экспериментальных вариантах представляли собой побеги длиной 1–3 см с листьями, которые были использованы в следующем опыте с одноглазковыми черенками.

Таблица 1. Влияние минерального и гормонального состава питательной среды на жизнеспособность начальных эксплантов винограда сорта Кодрянка на этапе введения в культуру.

Вариант		Показатели		
Питательная среда	Регулятор (концентрация)	Инфицировано эксплантов, %	Погибло эксплантов, %	Выжило эксплантов, %
MS (контр.)	6-БАП (0,05 мг/л)	10	70	20
	2-ИПА (0,1 мг/л)	15	55	30
MS (модиф.)	6-БАП (0,05 мг/л)	15	20	65
	2-ИПА (0,1 мг/л)	5	25	70

Исходя из литературных данных, для винограда возможны два варианта размножения *in vitro*: пролиферация и черенкование. Предварительное изучение вариантов с пролиферацией при относительно высоких концентрациях цитокининов – 6-БАП (1,0 мг/л) и 2-ИПА (2,0 мг/л) выявило недостаточную технологичность данного приема для данного сорта. Пазушное побегообразование было малопродуктивным, отрастающие побеги тонкими с короткими междоузлиями и мелкими листьями. Этим затруднялись работы по их разделению без микроскопа и, более того, часть таких побегов погибала после пересадки на новую среду, что обусловило предпочтение приему черенкования.

Таблица 2. Результаты роста и развития одноглазковых микрочеренков винограда сорта Кодрянка в течение 2-х месяцев на различных питательных средах.

Вариант		Показатели				
Питательная среда	Регулятор (концентрация)	Длина стебля, см.	Количество листьев, шт.	Количество корней, шт.	Длина корней, см.	Выход микрорастений, %
MS (контр.)	6-БАП (0,1 мг/л)	1,9	1,6	0,9	2,1	15
	2-ИПА (0,2 мг/л)	2,6	2,3	1,1	2,3	20
MS (модиф.)	6-БАП (0,1 мг/л)	6,4	6,1	2,4	5,8	85
	2-ИПА (0,2 мг/л)	7,5	6,6	1,6	6,4	95
WPM	6-БАП (0,1 мг/л)	7,9	5,7	2,7	6,5	90
	2-ИПА (0,2 мг/л)	8,6	4,6	2,0	6,5	95
НСР ₀₅		1,8	1,4	0,6	1,7	

У большей части черенков после высадки в течение 10–14 дней пробуждались почки и начинался рост побегов. Некоторые черенки за период наблюдений не проявили признаков роста, что и обусловило определенный выход микрорастений (табл. 2). По эффективности модифицированная нами среда MS и среда WPM оказались близкими. На среде MS (модиф.) растения формировали несколько большее количество листьев, однако на среде WPM отмечена большая средняя длина стебля за счет размера междоузлий. В обоих вариантах, независимо от конкретного цитокинина и его концентрации растения выглядели полноценно, при этом они сформировали хорошую корневую систему (рис. 1). Это позволило успешно провести адаптацию микрорастений к нестерильным условиям.



Рис. 1. Внешний вид микрорастений винограда сорта Кодрянка перед высадкой на адаптацию (слева – среда WPM / 2-ИПА (0,2 мг/л); справа – среда MS (модиф.) / 2-ИПА (0,2 мг/л).

Основными результатами проведенных исследований явилось то, что были успешно подобраны питательные среды для введения в культуру и размножения сорта винограда Кодрянка. По-видимому, модифицированная среда МС и среда WPM оказались более сбалансированными по элементам питания для культуры винограда в сравнении с контролем – базовой средой МС. Уже на стадии размножения были получены нормальные пробирочные растения с хорошо развитой корневой системой, что исключило необходимость в традиционном этапе укоренения микропобегов. Эти растения могут быть подвергнуты дальнейшему черенкованию для размножения или после адаптации к нестерильным условиям перенесены в почву для дорастивания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арестова Н.О., Рябчун И.О. Особенности продуктивной регенерации подвойных сортов винограда при клональном микроразмножении // Магарач. Виноградарство и виноделие, 2018. – № 3(105). – С. 7 – 9
2. Батукаев А.А., Зармаев А.А., Батукаев М.С. Использование регуляторов роста в системе производства оздоровленного посадочного материала винограда // Труды БГУ, 2013. – 8(2). – С. 43–47
3. Бугасенко Л.О., Иванова-Ханіна Л.В. Морфогенез винограду в культурі *in vitro* // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”, 2011. – Т. 24 (63). – № 2. – С. 73–82
4. Бургуни А.Б., Бутенко Р.Г., Катаева Н.В., Голодрига П.Я. Быстрое клональное размножение виноградного растения // Сельскохозяйственная биология, 1983. – № 7. – С. 48–50
5. Дорошенко Н.П., Арестова Н.О., Соболев А.А. Особенности культивирования *in vitro* некоторых технических сортов винограда // Виноделие и виноградарство, 2004. – № 4. – С. 34–36
6. Карагезов Т.Г., Махмудова И.М., Луканина Н.Н. Генотипические особенности морфогенеза винограда при микроклональном размножении в условиях *in vitro* // Известия Академии наук Азербайджанской ССР (Серия биологические науки), 1988. – № 5. – С. 14–19.
7. Медведева Н.И., Поливар Н.В. Особенности микроклонального размножения интродуцентов и клонов винограда // Научный журнал КубГАУ, 2008. – № 40(6). – С. 1 – 18
8. Скороход В.О. Промислова біотехнологія мікроклонального розмноження винограду в культурі «*in vitro*» // Скороход В.О. – Херсон: Айлант, 2000. – 327 с.
9. Murashige T. Plant propagation through tissue cultures // Ann. Rev. Plant Physiol., 1974. – V. 25. – P. 135–166.
10. Prakash S., Hoque M.I., Brinks T. Culture media and containers // Proc. Tech. Meet.
11. IAEA «Low cost options for tissue culture technology in developing countries», Vienna, 2002. – P. 29–40