

УДК 634.8:581.177

**ОСОБЕННОСТИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО  
РАЗМНОЖЕНИЯ ИНТРОДУЦЕНТОВ И  
КЛОНОВ ВИНОГРАДА**

Медведева Н.И.

к. с.-х. н., ст. научный сотрудник

Поливарова Н.В.

мл. научный сотрудник

*Крымская опытно-селекционная станция  
СКЗНИИСuB, Краснодарский край, Россия*

Трошин Леонид Павлович

д. б. н., профессор

*Кубанский государственный аграрный  
университет, Краснодар, Россия*

В статье освещены особенности микроклонального размножения как интродуцированных сортов и клонов винограда, так и созданных в Кубанском государственном аграрном университете отечественных клонов, которые переданы на госиспытания и для производственного освоения.

Ключевые слова: СОРТ, КЛОН, АПЕКС, ЭКСПЛАНТ, РЕГЕНЕРАНТ, ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА, ФИТОГОРМОНЫ, ПИТАТЕЛЬНЫЕ СУБСТРАТЫ.

UDC 634.8:581.177

**PECULIARITIES OF MICROCLONAL  
PROPAGATION OF INTRODUCERS AND  
GRAPE CLONES.**

Medvedeva N.I.

Cand. Agr. Sci., senior researcher

Polivara N.V.

junior research worker

*Krymsk experimental selection station of SCRIHG  
Krasnodar krai, Russia*

Troshin Leonid Pavlovich

Dr.Sci.Biol., professor

*Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia*

Peculiarities of microclone propagation of introduced varieties and grape clones, and home varieties created in Kuban State Agrarian University as well, which were given for national trial and for industrial production are discussed in this article.

Key words: VARIETY, CLONE, APEX, EXPLANT, REGENERANT, NUTRITIVE MEDIUM, PHYTOHORMONES, NUTRITIVE SUBSTRATES.

## **ВВЕДЕНИЕ**

Виноградарство – это одна из важнейших отраслей садоводства и при правильной постановке дела может стать самой рентабельной, даже при производстве посадочного материала различными способами, в том числе и *in vitro*. На это указывает весь мировой опыт [3–6, 9–10, 14–15, 17]. Имеется в этом плане и положительный российский опыт (Краснодарский край, Ростовская область, Чеченская Республика) [1–3, 6–9, 16]. Известно, что для создания интенсивных насаждений, наиболее пригодных к долголетней эксплуатации, необходимо привлечение сертифицированного посадочного материала [7, 9–15].

Основой технологии *in vitro* является базисный посадочный материал, свободный от вредителей и болезней. Производство такого

посадочного материала возможно только в научных учреждениях с использованием новейших методов биотехнологии [6–7, 14–15].

Одним из них является метод культуры апикальных меристем с последующим клональным микроразмножением. Этот способ эффективен и экономичен, так как позволяет в короткие сроки получить нужное количество здоровых корнесобственных растений винограда.

Следует отметить, что коэффициент микроклонального размножения –  $10^5$ – $10^6$  микроклонов в год при 5–100 растениях на одно, получаемых традиционным путем. Таким образом, клональное микроразмножение – один из самых перспективных путей ускоренного размножения остродефицитных сортов и клонов винограда. С целью создания маточников высоких производственных категорий – супер-суперэлитных, суперэлитных, элитных.

**Новизна исследований** состоит в подборе и оптимизации питательных сред, используемых при оздоровлении и клональном микроразмножении сортов и клонов винограда с учетом их генотипических особенностей в условиях *in vitro*.

**Цель исследований** – изучение и отработка элементов технологии микроклонального размножения генотипов винограда *in vitro*.

**Задачи исследований:**

- изучить влияние различных питательных сред, а также отдельных их компонентов на рост и развитие интродуцированных, селекционных, аборигенных сортообразцов и дикорастущих форм винограда на этапах размножения и укоренения *in vitro*;

- отработать методику перевода полученных пробирочных растений оздоравливаемых сортообразцов винограда в нестерильные условия.

