

УДК 634.8:581.177

UDC 634.8:581.177

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО
МИКРОКЛОНАЛЬНОМУ РАЗМНОЖЕНИЮ
ВИНОГРАДА *IN VITRO***

**METHODICAL RECOMMENDATION ON
MICROCLONAL PROPAGATION OF *IN VITRO*
GRAPE VARIETY**

Медведева Нина Ивановна
к. с.-х. н., ст. научный сотрудник

Medvedeva Nina Ivanovna
Cand. Agr. Sci., senior researcher

Поливарова Надежда Васильевна
мл. научный сотрудник
*Крымская опытно-селекционная станция
СКЗНИИСuB, Крымск, Россия*

Polivara Nadezhda Vasil'evna
junior research worker
*Krymsk experimental selection station of SCRIHG
Krymsk, Russia*

Трошин Леонид Петрович
д. б. н., профессор
*Кубанский государственный аграрный
университет, Краснодар, Россия*

Troshin Leonid Petrovich
Dr. Sci. Biol., professor
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

В рекомендациях освещены особенности
микроклонального размножения винограда на всех
этапах их реализации

This article features the recommendations on
microclonal grapes reproduction at all stages of their
realization

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

Keywords: VARIETY, CLONE, APEX, EXPLANT,
REGERANT, NUTRITIVE MEDIUM,
PHYTOHORMONES, NUTRITIVE SUBSRATES

ВВЕДЕНИЕ

В современных условиях в России наблюдается возрождение одной из важнейших и древнейшей ветви садоводства – культуры винограда. Наиболее активное увеличение площадей под этой культурой отмечено в регионе Северного Кавказа: Дагестане, Краснодарском и Ставропольском краях. Однако, для восстановления и дальнейшего развития отрасли виноградарства необходим сертифицированный посадочный материал, который обеспечит продление эксплуатации виноградников и повышение их продуктивности на 30-40 процентов.

Основой такой технологии является базисный посадочный материал, свободный от вредителей и болезней [4, 11].

Производство такого посадочного материала возможно только в научных учреждениях или специализированных лабораториях, оснащенных соответствующим оборудованием, с использованием

новейших методов биотехнологии. Одним из них является метод культуры апикальных меристем с последующим микрклональным размножением.

Преимуществами клонального микроразмножения растений в сравнении с традиционными методами являются:

- значительно более высокий коэффициент размножения, расчетно достигающий 10^5 - 10^6 мериклонов в год, при 5-50 рядовых растений от одного, обычно получаемых за этот же срок [1-3, 6, 12];

- миниатюризация процесса, приводящая к экономии площадей, занятых маточными и размножаемыми растениями;

- оздоровление посадочного материала от болезней и вредителей.

Кроме того, метод культуры апексов *in vitro* позволяет с учетом генотипической специфичности подбирать оптимальный состав искусственных питательных сред для размножения различных видов и сортов винограда.

На основе вышеизложенного сделан следующий вывод: способ микрклонального размножения является наиболее приемлемым для получения достаточного количества сертифицированного посадочного материала винограда в короткие сроки [1].

При этом процедуры, используемые для размножения растений в условиях *in vitro*, включают следующие этапы:

- 1) вычленение экспланта в стерильных условиях и посадка его на искусственную питательную среду;
- 2) культивирование экспланта в климатической комнате с контролируемыми температурным и световым режимами;
- 3) размножение *in vitro*, состоящее из одного или нескольких пассажей;
- 4) укоренение *in vitro*;
- 5) перевод растений-регенерантов из *in vitro* в нестерильные условия (*in vivo*).

1. Оборудование и материалы

Для проведения работ по микроклональному размножению растений винограда необходимы специально оборудованные помещения.

1. Операционная комната. Это отдельное помещение, стены и пол которого отделаны легко моющимися материалами. В этом помещении обязательно должны быть ламинарные шкафы, бактерицидная ультрафиолетовая лампа, бинокулярные микроскопы, а также медицинский шкаф для хранения необходимых материалов (пинцеты, скальпели, чашки Петри, спиртовки), а также вспомогательные лабораторные столы.

