

УДК 634.8.037:581.143.6

UDC 634.8.037:581.143.6

06.00.00 Сельскохозяйственные науки

Agriculture

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ IN VITRO НОВЫХ ПЕРСПЕКТИВНЫХ СТОЛОВЫХ СОРТОВ ВИНОГРАДА

INTRODUCTION OF NEW PERSPECTIVE TABLE GRADES OF GRAPES TO IN VITRO CULTURE

Ребров Антон Николаевич
канд. биол. наук

Rebrov Anton Nikolaevich
Cand.Biol.Sci.

Всероссийский научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия имени Я.И. Потанина, Новочеркасск, Россия

All-Russian Research Institute of Viticulture and Winemaking named after J.I. Potapenko, Novochoerkassk, Russia

Дорошенко Наталья Петровна
д.с.-х.н., профессор

Doroshenko Natalya Petrovna
Dr.Sci.Biol., professor

Всероссийский научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия имени Я.И. Потанина, Новочеркасск, Россия

All-Russian Research Institute of Viticulture and Winemaking named after J.I. Potapenko, Novochoerkassk, Russia

Трошин Леонид Петрович
д.б.н., профессор

Troshin Leonid Petrovich
Dr.Sci.Biol., professor

Алзубайди Хайдар Клиль Ибрахим
Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар, Россия

Alzubaydi Haidar Klil Ibrahim
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

В статье представлена информация об особенностях микроклонирования в культуре in vitro 10-ти перспективных для Евразии столовых розово- и белоягодных сортов-генетов винограда селекции И.А. Кострикина, В.Н. Крайнова, В.В. Загорулко. Исследования проводили на этапе ввода в культуру in vitro меристем размером 0,1-0,2 мм. У большинства сортов и форм отмечали хорошие регенерационные способности в условиях стерильной культуры. Это связано с тем, что почти все исследуемые сорта Анюта, Богатыновский, Княгиня Ольга, Преображение, Юбилей Новочеркаска, Фавор, получены от скрещивания пары Талисман × Кишмиш лучистый. И лишь только сорта Ливия и Низина, которые показали более низкие регенерационные свойства на этапах пролиферации и укоренения побегов получены от скрещивания пары Фламинго × Аркадия и (Талисман × Томайский) соответственно. При этом сорт Талисман, являющийся одним из родителей большинства исследуемых сортов, показал стабильные результаты на всех этапах культивирования

In this article we present information on features of microcloning in culture of in vitro of perspective for Eurasia, pink and white-berry table genetic grades of grapes by I. A. Kostrikin, V. N. Kraynov and V. V. Zagorulko. Researches were conducted at an input stage in culture of in vitro of meristems of 0,1-0,2 mm in size. At the majority of grades and forms, we noted good regeneration abilities in the conditions of sterile culture. It is bound to the fact that almost all the studied grades: Anyuta, Bogatyanovsky, the Princess Olga, Preobrazhenie, Anniversary of Novochoerkassk, Favor are received from crossing of couple the Mascot × Sultana-ray grape. And only grades called Libya and Lowland which showed lower regeneration properties at stages of proliferation and rooting of shoots are received from crossing the couple of Flamingo × Arkadya and (Talisman x Tomaysky) respectively. At the same time, the grade of Talisman, being one of the parents of the majority of the studied grades, showed stable results at all stages of cultivation

Ключевые слова: ВИНОГРАД, IN VITRO, МЕРИСТЕМА, МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ, ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СТОЛОВЫЕ СОРТА И ФОРМЫ

Keywords: GRAPES, IN VITRO, MERISTEM, MICROMANIFOLDING, PERSPECTIVE TABLE GRADES AND FORMS

Doi: 10.21515/1990-4665-124-008

Введение

Метод размножения растений с использованием техники изолированных тканей и органов привлекает внимание физиологов,

вирусологов, селекционеров, а также практиков и, в первую очередь, питомниководов. Сейчас ни у кого не осталось сомнения, что именно этот способ (обозначаемый как клональное микроразмножение или просто микроразмножение) на сегодняшний день позволяет полнее всего реализовать потенциал растительного организма к размножению. Это направление в культуре тканей быстро развивается и является чрезвычайно перспективным. По сравнению с традиционными методами размножения, используемыми в сельскохозяйственной практике, клональное микроразмножение в культуре *in vitro* обладает рядом преимуществ:

1. Коэффициент размножения в этом случае гораздо выше, чем при обычных методах размножения.