**Состояние изученности вопроса**

В лаборатории биотехнологии ГНУ «Крымская опытно-селекционная станция» с 2000 г. проводится работа по производству оздоровленного посадочного материала винограда, свободного от вирусных, грибных и бактериальных заболеваний. За период с 2000 по 2007 гг. отработана методика микрклонального размножения растений винограда. Подобраны питательные среды и введено в культуру *in vitro* 120 районированных сортов, клонов и подвоев винограда.

Выращены и переданы в производство для высадки на суперэлитный черенковый маточник, а также для реализации хозяйствам края 45000 оздоровленных корнесобственных саженцев более 70 сортообразцов.

### **Материал и методика исследований**

Работа проводилась в лаборатории биотехнологии ГНУ «Крымская опытно-селекционная станция». Объектами исследований служили интродуценты, селекционные и аборигенные сортообразцы, а также дикорастущие формы, поставленные кафедрой виноградарства Кубанского государственного аграрного университета.

В культуру *in vitro* было введено 23 сортообразца винограда (таблица 1).

В результате исследований прошлых лет разработана технологическая цепочка, которая предусматривает стерильность получения исходных эксплантов и дальнейшую работу с ними в асептических условиях: мытье → сушка химической посуды → стерилизация посуды и других необходимых материалов сухим паром → приготовление искусственных питательных сред → их автоклавирование → пересадка растительного материала в условиях *in vitro* → выращивание растений *in vitro*.

Размер вводимого в культуру апекса составляет 0,3 : 0,5 мм.

Стерилизацию растительного материала проводили 0,1 %-м раствором йодида ртути HgJ<sub>2</sub> с экспозицией 4 минуты и последующей 5-кратной отмывкой в стерильной воде, а также с экспозицией по 5 минут.

**Таблица 1 – Сортообразцы винограда, введенные в культуру *in vitro* в 2007 г.**

№ п/п	Сортообразец	Количество меристем, введенных в культуру <i>in vitro</i>
1	Алиготе клон	8
2	Каберне-Совиньон 5а	11
3	Каберне-Совиньон 15	19
4	Мерло 14	9
5	Пино белый 6	9
6	Пино белый 31	3
7	Пино белый 32	4
8	Пино серый 46	11
9	Рислинг Алькадар 34	13
10	Рислинг Алькадар 34 а	13
11	Рислинг Алькадар 34 б	3
12	Рислинг анапский	6
13	Рислинг 4-9-2	64
14	Рислинг 4-12-201-15-1	5
15	Рислинг 9-6-4	8
16	Рислинг 9-9-1	10
17	Шардоне 45	5
18	Ркацителы Магарача	32
19	Ркацителы клон	15
20	Крымчанин	15
21	Новоукраинский ранний	16
22	Мускат одесский	5
23	Рислинг 830	9

Экспланты вычленили в асептических условиях в ламинарных боксах марки ВЛ-12 под бинокулярным микроскопом (МБС-1) при 7-кратном увеличении с помощью скальпеля и пинцета.

Для культивирования эксплантов использована основная

питательная среда Мурасиге и Скуга, а также ряд ее модификаций [14–15, 17].

На всех этапах развития растений-регенерантов в питательную среду добавляли антибиотик цефотаксин в концентрации 10 мг/л.

Экспланты культивировали в пробирках размером 210 x 140 мм на светоустановках в условиях светозала при  $t +24^{\circ} \text{C}$  и освещении 6 тыс. люкс в течение 16 часов в сутки.

### Результаты исследований

Процесс клонального микроразмножения можно разделить на этапы.

1. Выбор растения-донора, визуально здорового, с типичными сортовыми признаками и хорошей урожайностью.

2. Ввод в культуру *in vitro* апикальных меристем оздоравливаемых сортообразцов и получение хорошо растущей стерильной культуры растительной ткани.

3. Собственно микроразмножение, когда достигается получение максимального количества мериклонов в условиях *in vitro*.

4. Получение хорошо развитых регенерантов и укоренение их в условиях *in vitro*.

5. Перевод пробирочных растений в нестерильные условия.

6. Выращивание полученного оздоровленного материала в условиях теплицы и подготовка их к высадке в поле.

