СЕЛЕКЦИЯ, СОРТОИЗУЧЕНИЕ, АМПЕЛОГРАФИЯ

УДК 634.8.037: 581.143.6

СОРТ ВИНОГРАДА ЗОЛОТИНКА В КОЛЛЕКЦИИ *IN VITRO*

GRAPEVINE ZOLOTINKA IN COLLECTION *IN VITRO*

Н.П. Дорошенко

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

N.P. Doroshenko

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

Аннотация. Статья выполнена на актуальную тему сохранения биологического разнообразия. Сохранение зародышевой плазмы виноградной лозы *in vitro* является альтернативой полевой коллекции, и разработка эффективных методов ее хранения может обеспечить сохранение ценного биоразнообразия. В исследовании включен столовый сорт винограда Золотинка, очень раннего или раннего срока созревания с приятным мускатным ароматом ягод, в насаждениях которого отмечена высокая степень заражения его вирусной и фитоплазменной инфекцией. Перед постановкой на хранение осуществлено оздоровление от инфекции методом апикальных меристем размером 0,1–0,2 мм и при помощи антибиотика Цефотаксим. Для замедления ростовых процессов с целью создания медленно растущей коллекции исследовали регулятор роста Эмистим и антибиотик Гентамицин. Установлено, что препарат Эмистим оказывает влияние на ход ростовых процессов. По прошествии 140 дней культивирования наибольшая сохранность растений отмечена при разведении Эмистима 10^{-12} . В этом варианте отмечена самая низкая в опыте длина ризогенной зоны и наибольший рост растений. Торможение ростовых процессов (длина ризогенной зоны, рост растений, облиственность) обнаружено при концентрации 10^{-8} . Выявлено снижение приживаемости микрочеренков и интенсивности ростовых процессов при введении в состав питательной среды антибиотика Гентамицин в концентрациях 0,03–0,05 мл/л. Также отмечена более высокая

Summary. The article devoted to the current topic of biodiversity conservation by modern biotechnology methods. The preservation of *in vitro* vine germ plasma is an alternative to the field collection, and the development of effective *in vitro* storage can save valuable biodiversity. The study includes a table variety of grapes Zolotinka. The variety is of very early or early maturation with a pleasant muscat aroma of berries. The vineyards of this variety have a high degree of viral and phytoplasma infection. Before the preservation, the infection was rehabilitated by an apical meristem (size 0.1–0.2 mm) and with the help of antibiotic Cefotaxim. To slow down growth processes, the growth regulator Emystym and the antibiotic Gentamicin were studied to create a slow-growing collection. It was found that the drug Emistim has an impact on growth processes. After 140 days of cultivation, the greatest preservation of plants was noted in the variant with Emistim in concentration 10^{-12} . This variant shows the lowest length of risogenic zone in the experiment and the greatest growth of plants. Inhibition of growth processes (risogen area length, plant growth, number of leaves) was found at a concentration of 10^{-8} . Decrease of survival of microcuttings and the intensity of growth processes was found when the nutrient medium was supplemented by antibiotic Gentamicin in concentrations of 0.03–0.05 ml/l. There is also a higher viability of plants in variants with Gentamicin,

жизнеспособность растений в вариантах с применением Гентамицина, особенно при концентрации 0,03 мл/л. Благодаря этому антибиотику, продолжительность беспересадочного хранения в коллекции *in vitro* можно увеличить до 7–10 месяцев.

Ключевые слова: сорт Золотинка, *in vitro*, Эмистим, Гентамицин, ростовые процессы, жизнеспособность.

especially at a concentration of 0.03 ml/l. Due to antibiotic, the duration of non-stop storage can be increased up to 7–10 months.

Keywords: variety Zolotinka, *in vitro*, Emistim, Gentamicin, growth processes, viability.

DOI: 10.32904/2712-8245-2021-15-3-10

Введение. Особое значение в условиях глобального экологического неблагополучия приобретает проблема сохранения генофонда растений. Проблеме сохранения биоразнообразия уделяется внимание на различных уровнях от международных фондов и научных организаций до небольших волонтерских движений. Указом Президента Российской Федерации от 7 мая 2018 года № 204 сохранение биологического разнообразия отнесено к национальным целям и стратегическим задачам развития Российской Федерации на период до 2024 года.