2. Можно быстро размножить ценный клон растения.

3. Одновременно с размножением часто происходит оздоровление растений от вирусов, патогенных микроорганизмов и нематод.

4. Возможно работать в лабораторных условиях круглый год и планировать выпуск растений к определенному сроку.

5. Метод размножения очень экономичен. На первоначальном этапе тысячи растений могут расти на относительно небольшой лабораторной площади.

6. Этим методом можно размножать растения, которые с трудом или совсем не размножаются вегетативно.

7. Можно длительно хранить пробирочные растения при пониженной температуре, что позволяет создать «банк» ценных сортов клонов и форм растений.

Основное преимущество клонального микроразмножения – это получение генетически однородного, **безвирусного посадочного материала**, так как вирусные и микоплазменные заболевания в силу хронического характера наносят виноградарству постоянный экономический ущерб [1].

Согласно установившемуся агрономическому утверждению, самым эффективным фактором подъема рентабельности любой сельскохозяйственной культуры является сортообновление посевов или посадок, в том числе и «виноградных садов». Поэтому при возделывании многолетней культуры винограда этому фактору придается особо важное значение [2].

Методы исследований

Исследования проводили на этапе ввода в культуру *in vitro*, меристем размером 0,1-0,2 мм 9-ти перспективных новых столовых сортов и форм: Анюта, Богатыновский, Гурман Крайнова, Княгиня Ольга, Ливия, Низина, Преображение, Талисман (контроль), Фавор, Юбилей Новочеркаска. Ввод производили на твердых питательных средах MS в модификации П.Я. Голодриги [3] с добавлением 6-БАП – 0,5 мг/л, при температуре воздуха, 24-27 °С, освещенности 2500-3000 люкс и относительной влажности воздуха $\geq 70\%$. Предметом исследований была сортоспецифичность морфогенеза в условиях культуры *in vitro*. Меристемы вычленили из верхушек молодых побегов под бинокулярным микроскопом МБС-10. Стерилизацию эксплантов проводили 70% этиловым спиртом 0,5 мин и азотнокислым серебром (0,8%), с экспозицией 7 минут, с последующей тщательной промывкой стерильной водой. На каждый сорт высаживали по 40 меристем. Изучали параметры роста и развития меристем во время ввода в культуру *in vitro*, образовавшихся из них конгломератов во время пролиферации, и укоренение сформировавшихся побегов. Доверительные интервалы по приживаемости меристем и укоренению побегов рассчитаны методом Уилсона в изложении А.М. Гржабовского [4].

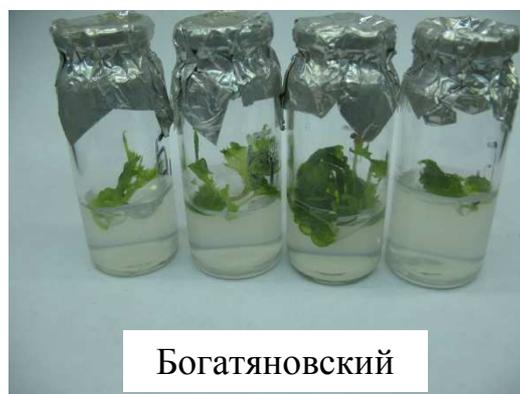
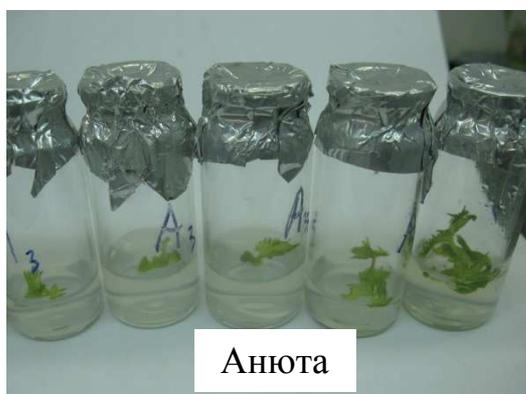
Результаты исследований