Следует отметить, что для культивирования меристем в условиях *in vitro* на каждом этапе культивирования требуется применение определенного состава питательной среды. Необходимо также отметить, что способность сортообразцов винограда к размножению на искусственных питательных средах *in vitro* зависит от индивидуальных

особенностей каждого испытуемого генотипа.

**Изучение и отработка элементов в технологии  
микрклонального размножения генотипов винограда *in vitro***

Для ввода в культуру *in vitro* апикальных меристем сортообразцов винограда аборигенных и дикорастущих форм использовалась модификационная среда Мурасиге и Скуга FMi с измененным содержанием макросолей (таблица 2).

**Таблица 2 – Концентрация макросолей в питательных средах**

Питательная среда	Концентрация мг/л			
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	KNO <sub>3</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O
ГМ <sub>1</sub>	1237	1425	277,5	277,5
Standart	1650	1900	170,0	370,0

За ростом меристемной ткани на питательных средах проводили наблюдения через 10, 20 и 30 дней. Результаты приведены в таблице 3.

**Таблица 3 – Рост меристемной ткани в зависимости от состава питательной среды оздоравливаемых сортообразцов винограда**

Сортообразец	Питательная среда	Рост меристемной ткани, мм, через					
		10 дней		20 дней		30 дней	
		средн.	max	средн.	max	средн.	max
1	2	3	4	5	6	7	8
Рислинг 4-9-2	ГМ <sub>1</sub>	8,5	9,5	17,0	20,0	22,0	23,0
	Standart	6,0	6,0	15,0	17,5	20,5	21,0
Каберне-Совиньон 5а	ГМ <sub>1</sub>	6,5	7,5	17,0	20,0	21,0	23,0
	Standart	5,5	6,5	15,5	16,0	20,5	21,0
Ркацителли-Магарача	ГМ <sub>1</sub>	7,0	7,5	15,0	19,5	20,5	22,0
	Standart	5,0	6,0	14,0	16,0	19,0	21,0
Рислинг анапский	ГМ <sub>1</sub>	6,5	7,0	14,5	18,0	20,0	20,5
	Standart	5,5	6,0	13,0	14,5	18,0	20,0

Как видно из данных, приведенных в таблице 3, рост и развитие апикальных меристем у испытуемых сортообразцов винограда протекали неодинаково.

На питательной среде ГМ прирост ткани был гораздо выше, чем на стандартной питательной среде и составил: для сортов Рислинг 4-9-2 – 22 мм, Каберне-Совиньон 5а – 21 мм, Ркацители Магарача – 22 мм, Рислинг анапский – 20,5 мм.

**Изучение влияния различных питательных сред, а также отдельных их компонентов на этапах микроразмножения и укоренения *in vitro***

На этапе микроразмножения экспланты сортообразцов винограда были пересажены на питательные среды для размножения М<sub>2</sub>, ДМ<sub>2</sub>, БМ<sub>2</sub>, состав которых приведен в таблице 4.

**Таблица 4 – Состав питательных сред, используемых на этапе микроразмножения**

Химические вещества	Концентрация, мг/л		
	МТ <sub>1</sub> (St.)	БМ <sub>2</sub>	ДМ <sub>1</sub>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	825	1650
KNO <sub>3</sub>	1900	950	1900
KH <sub>4</sub> PO <sub>3</sub>	170	185	170
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370	185	370
Микроэлементы	Стандартн. кол-во	Стандартн. кол-во	Стандартн. кол-во
Хелатное железо	Стандартн. кол-во	Стандартн. кол-во	Стандартн. кол-во
Мезо-инозит	100	100	75
В <sub>6</sub>	5,8	5,8	5,8
Р-Р	5,3	5,3	5,3
6-БАП	2	2	2
Парааминобензойная к-та	-	-	5
Аденин	-	-	80
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	170	170	170
CaCL <sub>2</sub>	440	440	440
Сахароза	30 г	30 г	30 г
Агар-агар	6 г	6 г	6 г

На питательных средах М<sub>2</sub>, БМ<sub>2</sub>, ДМ<sub>2</sub> экспланты культивировали 14 дней, в этот период у них происходила интенсивная пролиферация побегов из нижних узлов. В конце пассажа экспланты представляли собой

конгломераты из почек и микропобегов. Эти агрегаты почек расчленили и пересаживали на свежую питательную среду, при этом был определен коэффициент размножения (таблица 5).