Традиционных средств сохранения биологического разнообразия растений уже недостаточно. В настоящее время развивается новая междисциплинарная наука – биотехнология сохранения растений, основной задачей которой является дополнение существующих традиционных методов сохранения биоразнообразия *ex situ* и *in situ* современными биотехнологическими инструментами, обеспечивающими возможность устойчивого управления генетическими ресурсами [1–3]. Возможность создания банка культур *in vitro* для длительного хранения генофонда растений является важнейшим достижением биотехнологии [4–7].

А.А. Полулях и др. [8] в проблемной статье о генетических ресурсах винограда в институте «Магарач» приводят данные ряда зарубежных исследователей, которые рассматривают сохранение зародышевой плазмы виноградной лозы *in vitro* как альтернативу полевой коллекции и считают, что разработка эффективных и осуществимых способов ее хранения *in vitro* может обеспечить сбережение ценного биоразнообразия.

В настоящее время коллекции винограда *in vitro* созданы в лаборатории биотехнологии ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко [9, 10]. Разрабатываются методы создания и сохранения коллекции генофонда винограда *in vitro* в Институте «Магарач» [11].

Методы культивирования *in vitro* позволяют создать биотехнологию поддержания и хранения генофонда при замедленном росте этих объектов. Одним из ключевых моментов создания коллекции *in vitro* является разработка приёмов введения растительного материала в стерильную культуру. Чтобы достигнуть большего эффекта при длительном хранении генофонда, необходимо освободить растительный материал от патогенов и быстро размножить его.

Сорт Золотинка включен в исследование в связи с высокой степенью заражения его вирусной и фитоплазменной инфекцией.

Была поставлена цель — оздоровить растения, микроразмножить их, адаптировать к нестерильным условиям, высадить на базисный маточник, и сохранить оздоровленные растения в коллекции *in vitro*.

Первая часть работы отражена нами ранее [12]. В настоящей работе мы рассматриваем способ включения сорта Золотинка в коллекцию *in vitro*.

Материалы и методы. Сорт Золотинка (Фрумоаса албэ × Коринка русская) - столовый сорт винограда, очень раннего или раннего срока созревания (105–120 дней). Кусты сильнорослые. Грозди и ягоды крупные и очень крупные, при полном созревании янтарно-белые, мясисто-сочные, с приятным мускатным ароматом. Вступает в плодоношение на 2–3 год после посадки. Морозоустойчивость -25°C. Сорт устойчив к милдью, и серой гнили [13].

Исследования проводили по общепринятым в биотехнологии методикам на питательной среде Мурасига и Скуга, модифицированной П.Я. Голодригой [14].

Оздоровление от вирусной инфекции осуществлялось методом апикальных меристем размером 0,1–0,2 мм. Из-за высокой степени инфицирования маточного растения этап ввода меристем в культуру был продолжительным и малоэффективным. Для более полного оздоровления использовали многократную пересадку растений *in vitro* на свежую питательную среду, содержащую антибиотик Цефотаксим (рисунок).

Рисунок. Растения сорта Золотинка: А— введенные в культуру при помощи апикальных меристем; Б—полученные в результате многократных пересадок их на питательную среду с антибиотиком Цефотаксим.

В результате проведенных исследований состояние растений улучшилось, исчезли визуальные признаки вирусного и фитоплазменного заражения. Биологическое тестирование на травянистых индикаторах подтвердило оздоровление растений. Это обеспечило высокую приживаемость при адаптации

растений к нестерильным условиям и при высадке их на маточник, хороший рост растений, обильное первое плодоношение двухлетних кустов [12].

Для создания коллекции генофонда винограда *in vitro* и продолжительного беспересадочного культивирования необходимо замедление ростовых процессов культивируемых растений. Для этих целей исследуют различные факторы, такие как: пониженная температура, освещение, применение регуляторов роста, ингибиторов, осмотиков, изменение плотности питательной среды и т.д. Нами для этой цели в данном случае исследовались регулятор роста Эмистим и антибиотик Гентамицин.

Эмистим – уникальный регулятор роста, выделенный из гриба *Acremonium lichenicola*. Предпосылки для его использования в технологии *in vitro* следующие: слабая гиббереллиновая и цитокининовая активность, положительное влияние на процессы роста и развития растений, активация защитных реакций механизмов против неблагоприятных и стрессовых факторов, патогенных грибов, повышение устойчивости к вирусным болезням.