2. Комната для приготовления питательных сред (средоварочная). Здесь необходимо следующее оборудование: стол лабораторный, автоклав, рН-метр, весы, лабораторная посуда (пробирки, химические стаканы, колбы, мерные цилиндры, пипетки и т.д.), вытяжка, шкафы лабораторные для хранения чистой посуды.

3. Комната для мытья посуды (моечная), оборудованная столами лабораторными, мойками, дистиллятором, сухожарочным шкафом для сушки посуды.

4. Комната для хранения химреактивов, оборудованная специальными шкафами.

5. Световая комната для культивирования эксплантов *in vitro* со специальным световым режимом, оборудованная светоустановками и сплитсистемой для поддержания необходимого микроклимата.

6. Адаптационная комната, необходимая для акклиматизации и перевода пробирочных растений в нестерильные условия. Эта комната также должна быть оборудована световыми установками и сплитсистемой.

7. Теплица, предназначенная для доращивания полученных *in vitro* растений до стандартных саженцев.

2. Подготовка исходного материала

Для успешного выполнения работ по микроклональному размножению необходимо соблюдать следующую технологическую цепочку, 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 воздухом → приготовление искусственных питательных сред → их стерилизация под давлением в автоклаве → размножение растительного материала в условиях *in vitro* → получение корнесобственных микрорастений *in vitro*.

2.1. Инициация культуры *in vitro*

Для введения в культуру *in vitro* отбирают здоровые растения с типичными сортовыми признаками. В качестве экспланта используют апикальные меристемы. Очень важное значение при этом имеет размер экспланта: чем меньше его величина, тем большая вероятность получения абсолютно здорового материала. Оптимальный размер экспланта для винограда 0,2-0,3 мм.

2.2. Жизнеспособность апексов винограда в зависимости от срока их вычленения

Известно, что успех регенерации апикальных меристем в условиях *in vitro* зависит от срока их вычленения [7-11].

Апексы винограда можно вводить в культуру *in vitro* в следующие сроки:

1-й срок – февраль-март. При этом заготовленные с осени черенки винограда предварительно выдерживают в течение суток в растворе β-индолилуксусной кислоты (200 мг на 1 л H₂O), а затем ставят для проращивания в сосуды с водой или влажными опилками и оставляют в

теплом помещения. Затем из проросших почек вычлениают меристемы и высаживают их на искусственную питательную среду *in vitro*;

2 –й срок – июнь – период активного роста;

3-й срок – август – период вторичного роста.

Однако регенерационная способность меристематических верхушек заметно колеблется от срока их вычленения и посадки в условия *in vitro* (табл. 1).

Таблица 1. – Выход пробирочных растений винограда в зависимости от срока посадки

Посадка экспланта <i>in vitro</i> (месяц)	Выход пробирочных растений, %
Февраль-март	96,7
Июнь	97,5
Август	49,2

Таким образом, оптимальными сроками ввода апикальных меристем в культуру *in vitro* являются февраль-март и июнь, где выход регенерантов составляет 97,5 и 96,7% соответственно.

Рекомендуется следующий порядок подготовки эксплантов.

1. Из отобранных растений или пророщенных черенков отчлениаются верхушки размером 1,0-1,5 см.
2. Для стерилизации верхушки помещаются в марлевые мешочки, этикетировываются и промываются в слабом растворе моющего препарата тест-гель. Затем проводится промывка дистиллированной водой до полного очищения от моющего средства.
3. Промытый растительный материал переносится пинцетом в стаканы с крышкой и проводится стерилизация его при постоянном встряхивании по схеме:

§ хлорсодержащий препарат «Белизна» в пропорции 1 : 2,5
H₂O – 4 минуты или

§ йодид ртути 0,1% раствор – 4,5 минуты с последующей

отмывкой стерильной дистиллированной водой 5 раз по 5 минут. При этом в последнюю порцию промывочной воды добавляется цифотаксима натриевая соль из расчета 5 мг на 300 мл H_2O , что снижает риск инфицирования эксплантов на 35-40%.

