

СЕЛЕКЦИЯ, СОРТОИЗУЧЕНИЕ, АМПЕЛОГРАФИЯ

УДК 634.8.037: 581.143.6

ОСОБЕННОСТИ ВВОДА В КУЛЬТУРУ СОРТОВ ВИНОГРАДА НОВОЙ СЕЛЕКЦИИ

PARTICULARITY OF INTRODUCING OF NEW BREEDDED GRAPEVINES INTO CULTURE *IN VITRO*

Н.П. Дорошенко

N.P. Doroshenko

Всероссийский научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия им. Я.И. Потапенко – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный Ростовский аграрный научный центр», Новочеркасск, Россия, e-mail: n.doroschenko2013@yandex.ru

Ya.I. Potapenko All-Russian Research Institute for Viticulture and Winemaking – Branch of Federal State Budget Scientific Institution «Federal Rostov Agricultural Research Center», Novochechassk, Russia, e-mail: n.doroschenko2013@yandex.ru

Аннотация. В статье представлены результаты ввода в культуру сортов винограда Илья, Кармакод, Преображенье. Для разработки хемотерапии исследовали введение в состав питательной среды салициловой кислоты, антибиотика Цефотаксим и регулятора роста Мелафен. Отмечено замедленное развитие меристем в течение первых 43–55 дней культивирования. Изучаемые препараты незначительно стимулировали этот процесс. Установлено положительное влияние Мелафена. Выявлена различная реакция изучаемых сортов на условия культивирования *in vitro* как на этапе ввода, так и на последующем этапе собственно микроразмножения. Сорт Кармакод показал высокую адаптивную возможность к условиям *in vitro* и отсутствие реакции на применяемые препараты. Всего образовалось 363 побега. В вариантах с салициловой кислотой (0,77 мг/л) и Цефотаксимом (100 мг/л) наблюдалось угнетение регенерирующей способности. У сорта Илья на питательной среде с Мелафеном, срезка побегов увеличилась по сравнению с контролем в 2,6 раза. При повторном вводе в культуру сорта Преображение отмечено улучшение микроразмножения. Общее количество срезанных побегов составило 73 шт. Обнаружено преимущественное влияние

Summary. The paper presents the results of the introduction into the culture *in vitro* of grapevine varieties Ilya, Karmakod, Preobragenuue. To develop chemotherapy, the introduction of salicylic acid, the antibiotic Cefotaxim and the growth regulator Melafen was studied. The slow development of the meristem during the first 43–55 days of cultivation was observed. The studied drugs slightly stimulated this process. Melafen's positive influence was marked. Different reactions of the studied varieties to the conditions of cultivation *in vitro* both at the stage of introduction and at the subsequent stage of micro-propagation have been revealed. The Karmakode variety has shown a high adaptive capability to *in vitro* conditions and no response to the drugs used. 363 shoots were formed. In the variants with salicylic acid (0.77 mg/l) and Cefotaxim (100 mg/l), there was a suppression of regenerative ability. In the variety Ilya on the nutrient medium with Melafen, the cut of shoots increased compared to control by 2.6 times. When re-entering the culture of variety Preobragenie better micropropagation was marked. 73 shoots were cut. The predominant effect of apical meristems in comparison with chemotherapy has been revealed. Active development of the meristem was

апикальных меристем в сравнении с хемотерапией. Активное развитие меристем происходило при дополнительном культивировании их во вращающемся состоянии на аппарате роллерного типа.

Ключевые слова: апикальные меристемы, салициловая кислота, Цефотаксим, Мелафен, регенерация меристем, срезка побегов, реакция сортов.

Keywords: apical meristems, salicylic acid, Cefotaxim, Melafen, meristem regeneration, shoots cutting, variety reaction

DOI: 10.32904/2712-8245-2020-14-3-9

Введение. При помощи культуры апикальных меристем разработана технология получения корнесобственного посадочного материала высшей категории качества (класс А). Метод микроразмножения через апикальные меристемы многие годы используется для элиминации вирусов, которые могут присутствовать в тканях без каких-либо симптомов и передаваться при массовом тиражировании [1]. Технологии базируются на неравномерном распределении вирусов в молодых тканях апексов побегов, причем их концентрация значительно снижается в апикальной меристеме верхушки стебля, где клетки находятся в состоянии постоянного деления [2]. Поскольку только конус нарастания побега и первый листовый примордий обычно свободны от вирусов, размеры изолируемой меристемы имеют решающее значение [3]. Культивирование меристем в комбинации с хемотерапией дает положительные результаты, необходимые для массового размножения безвирусного материала [4].

Задача исследований – изучить особенности ввода в культуру и собственно микроразмножения сортов винограда: Преображение, Илья, Кармакод.

Материалы и методы. Исследования проводили по общепринятым в биотехнологии методикам на питательной среде Мурасига и Скуга, модифицированной Голодригой для этапов ввода и пролиферации [5]. В опыте было 4 варианта по 14 растений, повторность трехкратная. Слабо растущие меристемы пересаживали в пробирки на косые мостики из фильтровальной бумаги на жидкую питательную среду и культивировали при замедленном вращении на аппарате роллерного типа («вертушка»).