Ввод в культуру *in vitro* ответственный и сложный этап, который требует знаний, опыта и навыков, т.к. трудно добиться регенерации меристем размером 0,1-0,2 мм, что способствует получению оздоровленного посадочного материала. Кроме того, на процессы регенерации микрорастений из меристем, в культуре *in vitro*, заметное влияние оказывает и сортовая специфика. Данный аспект проявляется *in vitro* не только на винограде, но и на всех плодово-ягодных культурах. Как видно из представленных данных в таблице 1, регенерация меристем большинства сортов проходила нормально. Наиболее хорошо меристемы развивались у сортов (в %, крупных; средних; мелких): Анюта (47,0; 36,5; 16,5), Гурман (43,3; 44,7; 15,0), Княгиня Ольга (60,7; 14,5; 10,7), Талисман (61,0; 1,5; 25,0), Преображение (50,0; 6,3; 18,8), средние показатели регенерации меристем отмечали у сортов Юбилей Новочеркаска (23,5; 37,0; 39,5), Ливия (28,0; 36,0; 12,0), Фавор (22,8; 26,5; 27,3), Богатыновский (23,0; 19,3; 25,5), самые низкие показатели развития меристем были у сорта Низина (10,5; 27,4; 45,0).

Таблица 1. - Особенности ввода в культуру меристем различных сортов винограда.

Сорт	Приживаемость, %		Регенерация меристем размером, %			Причины отбраковки, %		
			≥ 1,5 см	0,5÷1,5 см	< 0,5 см	некроз	инфекция	отсутствие развития
Талисман	80,0	+9,5 -14,8	61,0	2,5	25,0	2,5	0,0	10,0
Княгиня Ольга	85,0	+7,9 -14,1	60,7	14,5	10,0	10,5	3,5	0,0
Преображение	75,0	+10,8 -15,2	50,0	6,3	18,8	18,8	0,0	6,3
Анюта	100,0	+0,0 -8,8	47,0	36,5	16,5	0,0	2,5	0
Гурман ранний	100,0	+0,0 -8,8	43,3	44,7	15,0	0,0	0,0	0,0
Ливия	75,0	+10,8 -15,2	28,0	35,0	12,0	20,0	0,0	0,0
Юбилей Новочеркаска	100,0	+0,0 -8,8	23,5	37,0	39,5	0,0	0,0	0,0
Богатыновский	67,5	+12,4 -15,5	23,0	19,3	25,2	16,3	8,2	7,7
Фавор	76,0	+9,7 -13,4	22,8	26,5	27,3	5,2	5,0	13,2
Низина	72,0	+10,5 -13,7	10,5	27,4	44,0	5,6	0,0	0,0

На рисунке 1 представлены фото меристем некоторых сортов на этапе ввода в культуру *in vitro*.



