СЕЛЕКЦИЯ, СОРТОИЗУЧЕНИЕ, АМПЕЛОГРАФИЯ

УДК 634.8.037: 581.143.6

ЦИКЛ «ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ IN VITRO – МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ» У СОРТОВ ВИНОГРАДА: ЛЕДЯНОЙ, ЗОЛОТЦЕ, МУСКАТ АКСАЙСКИЙ

CYCLE "INTRODUCTION TO IN VITRO CULTURE - MICRO-PROPAGATION" OF VINE VARIETIES: LEDYANOY, ZOLOTCE, MUSCAT AKSAISKIY

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. В статье отмечается необходимость совершенствования клонального микроразмножения для создания генетических банков. Ключевым моментом при этом является оптимизация цикла «введение в культуру *in vitro* – микроразмножение». На трех сортах винограда, различающихся по морфобиологическим показателям, исследована возможность совместного применения апикальных меристем и хемотерапии. Для этого осуществлено введение в питательную среду антивирусного препарата Рибавирин, салициловой кислоты, антибиотика Цефотаксим, регулятора роста Мелафен. Приведено подробное описание методов исследования как общепринятых, так и усовершенствованных автором. Выявлено интенсивное развитие апикальных меристем у сорта Ледяной, у меристем сорта Золотце обнаружена положительная реакция на все изучаемые препараты, особенно на Цефотаксим и Мелафен. У сорта Мускат аксайский отмечена значительная гибель и замедленное развитие апикальных меристем. В вариантах с применением Рибавирина, салициловой кислоты и Цефотаксима обнаружено улучшение развития меристем — больше образовалось меристем крупных и меристем с началом линейного роста. Установлено положительное влияние хемотерапии на коэффициент размножения и на побегообразование. Коэффициент размножения сорта Ледяной увеличился в 1.8–2.7 раза, сорта Золотце в 2–2.3 раза, сорта Мускат аксайский в

Summary. The article notes the necessity to improve clonal micro-propagation in order to create genetic banks. The key moment is to optimize the "introduction to *in vitro* culture- micro-propagation" cycle. The possibility of joint use of apical meristem and chemotherapy was studied for three grapevine varieties that differ in morphobiological indicators. To do this, the antiviral drug Ribavirin, salicylic acid, the antibiotic Cefotaxim, the growth regulator Melafen, were supplemented to the nutrient medium. A detailed description of the research methods, both generally accepted and improved by the author are given in the paper. Intensive development of apical meristem in Ledyanoy variety has been detected, and the meristem of the Zolotce variety has been found to have a positive reaction to all the drugs studied, especially Cefotaxim and Melafen. The Muscat Aksaiskiy had significant death and slow development of apical meristem. In variants with the use of Ribavirin, Salicylic acid and Cefotaxima a better development of meristems was marked. There were more large meristems and with the signs of growth. The positive effect of chemotherapy on the multiplication coefficient and on the shoot formation was established. The reproduction rate of Ledyanoy variety increased by 1.8 — 2.7 times, the Zolotce variety by 2-2.3 times, and the Muscat Aksayiskiy variety by 2.3-2.6 times. The largest number of shoots was formed in the varieties Ledyanoy and Muscat Aksayskiy - 53 pcs., slightly less in the variety Zolotce - 47 pcs. In the Ledyanoy variety, the best options are: Cefotaxime and salicylic acid; in the Zolotce variety, Cefotaksim; in the Muscat Aksaiskiy

2,3–2,6 раза. Наибольшее число побегов образовалось у сортов Ледяной и Мускат аксайский — 53 шт., несколько меньше у сорта Золотце — 47 шт. У сорта Ледяной лучшие варианты: Цефотаксим и салициловая кислота; у сорта Золотце — Цефотаксим; у сорта Мускат аксайский: Цефотаксим и салициловая кислота. Доказана необходимость применения химиотерапии на этапе ввода апикальных меристем в культуру *in vitro* для оптимизации клонального микро размножения.

Ключевые слова: клональное микро размножение, апикальные меристемы, Рибавирин, салициловая кислота, Цефотаксим, регенерация, коэффициент размножения, побегообразование.

variety: Cefotaxime and salicylic acid. The necessity of using chemotherapy at the stage of introducing apical meristems into the culture *in vitro* to optimize clonal micro-reproduction was proved.

Keywords: clonal micropropagation, apical meristems, Ribavirin, salicylic acid, Cefotaxime, regeneration, multiplication factor, shoot formation.

DOI: 10.32904/2712-8245-2021-16-3-10

Введение. Сохранение разнообразия форм жизни — важнейшая проблема современного человечества, которая стала актуальной в связи с тем, что большое число видов растений находятся под угрозой исчезновения.