Гентамицин – активное вещество: гентамицина сульфат (0,04 г в мл), – бактерицидный антибиотик широкого спектра действия, относится к группе аминогликозидов. Обладает бактерицидным действием – в больших концентрациях снижает барьерные функции цитоплазматических мембран и вызывает гибель микроорганизмов. Оказывает антисептическое влияние по отношению большинства грамположительных и грамотрицательных бактерий, в том числе на мутированных микробов, приспособившихся к другим антибиотикам. Не действует на грибы, вирусы, простейшие.

При регенерации и сохранении растений учитывали следующие показатели: приживаемость микрочеренков, гибель от инфекции, гибель из-за отсутствия развития, число корней, длина корней, длина ризогенной зоны, высота, количество листьев всего и на 1 см побега, скорость роста, коэффициент полярности.

На протяжении всего эксперимента от начала пассажа до гибели последнего растения регистрировали жизнеспособность растений. Под жизнеспособностью подразумевается показатель, характеризующий продолжительность жизни анализируемого растения. Этот показатель оценивается в баллах по количеству некрозов тканей листьев и побегов: 0 баллов – визуальная гибель растения, 1 балл – некроз более 50% тканей растения, 2 балла – некроз менее 50% тканей, 3 балла – растения без некроза.

Обсуждение полученных результатов. Эмистим добавляли в состав твердой питательной среды Мурасиге и Скуга в разведении 10^{-8} , 10^{-10} , 10^{-12} . Полученные результаты отражены в таблице 1. При культивировании в течение 32 дней не отмечено положительного влияния препарата Эмистим. Приживаемость высаженных микрочеренков была высокой во всех вариантах опыта. Под действием препарата уменьшилось число образовавшихся корней и длина ризогенной зоны, несмотря на увеличение длины корней. Наибольшее снижение ризогенной зоны отмечено при разведении 10^{-12} . Рост растений был слабый, но

отмечена тенденция к увеличению высоты растений при содержании препарата в питательной среде 10^{-10} и 10^{-12} . На скорость роста растений Эмистим не влиял. Отмечено уменьшение коэффициента полярности, наиболее существенное в варианте с содержанием Эмистима 10^{-12} .

Таблица 1. Характеристика ростовых процессов растений сорта Золотинка при применении препарата Эмистим, 2011 г.

Вариант	Приживаемость, %	Корни			Высота, см	Листьев, шт.	Скорость роста, см/день	Коэффициент полярности
		число, шт.	длина, см	ризогенная зона, см				
32 дня культивирования								
контроль	100	1,7	2,0	3,4	1,0	1,9	0,03	3,4
Э (- ⁸)	100	1,2	2,5	3,0	1,0	1,5	0,03	3,0
Э (- ¹⁰)	96,4	1,2	2,7	3,2	1,1	1,9	0,03	2,9
Э (- ¹²)	100	1,1	1,8	2,0	1,1	1,8	0,03	1,8
63 дня культивирования,								
контроль	75,0	1,5	6,1	9,2	3,0	4,2	0,05	3,1
Э (- ⁸)	92,8	1,4	5,7	8,0	2,7	4,2	0,04	3,0
Э (- ¹⁰)	89,3	1,2	5,7	6,8	2,9	4,0	0,05	2,3
Э (- ¹²)	96,6	1,4	4,8	6,6	3,0	4,5	0,05	2,2
95 дней культивирования								
контроль	75,0	1,6	6,3	10,1	5,1	6,7	0,05	2,0
Э (- ⁸)	78,6	1,4	6,4	9,0	4,9	6,7	0,05	1,8
Э (- ¹⁰)	82,0	1,5	6,0	9,0	4,8	6,5	0,05	1,8
Э (- ¹²)	92,8	1,5	5,6	8,4	5,0	6,6	0,05	1,7
140 дней культивирования								
контроль	75,0	1,7	6,3	10,7	8,4	10,6	0,06	1,3
Э (- ⁸)	78,6	1,5	6,2	9,3	7,3	9,5	0,05	1,3
Э (- ¹⁰)	82,0	1,5	6,1	9,1	8,4	10,2	0,06	1,0
Э (- ¹²)	91,1	1,5	5,6	8,4	8,9	10,3	0,06	0,9

На 63 день культивирования выявлено положительное влияние препарата Эмистим на приживаемость мирочеренков и развитие из них растений. В то время как в контроле сохранность растений составила 75,0 %, в вариантах с Эмистимом она колебалась в пределах 89,3–96,6%. Также, как и на 32-й день культивирования, отмечено снижение ризогенной активности во всех вариантах с препаратом, наиболее значительное при содержании Эмистима в питательной среде 10^{-10} и 10^{-12} . Отмечено угнетение роста растений при разведении препарата 10^{-8} .