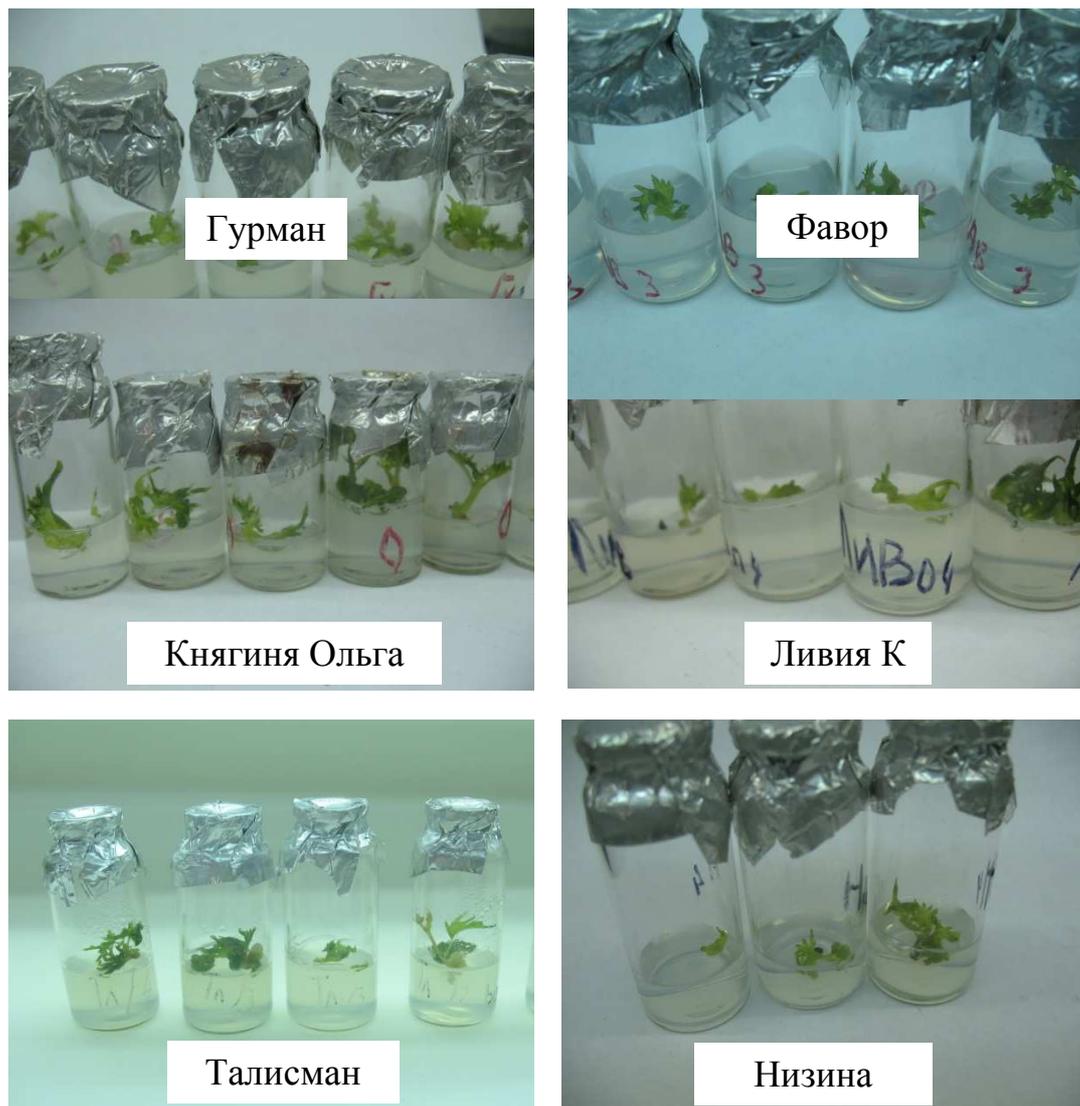


Рисунок 1. Особенности морфогенеза меристем у столовых сортов винограда в культуре *in vitro* через три недели после высадки.

После первого этапа ввода, примерно через 20-30 дней после высадки, хорошо развитые меристемы пересаживали в более крупные емкости (колбы) для прохождения этапа пролиферации. Так как основная задача данного этапа получение как можно большего числа хорошо развитых побегов для укоренения, изучаемые сорта сравнивали по побегообразующей способности (таблица 2).

Таблица 2. – Особенности пролиферации у разных сортов столового винограда в культуре *in vitro*.

Сорт	Высажено конгломератов / срезано побегов, шт.					Итого срезано побегов, шт.
	№ пассажа					
	1	2	3	4	5	
Княгиня Ольга	12/7	12/24	11/29	14/25	6/18	103
Гурман Крайнова	12/12	10/24	14/27	8/14	5/16	93
Преображение	11/7	10/14	10/21	7/16	6/14	72
Фавор	7/4	10/8	8/15	9/17	7/20	64
Анюта	12/7	14/18	10/16	10/14	4/6	61
Талисман	10/4	10/8	7/15	6/14	5/12	53
Юбилей Новочеркаска	9/4	5/7	7/14	6/13	4/10	48
Богатыновский	7/0	8/3	8/6	6/8	5/8	25
Низина	7/0	7/1	6/4	7/8	5/6	19
Ливия К	10/0	10/0	8/2	7/3	7/8	13

Наилучшей побегообразующей способностью обладали сорта: Княгиня Ольга, Гурман Крайнова, Преображение. У этих сортов было срезано по 72-96 шт. побегов. Средние результаты пролиферации отмечены у сортов Фавор, Анюта и Юбилей Новочеркаска по 53-64 шт. побегов. Наибольшее число срезанных побегов у этих сортов отмечали в третьем пассаже, после чего наблюдалось постепенное ухудшение