Наряду с традиционными способами сохранения биоразнообразия растительного мира, в настоящее время широко используются методы биотехнологии растений, в том числе поддержание культур редких видов на питательной среде в генетических банках *in vitro* [1–3].

Сохранение биоразнообразия растений и создание генетических банков является одним из перспективных направлений биотехнологии, в частности это метод клонального микро размножения, который позволяет в кратчайшие сроки получить большое количество растений при недостатке исходного материала и потомство, генетически идентичное исходному виду или форме.

Метод микро размножения через апикальные меристемы многие годы используется для элиминации вирусов, которые могут присутствовать в тканях без каких-либо симптомов и передаваться при массовом тиражировании [4]. 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 [5]. Поскольку, по мнению Б.В. Граут [6], только конус нарастания побега и первый листовой примордий обычно свободны от вирусов, размеры изолируемой меристемы имеют решающее значение. Культивирование меристем в комбинации с химиотерапией и химиотерапией дает положительные результаты, необходимые для массового размножения безвирусного материала, что существенно упрощает международный обмен гермоплазмой редких исчезающих и ресурсных видов растений [1].

Одним из ключевых моментов создания коллекции *in vitro* является разработка приёмов введения растительного материала в стерильную культуру.

Цель исследований — оптимизация цикла «введение в культуру *in vitro* — микроразмножение» с учетом сортовых особенностей и состояния маточных растений.

Материалы и методы. Осуществляли ввод в культуру трех сортов винограда селекции ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко: Ледяной, Золотце, Мускат аксайский, которые отличаются между собой по направлению использования, срокам созревания, силе роста кустов, вызреванию лозы и другим морфобиологическим показателям.

Исследования проводили по общепринятым в биотехнологии методикам Ф. Р. Уайт [7]. Бутенко Р.Г. [8]; Голодрига П.Я. и др., [9], усовершенствованным в лаборатории биотехнологии ГНУ ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко [10, 11].

За основу был взят способ оздоровления растений при помощи культуры апикальных меристем при относительном размере эксплантов 0,1–0,2 мм. Для ввода в культуру *in vitro* в качестве исходного материала были взяты почки побегов виноградных кустов в период активного роста. Из почек после стерилизации были выделены меристемы без листовых примордиев.

На первом этапе, чтобы добиться хорошо растущей стерильной культуры, осуществляли стерилизацию растительных тканей 0,8 %-ном раствором agn03 . После этого выделенные меристемы переносили на твердую питательную стерильную среду Мурасиге и Скуга, разлитую в стерильные пробирки.

Жидкая питательная среда для ввода (мг/л). Макроэлементы: NH_4NO_3 1237,5; KNO_3 1425; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 277,5; KH_2PO_4 127,5; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 330,0. Микроэлементы: H_3BO_3 6,2; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22,3; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,025; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,025; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8,6; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,25; KJ 0,83. Хелат железа: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27,8; Na_2 ЭДТА $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 37,3 мг/л; NaNH_2PO_4 170; $\text{NaNH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 221,0. Витамины: мезоинозит 100,0; тиамин HCL 0,5; 6 БАП 0,5; сахараза 30,0 г/л. Для приготовления твердой питательной среды в её состав добавляется 7,5 г/л агар-агара.

Этап ввода для повышения приживаемости меристем разделяли на два подэтапа. Культивирование осуществляли сначала на твердой питательной среде. Затем, через 3–4 недели, когда меристемы увеличатся до 2–3 мм, пересаживали их на жидкую питательную среду на косые мостики из фильтровальной бумаги, а пробирки помещали на вращающийся аппарат роллерного типа с тем, чтобы экспланты все время омывались питательной средой.

Второй этап — собственно микроразмножение. Культивирование проводили на жидкой питательной среде Мурасиге и Скуга в колбах Эрленмейера. Тонкий слой питательной среды (2–4 мм), обеспечивает достаточную аэрацию. Добавление в питательную среду цитокинина 6-БАП в первом пассаже — 1,0 мг/л, со второго пассажа — 2,0 мг/л индуцирует развитие многочисленных пазушных побегов. Пересадки осуществляли через 14 дней, каждый раз, разделяя эксплант на 5–7 частей и снова повторно высаживая на свежую питательную среду того же состава для повторения.

Жидкая питательная среда для пролиферации пазушных почек и побегов (мг/л). Макроэлементы NH_4NO_3 1650; KNO_3 1900; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370; KH_2PO_4 170; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 440. МИКРОЭЛЕМЕНТЫ: H_3BO_3 6.2; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22.3; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.025; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.6; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25; KJ 0.83. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.8; $\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 37.3; NaNH_2PO_4 , $\text{NaNH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 170, 221. Витамины: мезоинозит 50; тиамин HCL 0,5; сахара 30 г/л; 6-БАП 0,5–2,0; pH 5,1.