**Таблица 5 – Коэффициент размножения у оздоравливаемых сортообразцов винограда на питательных средах БМ<sub>2</sub>, ДМ<sub>2</sub>, М<sub>2</sub>**

Сортообразец	Среда	Коэффициент размножения 1 : N
Рислинг 4-9-2	БМ <sub>2</sub>	9,3
		9,8
		10,2
Каберне-Совиньон 5а	БМ <sub>2</sub>	9,5
	ДМ <sub>2</sub>	9,7
	М <sub>2</sub> (Standart)	10,5
Рислинг Магарача	БМ <sub>2</sub>	9,0
	ДМ <sub>2</sub>	10,1
	М <sub>2</sub> (Standart)	10,8
Рислинг анапский	БМ <sub>2</sub>	10,9
	ДМ <sub>2</sub>	11,1
	М <sub>2</sub> (Standart)	

Как видно из данных, приведенных в таблице 5, коэффициент размножения у всех перечисленных сортов выше на стандартной среде М<sub>2</sub>. На средах БМ<sub>2</sub>, ДМ<sub>2</sub> наблюдались морфологические изменения растений-регенерантов – побурение ткани, а также витрификация. В дальнейшем среды БМ<sub>2</sub> и ДМ<sub>2</sub> больше не использовали для микроразмножения.

В связи с этим возникла необходимость в подборе оптимального состава питательной среды для дальнейшего клонального микроразмножения оздоравливаемых сортообразцов винограда.

Одним из факторов, определяющих развитие меристематической ткани на искусственной питательной среде в условиях *in vitro*, является наличие в ней регулятора роста цитокинина, который снимает апикальное



доминирование и стимулирует пролиферацию. Поэтому был поставлен опыт по выявлению наиболее эффективной концентрации фитогормона для оздоравливаемых сортообразцов винограда с учетом их генотипической специфики. В питательную среду Мурасиге и Скуга вводили 6-БАП в различных концентрациях (0,1; 0,2; 0,4 мг/л) (таблица 6) и высаживали регенеранты оздоравливаемых сортов винограда. В ходе опыта проводилось изучение влияния концентрации 6-БАП на размножение регенерантов.

**Таблица 6 – Влияние концентрации цитокинина 6-БАП на коэффициент размножения регенерантов оздоравливаемых сортообразцов винограда в условиях *in vitro***

№№ п/п	Сортообразец	Концентрация 6-БАП, мг/л			
			0,1	0,2	0,4
		Коэффициент размножения 1 : N			
1	Алиготе клон	1,0	2,9	4,1	8,6
2	Каберне - Совиньон 5а	1,0	3,5	5,5	9,9
3	Каберне - Совиньон 15	1,0	3,1	5,1	9,2
4	Мерло 14	1,0	3,0	4,9	6,0
5	Пино белый 6	1,0	2,7	5,2	8,9
6	Пино белый 31	1,0	3,0	5,3	8,8
7	Пино белый 32	1,0	3,0	5,1	9,2
8	Пино серый 46	1,0	3,1	5,4	8,9
9	Рислинг Алькадар 34	1,0	3,4	5,5	9,0
10	Рислинг Алькадар 34 а	1,0	3,5	5,5	9,1
11	Рислинг Алькадар 34 б	1,0	3,3	5,4	9,0
12	Рислинг анапский	1,0	4,1	5,7	9,3
13	Рислинг 4-9-2	1,0	4,8	5,8	9,4
14	Рислинг 7-12-201-15-1	1,0	4,2	6,0	9,7
15	Рислинг 9-6-4	1,0	4,3	5,9	9,1
16	Рислинг 9-9-1	1,0	3,8	5,7	9,0
17	Шардоне 45	1,0	4,0	6,0	9,1
18	Ркацителли Магарача	1,0	4,2	6,1	9,9
19	Ркацителли клон	1,0	3,9	5,9	9,1
20	Крымчанин	1,0	3,8	6,1	9,3
21	Новоукраинский ранний	1,0	3,5	5,5	8,9
22	Мускат одесский	1,0	3,6	5,7	8,9
23	Рислинг 830	1,0	3,5	5,7	10,2

Как видно из данных, приведенных в таблице 6, более высокий коэффициент размножения у всех испытуемых сортообразцов винограда был на среде, содержащей 6-БАП в концентрации 0,4 мг/л.