регенерации. Конгломераты после срезов, в четвертом и последующих пассажах, образовывали больше коротких и тонких, а также толстых, плотных побегов с мелкими листьями, которые в дальнейшем хуже окоренялись. По этому, а также в связи с тем, что, со временем увеличиваются трудозатраты по очистке конгломератов от образовавшегося на нижних частях каллуса и постаревших тканей, подверженных некрозу, для большинства сортов не проводили более 5-6 пассажей. Меньше всего побегов на этапе пролиферации было срезано у сортов Богатыновский, Низина, Ливия (25, 19 и 13 шт.). У сорта Ливия К в первых двух пассажах совсем не было сформированных побегов, хотя с первого этапа ввода в колбы было высажено достаточное количество хорошо развитых меристем. Всего за пять пассажей у сорта Ливия было срезано 10 побегов. Низкие показатели побегообразования наблюдали также у сортов Богатыновский и Низина, однако в целом у этих сортов данный этап проходил заметно лучше, чем у сорта Ливия, особенно с учетом того, что на этапе ввода меристем их развитие было более слабым. На рисунке 2 представлены фотографии конгломератов некоторых сортов на этапе пролиферации.

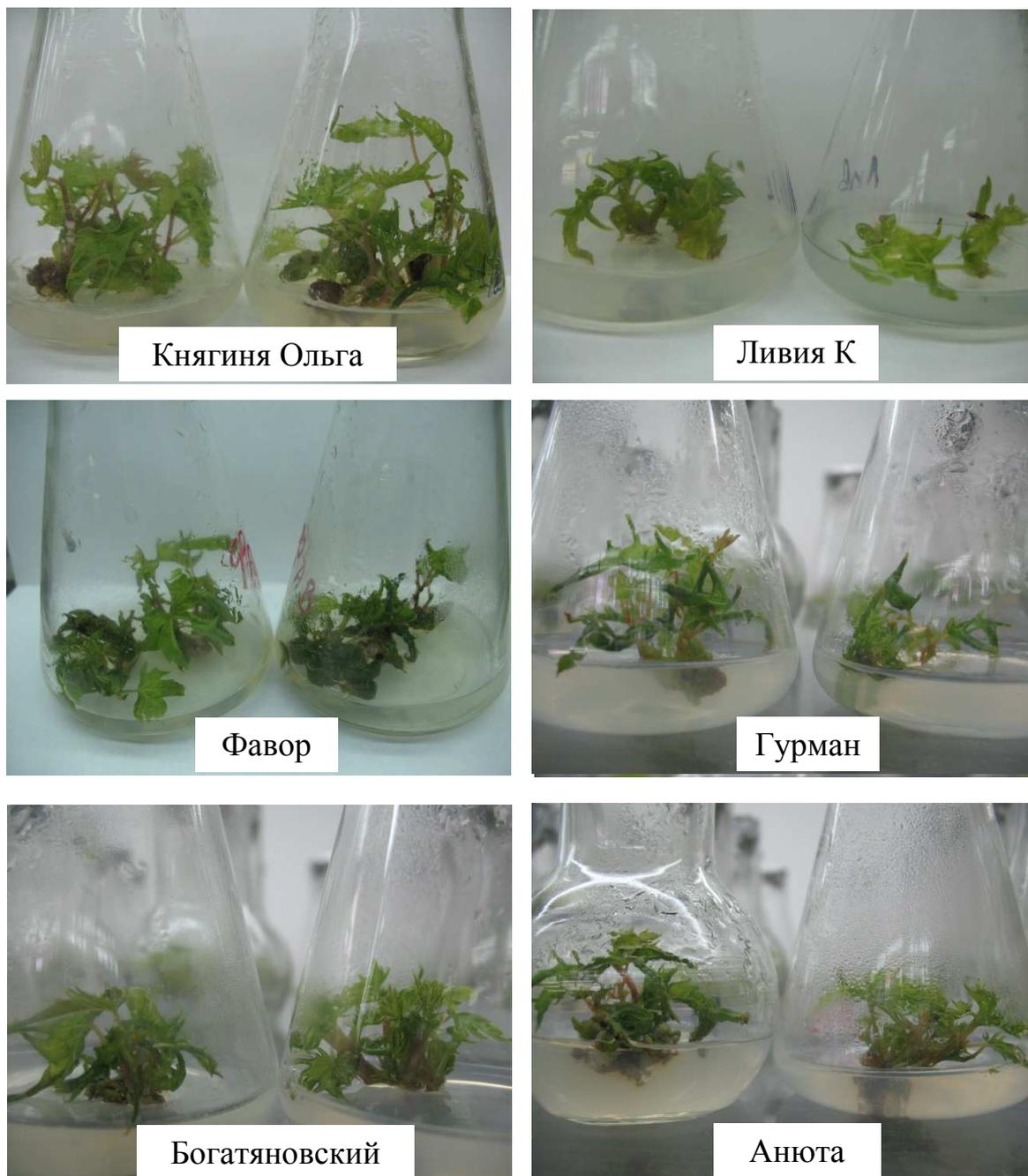


Рисунок 2. Особенности пролиферации побегов *in vitro* некоторых столовых сортов винограда