В состав питательной среды для разработки хемотерапии вводили салициловую кислоту, антибиотик Цефотаксим, регулятор роста Мелафен.

Цефотаксим является полусинтетическим аналогом цефалоспоринов – антибиотика третьего поколения. По химическому строению антибиотик принадлежит к группе β – лактамных соединений, близких к пенициллинам [6]. Цефалоспориновые антибиотики эффективны в малых дозах. Имеют широкий спектр биологической активности, низкую токсичность для эукариот. У

некоторых видов растений отмечено влияние этих двух антибиотиков на рост каллуса и морфогенез [7].

Салициловая кислота. Салициловую кислоту некоторые авторы относят к новому классу фитогормонов. Ученые из института физиологии растений им. К.А.Тимирязева и кафедры вирусологии МГУ [8] выявили, что в присутствии салициловой кислоты происходит ингибирование распространения вируса табачной мозаики (TMV), одной из причин которого они считают снижение проводимости плазмодесм и межклеточного транспорта вируса, что делает особо привлекательным применение салициловой кислоты при оздоровлении и клональном микроразмножении в культуре изолированных тканей и органов.

Мелафен. Уникальный, не имеющий аналогов в мире, препарат Мелафен создан в институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, представляет собой меламинавую соль бис (оксиметил)-фосфиновой кислоты. Ростостимулирующий эффект Мелафена обусловлен активацией энергетических процессов, в частности, дыхания и фотосинтеза. Мелафен обладает высокой полифункциональной физиологической активностью в низких концентрациях, рекомендован в качестве регулятора роста растений, отвечающего современным требованиям технологий для испытания на ведущих сельскохозяйственных культурах [9, 10].

Обсуждение результатов. Меристемы сортов винограда Преображение, Илья, Кармакод были введены в культуру в июне-июле в период активного роста растений винограда. Для того, чтобы осуществить ввод в культуру выделяемые апикальные меристемы высаживали на питательные среды, в которые вводили салициловую кислоту, антибиотик Цефотаксим, регулятор роста Мелафен. Результаты наблюдений за их развитием приведены в таблице 1.

Таблица 1. Особенности регенерации меристем сортов Илья, Кармакод на этапе ввода, 2014

Вариант		Состояние меристем, штук						
препарат	концентрация	гибель	мелкие до 1,0 мм	средние 1–3мм	крупные более 3 мм	слабый линейный рост	роетка листьев	всего развившихся
Сорт Илья —55 дней культивирования								
Контроль	0	–	–	3	1	–	–	4
Мелафен	10 ⁻⁷	2	–	4	–	–	1	5
Сорт Кармакод – продолжительность культивирования 43 дня								
Контроль	0	–	1	–	–	2	2	5
Мелафен	10 ⁻⁷	–	2	–	–	2	2	6
Салициловая кислота	0,14 мг/л	1	2	1	–	–	1	4
Салициловая кислота	0,77 мг/л	–	2	2	1	–	–	5
Цефотаксим	100 мг/л	–	4	–	–	–	–	4
Всего		1	11	3	1	4	5	24

Меристемы увеличивались в размерах, происходил их линейный рост и образование листьев. Развитие было несколько замедленным, к этому сроку «проснулись» единичные экземпляры, остальные находились в состоянии «меристема ожидания». Добавленные в питательную среду препараты незначительно стимулировали этот процесс. Высаженные на «вертушку» меристемы начали развиваться более активно. Также было отмечено положительное влияние препарата Мелафен.

Следует отметить, что у маточных растений сорта Преображение замечены визуальные признаки заражения вирусом скручивания листьев (*GLRaV*). В связи с этим, как на первом, так и на втором этапах ввода происходило слабое развитие меристем и гибель их от некроза тканей (рисунок 1). За два пассажа срезано всего 6 побегов. Половина этих побегов срезана в варианте с салициловой кислотой 0,77 мг/л. Это положительный результат хемотерапии.



Рисунок 1. Первый пассаж меристем сорта Преображение:
А – живые, В – погибшие от некроза

Положение у сортов Илья и Кармакод несколько лучше. У сорта Илья срезка за два пассажа составила 13 побегов, а у сорта Кармакод – 18 побегов. Хемотерапия не оказала положительного влияния, и большая срезка побегов зафиксирована в вариантах только с апикальными меристемами.



Рисунок 2. Меристемы сорта Кармакод на этапе ввода

Этап пролиферации продолжался в течение 4-х месяцев (сентябрь – декабрь). Конгломераты были сняты в январе. Результаты срезки побегов в процессе пролиферации представлены в таблице 2.