Следует также отметить, что способность к размножению у оздоравливаемых сортообразцов винограда была неодинакова. Так, среди сортов самый высокий коэффициент размножения был у образцов Каберне-Совиньон 5а, Ркацители Магарача, Рислинг 830, Рислинг 7-12-201-15-1 и составил 9,9; 9,9; 10,2; 9,7, соответственно.

Слабее других размножались сорта: Алиготе клон, Пино белый 6, Пино белый 31, Пино серый 46, Новоукраинский ранний, Мускат одесский, Мерло 14. Коэффициент размножения у них был в пределах: 8,6; 8,9; 8,8; 8,9; 8,9; 6,0, соответственно.

Учитывая довольно низкую способность к размножению некоторых сортообразцов винограда в условиях *in vitro*, были проведены исследования по подбору более эффективного состава питательной среды.

В опыте испытывались два варианта питательной среды Мурасиге и Скуга, в которую помимо цитокинина 6-БАП добавляли еще одно ростовое вещество – гибберелловую кислоту в концентрации 0,1 и 0,2 мг/л.

В ходе опыта был отмечен интенсивный рост меристематической ткани, укрупнение листовых пластинок уже в первые две недели. Однако здесь наблюдалась очень сильная витрификация микропобегов (таблица 7).

**Таблица 7 – Развитие регенерантов на среде с содержанием гиббереллина**

№ п/п	Сортообразец	Коэффициент размножения		Количество витрифицированных побегов, %	
		Концентрация гиббереллина, мг/л			
			0,2	0,1	0,2
1	Алиготе клон	15,7	18,3	83,7	89,5
2	Пино белый 6	17,2	19,1	84,5	90,1

3	Пино белый 31	17,1	19,0	83,2	89,9
4	Пино серый 46	17,2	19,2	84,5	90,0
5	Новоукраинский ранний	16,5	18,9	83,8	91,1
6	Мускат одесский	16,4	18,3	84,6	90,3
7	Рислинг 830	16,5	18,2	82,1	89,1

Как видно из данных, приведенных в таблице 7, коэффициент размножения у всех испытуемых сортообразцов винограда на среде с гиббереллином довольно высок.

Причем, в варианте с концентрацией гибберелловой кислоты – 0,2 мг/л пролиферация была более активной, коэффициент размножения был выше у всех испытываемых сортообразцов, чем в варианте с содержанием ГК – 0,1 мг/л. Следует также отметить разницу в способности к размножению в условиях *in vitro* между различными сортами винограда.

Так, у сорта Пино белый 6 и Пино серый 46 коэффициент размножения был выше, чем у других образцов и составил 19,1 и 19,2. Слабее других размножался сорт Рислинг 830. Коэффициент размножения у него был 18,2.

Однако следует отметить очень сильную витрификацию у регенерантов испытуемых сортообразцов на среде с гиббереллином. Причем, в обоих вариантах она была очень высокой и составила у всех сортообразцов 89,5–91,3 %.

Следующий этап микроклонального размножения – укоренение полученных микрорастений в условиях *in vitro*. Для получения ризогенеза регенеранты высаживались на обедненную жидкую питательную среду Мурасиге и Скуга, содержащую половинное количество макро- и микроэлементов, полный набор витаминов и фитогормон ауксин. В исследованиях испытывали два вида ауксинов:  $\beta$ -индолилуксусную кислоту и  $\alpha$ -нафтилуксусную кислоту в концентрациях – 0,2 мг/л. Результаты опыта приведены в таблице 8.

Результаты исследований показали, что оба ауксина  $\beta$ -ИУК и  $\alpha$ -ИУК вполне приемлемы для использования их в качестве интродуктов ризогенеза у пробирочных растений, так как существенных различий в корневой системе у испытуемых сортообразцов не обнаружено.