Срезанные на этапе пролиферации побеги высаживали на питательную среду для укоренения. На данном этапе также наблюдали заметные отличия в регенерации корней у разных сортов (таблица 3).

Таблица 3. – Особенности укоренения побегов у различных сортов винограда

Сорт	Срезано побегов /укоренившихся побегов, шт.					Итого укоренившихся побегов		
	№ пассажа					шт.	%	
	1	2	3	4	5			
Преображение	7/7	14/12	21/17	16/12	14/8	72/56	77,8	+8,1 -10,9
Талисман	4/4	8/7	15/12	14/10	12/8	53/41	77,4	+9,2 -12,9
Гурман Крайнова	12/10	24/19	27/22	14/9	16/12	93/72	77,4	+7,3 -9,5
Юбилей Новочеркаска	4/3	7/7	14/12	13/9	10/6	48/37	77,1	+9,6 -13,6
Княгиня Ольга	7/7	24/18	29/22	25/19	18/13	103/79	76,7	+7,1 -9,0
Фавор	4/3	8/6	15/12	17/12	20/15	64/47	75,0	+9,3 -11,9
Анюта	7/5	18/14	16/11	14/10	6/5	61/45	73,7	+9,4 -12,2
Низина	0/0	1/1	4/3	8/5	6/5	19/14	73,6	+14,5 -22,5
Богатыновский	0/0	3/3	6/5	8/6	8/5	25/19	73,4	+12,5 -19,4
Ливия К	0/0	0/0	2/1	3/2	8/5	13/8	61,5	+20,8 -26

Как видно из представленных данных, у сортов Преображение, Талисман, Гурман Крайнова, Юбилей Новочеркаска, Княгиня Ольга были хорошие показатели укоренения побегов. Укореняемость их составила в % 76,7-78,8. Немного хуже шла регенерация корней у сортов Фавор, Анюта, Низина, Богатыновский: 73,4 - 75,0%. Самые низкие показатели имели микропобеги, срезанные с конгломератов сорта Ливия – 61,5 %. Ниже на рисунке 3 представлены фото микропобегов различных сортов на этапе укоренения.