При культивировании в течение 95 дней сохранность растений несколько уменьшилась, но оставалась на достаточно высоком уровне особенно в вариантах с Эмистимом 10^{-10} и 10^{-12} – 82,0–92,8 %. Возросла длина ризогенной зоны, но в вариантах с Эмистимом она уступала контрольному варианту. Отмечено уменьшение роста растений.

По прошествии 140 дней культивирования наибольшая сохранность растений отмечена при разведении Эмистима 10^{-12} . В этом варианте отмечена самая низкая в опыте длина ризогенной зоны и наибольший рост растений. Торможение ростовых процессов (длина ризогенной зоны, рост растений, облиственность) обнаружено при концентрации 10^{-8} .

Таким образом, установлено, что препарат Эмистим оказывает влияние на ход ростовых процессов при культивировании *in vitro* сорта Золотинка, что необходимо учитывать при создании коллекции.

С помощью антибиотиков, в частности Гентамицина, можно решить две проблемы: оздоровление от бактериальной инфекции и замедление ростовых процессов растений с целью их более продолжительного беспересадочного хранения.

Нами ранее выявлена возможность, хранения растений без пересадок в течение 8–12 месяцев при добавлении в состав питательной среды антибиотика Гентамицин. В связи с этим был заложен опыт по изучению различных концентраций Гентамицина и влияния их на замедление ростовых процессов растений сорта Золотинка (таблица 2).

Таблица 2. Характеристика ростовых процессов растений сорта Золотинка при применении антибиотика Гентамицин, 2017–2019 гг.

Гентамицин, мл/л	Приживаемость, %	Корни			Высота, см	Листьев, шт.	Скорость ро- ста, см/день	Коэффициент полярности
		число, шт.	длина, см	ризогенная зона, см				
Учёт через 40 дней культивирования								
0	100	2,3	3,8	8,8	2,5	3,3	0,06	3,5
0,1	53,6	1,3	0,7	1,0	1,5	1,5	0,04	1,0
0,05	92,9	2,7	0,9	2,6	1,8	3,1	0,05	1,5
0,03	85,7	2,4	1,0	2,4	1,5	2,1	0,04	1,5
Учёт через 70 дней культивирования								
0	85,7	2,6	4,3	11,3	5,6	7,3	0,08	2,1
0,1	0	-	-	-	-	-	-	-
0,05	85,7	3,1	1,1	3,3	2,7	4,7	0,06	1,3
0,03	75,0	3,4	1,1	3,9	2,7	4,9	0,07	1,4
Учёт через 135 дней культивирования								
0	85,7	2,7	4,3	11,4	6,8	8,6	0,05	1,7
0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
0,05	85,7	3,1	1,1	3,4	3,1	5,8	0,02	1,1
0,03	75,0	3,8	1,1	4,2	3,3	5,9	0,03	1,3

В результате введения антибиотика Гентамицин в состав питательной среды происходит снижение приживаемости микрочеренков и снижение интенсивности ростовых процессов микроклонов. Наиболее значительное снижение приживаемости и угнетение растений отмечено при концентрации антибиотика

0,1 мл/л. При учете через 70 дней культивирования отмечена гибель всех растений в этом варианте. При концентрациях 0,03 и 0,05 мл/л приживаемость растений составила 75,0 и 85,7% (на уровне контроля), но более чем в 2 раза уменьшилась скорость роста растений, образование и рост корней, рост и облиственность растений, то есть, происходит «минимизация» роста растений.

Осуществлялось наблюдение за состоянием этих растений в процессе хранения (таблица 3).

Таблица 3. Жизнеспособность растений сорта Золотинка при депонировании, 2017–2019 гг.