**Таблица 8 – Рост корневой системы в зависимости от используемого ауксина у пробирочных растений оздоравливаемых сортообразцов винограда**

№ п/п	Сортообразец	Длина корней, см	
		Концентрация – 0,2 мг/л	
		$\beta$ -ИУК	$\alpha$ -ИУК
1	Ркацители Магарача	3,1	2,9
2	Шардоне 45	3,2	3,0
3	Рислинг 4-9-2	2,9	2,7
4	Каберне-Совиньон 5а	3,5	3,0

**Оптимизация методов предварительного закаливания пробирочных растений перед высадкой в нестерильные условия**

Важным этапом в оздоровлении сортообразцов винограда с использованием методов биотехнологии является перевод полученных пробирочных растений в нестерильные условия.

В ходе работ была модифицирована методика по переводу пробирочных растений на почвенных субстратах.

Опытным путем установлена необходимость предварительного закаливания растений. При этом испытывались следующие варианты закаливания: пробирочные растения в открытых пробирках выдерживали в условиях светозала при  $t +24^{\circ}C$  на стеллажах без освещения в течение 24, 48 и 72 часов.

Результаты опыта приведены в таблице 9.

**Таблица 9 – Приживаемость пробирочных растений винограда в нестерильных условиях в зависимости от режима закаливания**

Время выдержки пробирочных растений винограда в открытых	Приживаемость, %
--	------------------

пробирках, час	
24	76,8
48	78,5
72	80,0

Как видно из данных, приведенных в таблице 9, оптимальное время выдержки пробирочных растений винограда в открытых пробирках составляет 72 часа. При этом приживаемость растений в нестерильных условиях была в пределах 80 %.

**Подбор питательных субстратов и системы подкормок для поддержания пробирочных растений на этапе *in vivo* и культивирования.**

Для культивирования пробирочных растений в нестерильных условиях большое значение имеет состав почвенного субстрата. В опытах испытывались 2 варианта субстрата:

лесная земля + торф + песок (1:1:1);

лесная земля + п/с «Дубрава» + песок в соотношении 2:1:1 (таблица 10).

**Таблица 10 – Приживаемость пробирочных растений в нестерильных условиях**

Почвенный субстрат	Приживаемость, %
Лесная земля + торф + песок	52,5
Лесная земля + п/с «Дубрава» + песок	64,9

Как видно из данных, приведенных в таблице 10, в варианте с питательным субстратом «Дубрава» приживаемость была выше и составила 64,9 %.

Однако следует отметить, что в целом приживаемость была невысокой в обоих вариантах вследствие того, что у пробирочных растений очень слабая адаптация и они подвержены поражению почвенной микрофлорой. Поэтому перед высадкой почвенный субстрат подвергался предварительной стерилизации.

В опыте испытывалось два варианта стерилизации:

1. Обработка водяным паром в течение 2-х часов.
2. Обработка горячим сухим воздухом в течение 2-х часов.

После термической обработки субстрат выдерживался в течение суток, а затем на него высаживали пробирочные растения.

Результаты опыта приведены в таблице 11.

**Таблица 11 – Приживаемость пробирочных растений винограда на почвенном субстрате в зависимости от способа термической обработки**

Способ термической обработки почвенной смеси	Приживаемость растений, %
Водяной пар – 2 часа	76,9
Сухой горячий воздух – 2 часа	80,0

Как видно из данных, приведенных в таблице 11, приживаемость растений на термически обработанном почвенном субстрате в обоих вариантах была значительно выше, чем в опытах с нестерильным субстратом и составила 76,9–80,0 %.

Важную роль при переводе пробирочных растений в нестерильные условия играет также правильно подобранная система подкормок. В своих опытах применены 2 варианта:

- I. Микро-макро→Кристаллон,
- II. Микро-макро→Гумми.

В первом варианте пробирочные растения высаживали в стаканчики с субстратом, увлажненным разбавленным раствором (1:4) микро-макросолей, приготовленным по прописи Мурасиге и Скуга. В течение последующих дней до полной приживаемости растений по мере необходимости почва в стаканчиках увлажнялась указанным раствором.