Экспланты вычлняются в асептических условиях в ламинарных боксах под бинокулярным микроскопом (МБС-1) при 7-кратном увеличении с помощью скальпеля и пинцета на стерильных бумажных матрасиках.

Культивирование эксплантов проводится в пробирках размером 40-32 мм в специальных светозалах на светоустановках при температуре + 24° С и 16-часовом освещении с интенсивностью 6 тыс. люкс.

На этапах ввода в культуру *in vitro* и при последующем микроразмножении проводятся наблюдения за развитием регенерантов с периодичностью 10 дней.

При этом учитываются:

- 1) гибель эксплантов – сразу после посадки, до того как они начали развиваться или же вследствие занесения на питательную среду грибковой или бактериальной инфекции;
- 2) фаза вытягивания точки роста – начинается рост оставшихся и вновь образующихся листовых примордиев;
- 3) коэффициент размножения – количество микрорастений, развившихся из одного экспланта;
- 4) при укоренении полученных микрорастений *in vitro* проводится измерение длины корней и подсчет числа корешков.

3. Питательные среды для культивирования эксплантов на различных этапах микроклонального размножения

По данным ряда исследователей, способность растений к размножению в условиях *in vitro* зависит от индивидуальных особенностей сорта [4, 7, 9]. Поэтому очень важно подобрать оптимальный состав питательной среды. Так, на первом этапе при вводе апикальных меристем растений винограда в культуру *in vitro* целесообразно использовать модификационную питательную среду Мурасиге и Скуга (M₁) с пониженным содержанием макроэлементов: NH₄NO₃ (1237 мг/л); KNO₃ (1425 мг/л); MgSO₄ · 7H₂O (277,5 мг/л). Оптимальная концентрация витаминов: мезо-инозит 100 мг/л, тиамин HCl – 10 мг/л, никотиновая кислота – 4 мг/л (табл. 2).

Уменьшенное содержание азота способствует лучшей приживаемости и развитию эксплантов, потому практически исключает явление витрификации.

Таблица 2. – Состав питательных сред, рекомендуемых для клонального микроразмножения винограда

№ п/п	Компоненты питательной среды	Концентрация, мг/л					
		M St	M ₁	M ₂	M ₃	H	H ₁
1	2	3	4	5	6	7	8
1 Макроэлементы:							
	NH ₄ NO ₃	1650,0	1237,0	1650,0	1650,0	306,0	306,0
	KNO ₃	1900,0	1425,0	1900,0	1900,0	922,0	922,0
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	370,0	277,5	370,0	370,0	597,0	597,0
	KH ₂ PO ₄	170,0	277,5	170,0	170,0	163,0	163,0
	CaCl ₂	331,0	440,0	440,0	440,0	440,0	440,0
2 Хелат железа:							
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8	27,8	27,8	27,8	13,9	6,95
	Na ₂ ЭДТА	37,3	37,3	37,3	37,3	18,6	9,33
3 Микроэлементы:							
	H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2	6,2	3,1	1,55
	MnSO ₄ · 5H ₂ O	24,1	22,3	22,3	22,3	11,5	5,75
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6	8,6	8,6	8,6	4,3	2,15
	KJ	0,83	0,83	0,83	0,83	0,415	0,21
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125	0,062

	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,0125	0,006
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,0125	0,006
4 Витамины:							
	мезо-инозит	75,0	100,0	100,0	100,0	20,0	20,0
	пароаминобензойная к-та	5,0	-	-	-	-	-
	тиамин HCl	5,0	10,0	-	5,5	0,1	0,1
	пиридоксин HCl	5,0	-	5,8	5,8	0,2	0,2
	никотиновая к-та	5,0	4	5,3	-	0,5	0,5
5 Аминокислоты:							
	глутамин	50,0	-	-	-	-	-
	глицин	10,0	10,0	-	-	2,0	2,0
6 Фитогормоны:							
	6-Бензиламинопуриновая кислота	0,5	1,0	2,0	0,4	-	-
	аденин сернокислый	80,0	-	-	-	-	-
	β-индолилуксусная кислота	-	-	-	-	0,2	0,2
	ферруловая к-та	-	-	-	-	1,0	1,0
7 Другие вещества							
	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (мг/л)	170	-	-	-	-	
	Na ₂ HPO ₄	-	170	170	170	-	
	сахароза (г/л)	30	30	30	30	10	
	агар-агар (г/л)	7,0	6,0	6,0	6,0	-	
	цефотаксима натриевая соль	-	10,0	10,0	10,0	-	