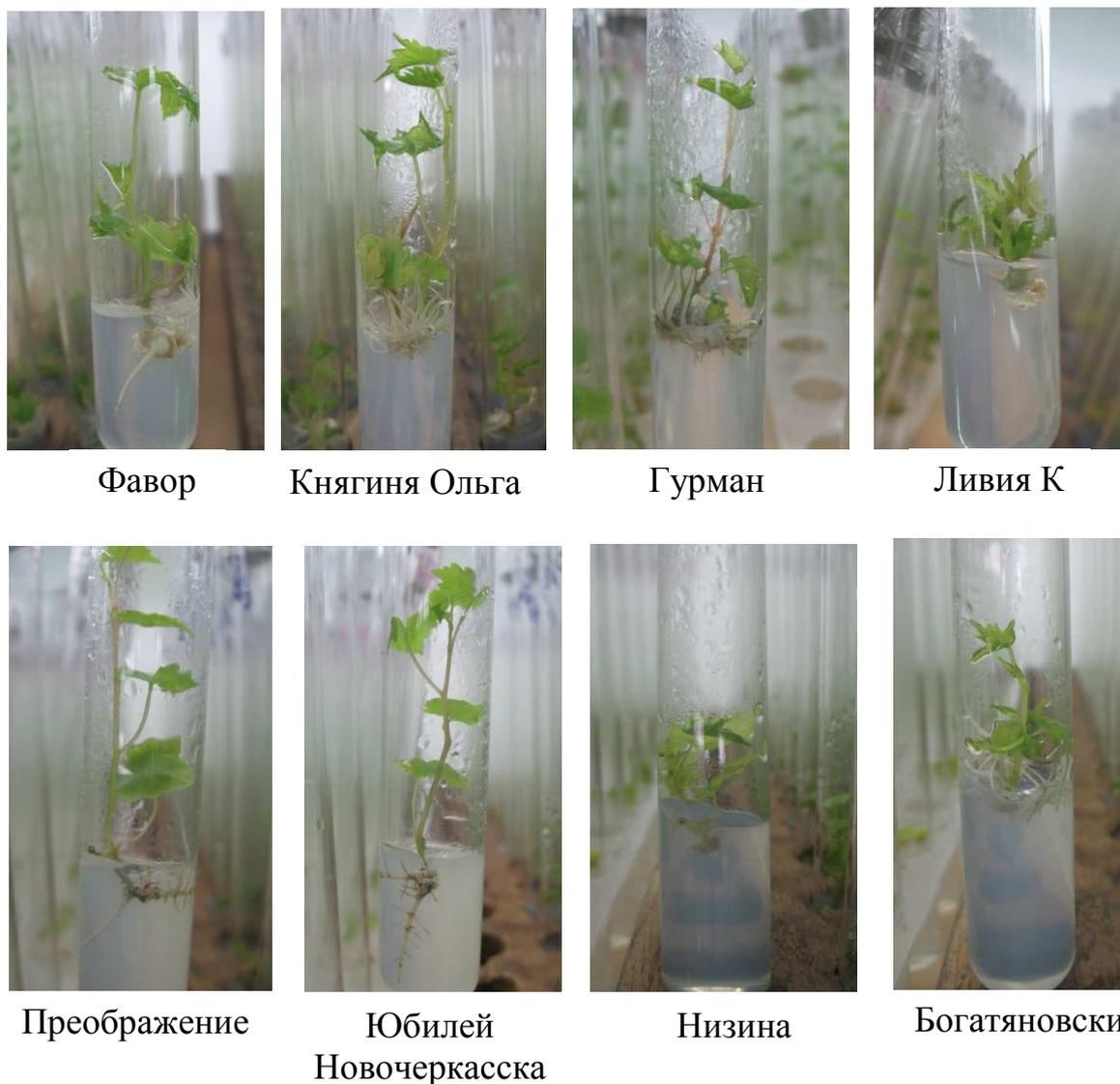


Рисунок 3. Особенности ризогенеза корней у побегов различных сортов столового винограда в культуре *in vitro*.

Анализируя полученные данные по культивированию *in vitro* новых перспективных сортов столового винограда можно сказать, что в целом большинство из них обладают высокой адаптационной способностью к условиям стерильной культуры. Предположительно это связано с тем, что почти все исследуемые сорта получены от скрещивания пары Талисман × Кишмиш лучистый (это Анюта, Богатыновский, Преображение, Юбилей Новочеркаска, Фавор, Княгиня Ольга). И лишь только сорта Ливия и Низина, которые показали более низкие регенерационные свойства на

этапах пролиферации и укоренения побегов, получены от скрещивания пары Фламинго × Аркадия и (Талисман х Томайский) соответственно. При этом сорт Талисман, являющийся одним из родителей большинства исследуемых сортов, как видно из представленных данных, показал стабильные результаты на всех этапах культивирования. Для успешного оздоровления и клонирования *in vitro* сортов Ливия и Низина необходим дальнейший подбор условий культивирования. Возможные пути улучшения их регенерации, как следует из опыта большинства исследователей, это гормональная регуляция, изменение концентраций б БАП, или замена его на другие цитокинины, изменение сроков ввода меристем, применение препаратов нового поколения и некоторые другие приемы. Как видно из работ многих исследователей [1, 5-7], эти приемы помогают успешно преодолевать сортовую специфику к условиям культивирования *in vitro*.

Выводы

В результате проведённых исследований, впервые для новых перспективных гибридных сортов и форм винограда, выявлены следующие особенности регенерации в культуре *in vitro*:

- большинство введенных в культуру *in vitro* сортов и форм винограда проявляли высокие и стабильные регенерационные свойства на всех основных этапах;
- наиболее стабильные результаты регенерации получены у сортов из комбинации скрещивания Талисман × Кишмиш лучистый;
- самые низкие регенерационные способности *in vitro* проявили сорта Ливия (Фламинго × Аркадия) и Низина (Талисман х Томайский), самым трудным этапом для них был этап пролиферации побегов.