Гентамицин, мл/л	Сохранилось, шт. / %	Высота растений, см	Листьев, шт.			Жизнеспособность, балл
			зеленых	пожелтевших	сухих	
Хранение в течение 75 дней						
0	24/85,7	6,2	6,2	7,5	4,5	2,0
0,05	23/82,1	3,0	3,0	5,1	1,2	2,0
0,03	21/75,0	3,2	3,2	5,0	1,5	2,0
Хранение в течение 145 дней						
0	24/85,7	7,7	9,4	5,6	1,0	1,5
0,05	23/82,1	3,6	6,9	1,0	1,8	2,5
0,03	21/75,0	4,3	5,8	1,9	1,3	2,0
Хранение в течение 290 дней						
0	9/32,1	11,8	4,8	6,7	5,4	1,0
0,05	12/42,8	8,3	4,2	4,8	3,8	1,0
0,03	13/46,4	10,7	4,7	6,0	3,0	1,1

При депонировании отмечена более высокая жизнеспособность растений в вариантах с применением Гентамицина, особенно при концентрации 0,03 мл/л. Благодаря этому антибиотику, продолжительность беспересадочного хранения можно увеличить до 7–10 месяцев.

Выводы. Выявлено положительное влияние регулятора роста Эмистим и антибиотика Гентамицин на ход ростовых процессов растений винограда Золотинка в культуре *in vitro*. Показано положительное влияние этих препаратов на приживаемость микрочеренков при вводе в культуру и сохранность растений при продолжительном культивировании. Установлены концентрации, способствующие замедлению роста и минимизации растений: для Эмистима – 10^{-12} , для Гентамицина – 0,03 мл/л. Полученные данные будут применены при разработке протокола введения сорта Золотинка в коллекцию *in vitro*.

Литература

1. Сохранение редких и исчезающих видов растений при помощи методов биотехнологии / О.О. Жолобова, О.И. Коротков, Г.Н. Сафронова, А.В. Буганова, О.А. Скоропудова // Современные проблемы науки и образования. 2012. № 1.
2. Новикова Т.И. Использование биотехнологических подходов для сохранения биоразнообразия растений // Растительный мир Азиатской России. 2013. № 2(12). С. 119–128.
3. Особенности размножения и сохранения коллекции экономически важных растений в условиях *in vitro* / О.И. Молканова, О.Г. Васильева, Л.Н. Коновалова, Т.С. Стахеева, И.Л. Крахмалева // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты). Симферополь, 2016. С. 156–157.
4. Сохранение редких видов растений в генетических коллекциях *in vitro* / Е.М. Ветчинкина, И.В. Ширнина, С.Ю. Ширнин, О.И. Молканова // Вестник балтийского федерального университета им. И. Канта. Серия: естественные и медицинские науки. 2012. № 7.
5. Conservation in vitro of threatened plants-Progress in the past decade / V. Sarasan, R. Cripps, M.M. Ramsay, C. Atherton, M. McMichen, G. Prendergast, J.K. Rowntree // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 2006. V. 42. P. 206–214.
6. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity / Cruz-Cruz C.A., Gonzalez-Arnao M. Teresa and Engelmann F // Resources –2013. 2. P. 73–95.
7. Высоцкий В.А. Совершенствование методов сохранения ценных генотипов плодовых и ягодных культур *in vitro* // Плодоводство и ягодоводство России. 2015. Т. 41. 69–73.
8. Полулях А.А., Волынкин В.А., Лиховской В.В. Генетические ресурсы винограда института «Магарах». Проблемы и перспективы сохранения // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017; 21(6):608-616. DOI 10.18699/VJ17.27.4.
9. Дорошенко Н.П. Оздоровление, клональное микроразмножение и депонирование винограда в культуре *in vitro* // Магарах. Виноградарство и виноделие. 2015. №3. С.49–51.
10. Дорошенко Н.П. К вопросу создания коллекции генофонда винограда *in vitro* // Русский виноград. Т. 5. 2017. С. 68–86.
11. Павлова И.А. Вегетирующая коллекция растений винограда *in vitro*, условия хранения // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология. 2018. С. 170–171.
12. Дорошенко Н.П., Ребров А.Н. Клональное микроразмножение сорта винограда Золотинка // Русский виноград: ФГБНУ ВНИИВиВ, 2018. —Т.7 С.68-76
13. Сорт винограда Золотинка (Галбена Ной): // Виноград все о винограде [Электронный ресурс]<http://vinograd.info/sorta/stolovye/galbena-noy.html>(Дата обращения: 18.03.2018).
14. Методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда / П.Я. Голодрига и др.; ВНИИВиПП «Магарах». Ялта, 1986. 56 с.