4. Микроразмножение *in vitro*

Следующий этап – клональное микроразмножение развившихся из меристем регенерантов. Основная задача этого этапа – получение нужного количества посадочного материала. В этом случае полученные регенеранты высаживаются на среду M₂ для размножения. Состав питательной среды при этом несколько изменяется.

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 его концентрация в среде увеличена в два раза (2 мг/л). На среде M₂ регенеранты

культивируют в течение 15-20 дней. При этом на эксплантах образуются многочисленные почки и побеги. Их извлекают из пробирок с помощью пинцета и скальпеля, разделяют на несколько частей размером 0,8-1 см и рассаживают на свежую питательную среду того же состава.

Число пассажей зависит от способности сорта к размножению в условиях *in vitro* и от нужного количества посадочного материала.

Затем полученные регенеранты пересаживают для вытягивания побегов на новую питательную среду М₃, содержащую пониженное количество фитогормонов (0,4 мг/л).

5. Укоренение *in vitro*

Следующий и очень важный этап микроклонального размножения – укоренение полученных микрорастений в условиях *in vitro*.

После размножения достаточного количества побегов их отчленяют от агрегатов и высаживают для укоренения на питательную среду Н.

Эта среда жидкая и регенеранты высаживают на бумажные мостики. Состав среды обедненный. В ней содержится половинное количество макро- и микроэлементов, концентрация сахарозы – 10 г/л, и полный набор витаминов. Кроме того, вместо цитокинина 6-бензиламинопурина в среду для стимуляции ризогенеза добавляются ауксины: β-индолилуксусная кислота или α-нафтилуксусная кислота в концентрации 0,2 мг/л. Для лучшего укоренения целесообразно брать побеги высотой 2,5-3 см с двумя–тремя хорошо развитыми листочками.

6. Перевод пробирочных растений в нестерильные условия

Важным этапом в оздоровлении сортообразцов винограда с использованием методов биотехнологии является перевод полученных пробирочных растений в нестерильные условия [5].

Для обеспечения нормальной приживаемости в условиях *in vivo*

необходимо проведение предварительного закаливания пробирочных растений. Оптимальный вариант закаливания – выдерживание открытых пробирок с растениями в условиях светозала на стеллажах без освещения в течение 72 ч при температуре + 24° С. Затем пробирки переносят в адаптационную комнату, растения высаживаются в стаканчики с почвенным субстратом и закрываются полиэтиленовыми пакетами, которые не снимаются до тех пор, пока растение приживается и на нем вырастут новые листочки.

Для культивирования пробирочных растений в условиях *in vivo* большое значение имеет состав почвенного субстрата.

Лучшие результаты достигаются при использовании почвенного субстрата, состоящего из смеси лесной земли, п/с «Дубрава» и песка (2 : 1 : 1). Установлено, что термическая обработка почвосмеси путем пропаривания повышает приживаемость пробирочных растений. Субстрат увлажняют раствором минеральных элементов по прописи Мурасиге и Скуга в разведении 1 : 4.

Пластиковые стаканы с высаженными растениями винограда устанавливаются в полиэтиленовые пакеты. На период адаптации растений (2-3 недели), для создания высокой относительной влажности воздуха, верхнюю часть пакета закрывают с помощью фиксации скрепкой.

Адаптацию можно разделить на два этапа. На первом этапе следует ежедневно проводить подкормку растений раствором минеральных элементов Мурасиге и Скуга; поддерживать высокую относительную влажность у растений (наличие полиэтиленового пакета). Продолжительность первого этапа адаптации – 2 недели. На этот период образуются корневые волоски и вырастает новый лист.