Таблица 2. Количество срезанных побегов на этапе пролиферации в зависимости от применяемых препаратов

Срезано побегов в вариантах опыта					Всего
Контроль	Мелафен 10 ⁻⁷	Салициловая кислота 0,14 мг/л	Салициловая кислота 0,77 мг/л	Цефотаксим 100 мг/л	
Сорт Илья					
23	60	–	–	–	83
Сорт Преображение					
19+11	18+18	11+14	13+7	12+8	73+58
Сорт Кармакод					
69+57	55+57	50+22	17+15	5+16	196+167

Более интенсивное образование побегов во время пролиферации происходило у сорта Кармакод. Всего по всем вариантам опыта образовалось 363 побега. Из них 196 крупных побегов были высажены на среду укоренения для дальнейшего микроразмножения, а мелкие побеги (в таблице окрашены) учтены и рассматривались нами как потенциальная возможность сорта к размножению в отдельных вариантах. Следует отметить высокую адаптивную возможность сорта к условиям *in vitro* и отсутствие реакции на применяемые препараты. В вариантах с салициловой кислотой (0,77 мг/л) и Цефотаксимом (100 мг/л) наблюдалось угнетение пролиферирующей способности.

Сорт Илья изучался только на питательной среде с Мелафеном, который оказал положительное влияние на пролиферацию: срезка побегов увеличилась по сравнению с контролем в 2,6 раза.

Сорт Преображение вводился в культуру дважды. При второй попытке отмечено некоторое улучшение собственно микроразмножения (пролиферации). Общее количество срезанных и поставленных на укоренении побегов составило 73 шт. Кроме этого, образовалось 58 мелких побегов, которые характеризуют потенциальную способность сорта к микроразмножению. Не отмечено положительного влияния исследуемых препаратов на пролиферирующую способность сорта. Но и угнетение от действия салициловой кислоты и Цефотаксима было минимальным. Образовавшиеся мелкие побеги указывают на улучшение потенциальной способности сорта при применении Мелафена и салициловой кислоты в минимальной концентрации.

Таким образом, осуществлен ввод в культуру и микроразмножение трех сортов винограда: Кармакод, Илья, Преображение. Сорта Кармакод и Илья

могут быть переданы на адаптацию и высажены в открытый грунт. С сортом Преображение следует поработать в плане оздоровления его.

Выводы. Анализ ввода меристем в культуру показал следующее:

1. Активное развитие меристем происходило при культивировании их во вращающемся состоянии в жидкой питательной среде на аппарате роллерного типа «вертушка».

2. Добавленные в питательную среду препараты (Мелафен, салициловая кислота, Цефотаксим) незначительно стимулировали процесс регенерации меристем.

3. Сорт Кармакод показал высокую адаптивную возможность к условиям *in vitro* и отсутствие реакции на применяемые препараты.

4. У сорта Илья на питательной среде с Мелафеном, срезка побегов увеличилась по сравнению с контролем в 2,6 раза.

5. Дважды вводился в культуру сорт Преображение. При второй попытке отмечено некоторое улучшение собственно микроразмножения (пролиферации). Общее количество срезанных и поставленных на укоренении побегов составило 73 шт.

Таким образом, выявлено преимущественное влияние апикальных меристем в сравнении с химиотерапией при вводе в культуру и на этапе пролиферации. Повышению регенерационной способности меристем способствует дополнительное культивирование меристем в жидкой питательной среде на аппарате роллерного типа.

Литература

1. Faccioli V.C., Marani F. Virus Elimination by Meristem Tip Culture and Tip Micrografting // Plant Virus Disease Control. St. Paul, 1998. P. 346–380.
2. Wang Q.C., Valkonen J.P.T. Cryotherapy of shoot tips: Novel pathogen eradication method // Trends Plant Sci. 2009. V. 14. P. 199–222.
3. Grout B.W.W. Meristem-Tip Culture for Propagation and Virus Elimination // Plant Cell Culture Protocols. Totowa, 1990. P. 115–125.
4. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 2011. V. 47. P. 5–16.
5. Методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда / П.Я. Голодрига, В.А. Зленко, Л. А. Чекмарев [и др.] // Ялта, ВНИИВВиПП «Магарач», 1986. 57 с.
6. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М., изд-во МГУ, 1994. С.358–363.
7. Yepes L.M., Aldwinckle H.S. Factors that Affect Leaf Regeneration Efficiency in Apple, and Effect of Antibiotics in Morphogenesis // Plant Cell.Tissue organ Cult. 1994. V.37. P. 257–269.
8. Может ли салициловая кислота влиять на межклеточный транспорт вируса табачной мозаики через изменение проводимости плазмодесм / Красавина М.С., Малышенко С.И., Г.Н. Ралдигина, Н.А. Бурмистрова, А.В. Носов // Физиология растений, 2002, Том 49, № 1, С. 71 – 77.
9. Фаттахов С.Г. Резник В.С., Коновалов А.И. Мелафен – перспективный регулятор

роста растений для сельского хозяйства и биотехнологии // Материалы Всероссийского семинара – совещания «Состояние исследований и перспективы применения регулятора роста нового поколения Мелафен в сельском хозяйстве и биотехнологии». Казань, 2006. С. 3–12.

10. Способ клонального микроразмножения винограда *in vitro* / Н.П. Дорошенко, С.Г. Фаттахов, Т.В. Жукова, В.С. Резник, А.И. Коновалов, А.Г. Берсенев // Патент на изобретение № 2538859. М.: Приор. 2013. 7 с.