Список использованной литературы

1. Дорошенко Н.П. Особенности клонального микроразмножения винограда / Дорошенко Н.П. / – Новочеркасск: Изд-во ФГБНУ ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко, 2014. — 204 с.
2. Трошин, Л.П. Модернизация столового сортимента для фермерского и приусадебного виноградарства: перспективные сорта. / Л.П. Трошин / Научный журнал КубГАУ, № 96(02), 2014 г. -- 46 с.
3. Голодрига, П.Я. Методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда / ВНИИВиПП «Магарач» (П.Я. Голодрига, В.А. Зленко, Л.А. Чекмарев), ИФР АН СССР (Р.Г. Бутенко), ИФР АН УССР (Б.А. Левенко), и др. - Ялта: Издательская группа ВНИИ ВиПП «Магарач», 1986 – 56 с.
4. Гржабовский, А.М. Доверительные интервалы для частот и долей / А.М. Гржабовский // Экология человека. – 2008. - №5. – С.57-60.
5. Тихомирова, Л.И. Оптимизация питательных сред на этапе собственно микроразмножения сортов I. Sibirica L. / Л.И. Тихомирова / Вестник Алтайского государственного университета. - № 6 (92), 2012. - С. 47-50.
6. Карпова, О.В. Возможность использования элиситоров при клональном микроразмножении ежевики / О.В. Карпова, В.А. Высокский // Плодоводство и ягодоводство России. - М., 1999. - Т. VI. – С. 84-92.
7. Упадышев, М.Т. Эффективность оздоровления ягодных культур от вирусов с использованием методов культуры тканей и термотерапии / М.Т. Упадышев // Актуальные проблемы размножения садовых культур и пути их решения: матер. межд. науч.-метод. дистанц. конф., 15-26 февраля 2010 г. – Мичуринск-наукоград, 2010. – С. 290–293.

References

1. Doroshenko N.P. Osobennosti klonal'nogo mikrorazmnozhenija vinograda / Doroshenko N.P. / – Novoчерkassk: Izd-vo FGBNU VNIIViV im. Ja.I. Potapenko, 2014. — 204 s.
2. Troshin, L.P. Modernizacija stolovogo sortimenta dlja fermerskogo i priusadebnogo vinogradarstva: perspektivnye sorta. / L.P. Troshin / Nauchnyj zhurnal KubGAU, № 96(02), 2014 g. -- 46 s.
3. Golodriga, P.Ja. Metodicheskie rekomendacii po klonal'nomu mikrorazmnozheniju vinograda / VNIIViPP «Magarach» (P.Ja. Golodriga, V.A. Zlenko, L.A. Chekmarev), IFR AN SSSR (R.G. Butenko), IFR AN USSR (B.A. Levenko), i dr. Jalta: Izdatel'skaja gruppа VNIИ ViPP «Magarach», 1986 – 56 s.
4. Grzhabovskij, A.M. Doveritel'nye intervaly dlja chastot i dolej / A.M. Grzhabovskij // Jekologija cheloveka. – 2008. - №5. – S.57-60.
5. Tihomirova, L.I. Optimizacija pitatel'nyh sred na jetape sobstvenno mikrorazmnozhenija sortov I. Sibirica L. / L.I. Tihomirova / Vestnik Altajskogo gosudarstvennogo universiteta. - № 6 (92), 2012. - S. 47-50.
6. Karpova, O.V. Vozmozhnost' ispol'zovanija jelisitorov pri klonal'nom mikrorazmnozhenii ezheviki / O.V. Karpova, V.A. Vysockij // Plodovodstvo i jagodovodstvo Rossii. - M., 1999. - T. VI. – S. 84-92.
7. Upadyshev, M.T. Jeffektivnost' ozdorovlenija jagodnyh kul'tur ot virusov s ispol'zovaniem metodov kul'tury tkanej i termoterapii / M.T. Upadyshev // Aktual'nye problemy razmnozhenija sadovyh kul'tur i puti ih reshenija: mater. mezhd. nauch.-metod. distanc. konf., 15-26 fevralja 2010 g. – Michurinsk-naukograd, 2010. – S. 290–293.