Затем после того, как растения приживались в новых условиях и начинали нормально вегетировать, их переводили на корневую подкормку минеральными удобрениями «Кристаллон» в концентрации 50 мг/л H<sub>2</sub>O с

периодичностью 2 раза в месяц.

Во втором варианте пробирочные растения после высадки в стаканчики подкармливали раствором микро-макросолей по прописи Мурасиге и Скуга, разбавленным водой 1:4 в течение 10 дней, а затем проводили подкормки препаратом «Гумми», в который входит гумат натрия и основные элементы P, N (таблица 12).

**Таблица 12 – Прирост у растений винограда в нестерильных условиях в зависимости от используемых минеральных подкормок**

Минеральная подкормка	Период времени – 10 дней	Период времени – 20 дней
	Прирост, см	
I. Кристаллон	2,0	3,4
II. Гумми	2,3	3,8

## ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований установлено следующее.

1. Оздоровление сортообразцов винограда с использованием методов биотехнологии выявило специфичность их поведения в условиях *in vitro* и послужило основанием для внесения изменений в общепринятую методику микрклонального размножения.

2. На этапе ввода в культуру *in vitro* для большинства вводимых сортообразцов винограда оптимальной является среда ГМ с содержанием макроэлементов мг/л:  $\text{NH}_4 \text{NO}_3$  – 1237;  $\text{KNO}_3$  – 1425;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 277,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 277,5.

3. На этапе микроразмножения для роста и развития регенерантов оздоравливаемых сортообразцов винограда целесообразно использовать питательную среду Мурасиге и Скуга со стандартным набором макро-микроэлементов и витаминов и содержанием ростового вещества б-Бензиламинопурина в концентрации – 0,4 мг/л.

4. На этапе укоренения пробирочных растений в условиях *in vitro* в качестве индуктора ризогенеза у регенерантов оздоравливаемых

сортообразцов винограда в питательную среду следует добавлять ауксины:  $\alpha$ -нафтилуксусную кислоту или  $\beta$ -индолилуксусную кислоту в концентрации – 0,2 мг/л.

5. При переводе пробирочных растений в нестерильные условия необходимо проводить их предварительное закаливание: выдерживание пробирочных растений в открытых пробирках в условиях светозала при  $t +24^{\circ} \text{C}$  в течение 2-х часов, что повышает их приживаемость до 80 %.

6. Оптимальный состав почвенного субстрата для высадки укорененных пробирочных растений в нестерильные условия – смесь лесная земля + питательный субстрат «Дубрава» + песок в соотношении 2:1:1.

7. Для повышения процента приживаемости пробирочных растений в нестерильных условиях необходимо проводить предварительную термическую обработку почвенного субстрата сухим горячим воздухом в течение 2-х часов, что повышает приживаемость растений до 80 %.

8. Для лучшей приживаемости пробирочных растений целесообразно в первые 10 дней подкармливать их разбавленным раствором макро-микроэлементов, приготовленных по прописи Мурасиге и Скуга (разведение 1:4), а затем препаратом «Гумми» в течение всего периода адаптации.

## ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. На этапе микроразмножения рекомендуется использовать питательную среду Мурасиге и Скуга с концентрацией ростового вещества 6-Бензиламинопурина – ,4 мг/л.

2. На этапе укоренения пробирочных растений в условиях *in vitro* в качестве индуктора ризогенеза необходимо использовать ауксины



$\beta$ -индолилуксусную кислоту и  $\alpha$ -нафтилуксусную кислоту в концентрации – 0,2 мг/л.

3. При переводе пробирочных растений в нестерильные условия рекомендуется их предварительное закаливание в открытых пробирках в течение 72-х часов в условиях светозала при  $t +24^{\circ} \text{C}$ , но без прямого освещения.

4. Лучший субстрат для высадки пробирочных растений в нестерильные условия – это лесная земля + п/субстрат «Дубрава» + песок (2:1:1).

5. Эффективная схема минеральных подкормок – разбавленный раствор солей Мурасиге и Скуга (1:4) + препарат «Гумми» в течение 10 дней.