На втором этапе создают более жесткие условия. Для адаптации растений к пониженной влажности на ночь пакеты открываются. Пребывание растений в открытых пакетах постепенно увеличивается.

Через 10 дней стаканы освобождают от пакетов. За период вегетации растение образует лист, по своим размерам больше остальных пробирочных листочков. В дальнейшем растения интенсивно растут, у них в течение месяца вырастают побеги длиной 15-20 см. Затем растения пересаживают в пакеты с почвосмесью.

Последующий уход за вегетирующими растениями винограда заключается в периодических поливах по мере подсыхания поверхности почвы, подкормках минеральными питательными растворами и предотвращении инфекций.

Осенью после опадения листьев саженцы из пакетов высаживаются на постоянное место вместе с содержащимся в пакете субстратом. При этом пакет удаляется без нарушения корневой системы.

Вывод

Использование положений изложенных рекомендаций позволяет получать базисный виноградный посадочный материал, что способствует созданию здоровых чистосортных промышленных насаждений.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Абраменко Н.М. О новом методе обеззараживания растений, пораженных вирусами // Тр. Молд. НИИ садоводства, виноградарства и виноделия. – Кишинев, 1961. – С. 49.
2. Батукаев А.А. Адаптация растений винограда в условиях *in vitro* // Материалы междунар. науч.-практ. конф. «Садоводство и виноградарство 21 века» (7-10 сент. 1999 г., Краснодар). – Краснодар, 1999. – Ч. 4: Виноградарство. – С. 84-86.
3. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М., 1964. – 287 с.

4. Дорошенко Н.П. Производство базисного посадочного материала // Виноград и вино России. - 2001. - № 2. - С. 23-25.
5. Дорошенко Н.П. Адаптация оздоровленных пробирочных растений винограда к нестерильным условиям / Н.П. Дорошенко, Л.Н. Семенова // Перспективы внедрения современ. биотехнолог. разработ. для повышения эффективности с.-х. пр-ва. – Ставрополь, 2000. – С. 29.
6. Дорошенко Н.П. Оптимизация процесса пролиферации винограда в культуре *in vitro* // Виноделие и виноградарство. – 2004. - № 5. - С. 29.
7. Дорошенко, Н.П. Особенности культивирования *in vitro* некоторых технических сортов винограда / Н.П. Дорошенко, Н.О. Арестова, А.А. Соболев // Виноделие и виноградарство. – 2004. - № 4. – С. 34-36.
8. Зленко, В.А. Размножение винограда методом *in vitro*. Ч. 1: Культивирование верхушек побегов и пролиферация аксиллярных почек винограда *in vitro* / В.А. Зленко, Л.П. Трошин, И.В. Котиков // Виноград и вино России. - 1998. - № 2. - С. 22-25.
9. Зленко, В.А. Размножение винограда методами *in vitro*. Ч. 2: Развитие растений *in vitro* и их адаптация к условиям *in vivo* / В.А. Зленко, Л.П. Трошин, И.В. Котиков // Виноград и вино России. – 1998. - № 5. – С. 26-28.
10. Зленко, В.А. Размножение оздоровленного посадочного материала винограда в культуре *in vitro* / В.А. Зленко, Л.П. Трошин, И.В. Котиков // Садоводство и виноградарство. – 2005. - № 1. - С. 21-23.
11. Медведева, Н.И. Особенности микрклонального размножения интродуцентов и клонов винограда / Н.И. Медведева, Н.В. Поливар, Л.П. Трошин // Науч. журн. КубГАУ [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ, 2008. – № 06 (40). – Шифр

Информрегистра: 0420800012\0079. – Режим доступа:
<http://ej.kubagro.ru/2008/06/pdf/18.pdf>.

12. Методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда / П.Я. Голодрига, В.А. Зленко, Л.А. Чекмарёв и др. – Ялта: Магарац, 1986. - 56 с.

03.10.2010