#### Список литературы

1. Батукаев А.А. Адаптация растений винограда в условиях *in vitro* // Виноград и вино России. Спец. вып. – 2000. – С. 32–33.
2. Батукаев А.А. Использование биотехнологических методов при ускоренном размножении винограда (*in vitro*) // Формы и методы повышения экон. эффективности регион. садоводства и виноградарства. Орг. исслед. и их координация. – Краснодар, 2001. – Ч. 2. – С. 115–118.
3. Батукаев А.А., Смирнов К.В. Биотехнологические методы ускоренного размножения винограда (*in vitro*) // С.-х. биотехнология. – М., 2001. – Т.2. – С. 142–150.
4. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 270 с.
5. Дорошенко Н.П. Актуальность биотехнологии в развитии виноградарства XXI века // Состояние и перспективы развития агрономической науки. – 2007. – Т. 2. – С. 98–100.
6. Дорошенко Н.П. Биотехнологические методы в системе производства сертифицированного посадочного материала винограда // Проблемы интенсификации и экологизации земледелия России / Дон. зон. науч.-исслед. ин-т сел. хоз-ва, 2006. – С. 365–369.
7. Дорошенко Н.П. Новые биотехнологии получения предбазового посадочного материала // Новые технологии производства и переработки винограда для интенсификации отечественной виноградо-винодельческой отрасли / Всерос. науч.-исслед. ин-т виноградарства и виноделия, 2006. – С. 169–175.
8. Дорошенко, Н.П. Особенности культивирования *in vitro* некоторых технических сортов винограда / Н.П. Дорошенко, Н.О. Арестова Н.О., А.А. Соболев // Виноделие и виноградарство. – 2004. – № 4. – С. 34–36.
9. Дорошенко, Н.П. Биотехнология для обеспечения устойчивого ведения

- виноградарства / Н.П. Дорошенко, Н.В. Берникова, И.О. Арестова, Г.В. Соколова // Проблемы устойчивого ведения виноградарства. – Новочеркасск, 2004. – С. 126–134.
10. Зленко, В.А. Методы *in vitro* для размножения оздоровленного посадочного материала винограда / В.А. Зленко, И.В. Котиков, Л.П. Трошин // Виноделие и виноградарство. – 2003. – № 3. – С. 38–39.
  11. Зленко, В.А. Размножение оздоровленного посадочного материала винограда / В.А. Зленко, И.В. Котиков, Л.П. Трошин // Садоводство и виноградарство. – 2005. – № 1. – С. 21-23.
  12. Зленко, В.А. Размножение винограда методами *in vitro*. Часть 1. Культивирование верхушек побегов и пролиферация аксиллярных почек винограда *in vitro* / В.А. Зленко, И.В. Котиков, Л.П. Трошин // Виноград и вино России. – 1998. – № 2. – С. 22–25.
  13. Зленко, В.А. Размножение винограда методами *in vitro*. Часть 2. Развитие растений *in vitro* и их адаптация к условиям *in vivo* / В.А. Зленко, И.В. Котиков, Л.П. Трошин // Виноград и вино России. – 1998. – № 5. – С. 26-30.
  14. Зленко В.А., Трошин Л.П., Левенко Б.А. Методические указания по регенерации растений винограда *in vitro* в жидкой среде / В.А. Зленко, Л.П. Трошин, Б.А. Левенко / ВАСХНИЛ. ВНИИВиПП "Магарач". – М., 1990. – 40 с.
  15. Методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда / П.Я. Голодрига, В.А. Зленко, Л.А. Чекмарев, Р.Г. Бутенко, Б.А. Левенко, Н.М. Пилин. - Ялта: Магарач, 1986. – 56 с.
  16. Трошин Л.П., Смурьгин А.С. Проблемы производства оздоровленного посадочного материала винограда // Материалы научно-практической конференции «Формы и методы научного и организационно-экономического обеспечения отраслей в условиях рыночных отношений». – Краснодар, 2001. – С. 163-166.
  17. *Slenko W.A., Troschin L.P., Kotikow I.V. Der Einfluss der Nährmedienzusammensetzung bei der in vitro-Vermehrung verschiedener Rebgenotypen // Mitteilungen Klosterneuburg. Rebe und Wein, Obstbau und Fruchteverwertung. – 2001. – 51 (1). – S. 15-26.*