Дополнительно, к культуре апикальных меристем, исследовали введение в питательную среду противовирусного препарата Рибавирин (5,0 мг/л), салициловой кислоты (0,77 мг/л), от фитоплазменной инфекции – антибиотика Цефотаксим (100 мг/л). для повышения регенерационной способности меристем регулятора роста Мелафен. При введении в культуру меристем сорта Мускат аксайский, добавляли в состав питательной среды Рибавирин в количестве 5 мг/л; Рибавирин совместно с салициловой кислотой – 5 мг/л + салициловая кислота – 0,14 мг/л. Также была осуществлена предварительная обработка эксплантов перед выделением меристем в течение 16 часов в растворе Рибавирина и салициловой кислоты. Таким образом, было заложено 3 опыта. Выделено 140 меристем.

Обсуждение результатов. Меристемы сортов Ледяной и Золотце сразу тронулись в рост, гибели их не наблюдалось. Через 15 дней культивирования большинство из них были мелкого (до 1 мм) и среднего (1–3 мм) размера, 1/5 часть меристем была размером более 3 мм, и у такого же количества меристем наблюдался слабый линейный рост и раскрытие листовых примордиев (таблица 1).

Таблица 1. Состояние меристем сортов Золотце и Ледяной на этапе ввода, 2015 г.

Вариант		Состояние меристем, штук						
препарат	концентрация	гибель	мелкие до 1,0 мм	средние, 1–3 мм	крупные, более 3 мм	Слабый линейный рост	розетка листьев	всего развившихся
Сорт Ледяной—14 дней культивирования								
Контроль	0	0	4	3	2	2	-	11
Салициловая кислота	0,77 мг/л	0	2	6	1	-	1	10
Цефотаксим	100 мг/л	0	2	3	2	3	-	10
Мелафен	10^{-7}	0	2	3	2	2	-	9
Сорт Золотце – 14 дней культивирования								
Контроль	0	0	3	2	2	2	-	9
Салициловая кислота	0,77 мг/л	0	4	6	0	-	-	10
Цефотаксим	100 мг/л	0	4	5	0	2		11
Мелафен	10^{-7}	0	5	3	1	3	-	12

Более интенсивное развитие меристем в контроле (апикальные меристемы) отмечено у сорта Ледяной, у меристем сорта Золотце выявлена положительная реакция на все изучаемые препараты, особенно на Цефотаксим и Мелафен.

Через 30 дней культивирования размеры меристем увеличились, наблюдалось образование розетки с листьями и почками. Более интенсивно этот процесс проходил также у сорта Ледяной. Замедлено было развитие при применении салициловой кислоты.

У сорта Мускат аксайский на этапе ввода (таблица 2) отмечена значительная гибель меристем, особенно в варианте с предварительным замачиванием эксплантов в растворе Рибавирина. Сохранившиеся меристемы достаточно интенсивно развивались и через месяц культивирования были готовы к переходу к следующему этапу клонального микроразмножения (собственно микроразмножение). В вариантах с применением Рибавирина, салициловой кислоты и Цефотаксима отмечено улучшение развития меристем — больше образовалось меристем крупных и меристем с началом линейного роста.

Таблица 2. Состояние меристем сорта Мускат аксайский на этапе ввода через 30 дней культивирования, 2015 г.

Вариант		Состояние меристем, штук						
препарат	концентрация	гибель	мелкие до 1,0 мм	средние 1-3мм	крупные, более 3 мм	слабый линейный. рост	розетка листьев	всего развилось
Контроль	0	2	3	2	-	4	-	11
Рибавирин	замачив.	7	1	2	-	1	-	4
Рибавирин	5 мг/л	2	1	1	4	3	-	9
СК	0,14 мг/л	1	2	3	1	4	-	10
Рб+ СК	5+0,14	-	3	1	2	5	-	11
Цф	100мг/л	3	-	3	1	4	-	8

Хорошо развившиеся меристемы были пересажены в колбы для прохождения этапа пролиферации и в пробирки для культивирования в аппарате роллерного типа с тем, чтобы ускорить их регенерацию. Из контрольного варианта было пересажено 10 меристем, из варианта с предварительным замачиванием в растворе Рибавирина — 4 шт., из варианта с добавлением в питательную среду Рибавирина — 5,0 мг/л — 11 шт., введение в состав питательной среды салициловой кислоты — 12 шт., Рибавирин +салициловая кислота — 13 шт., Цефотаксим — 12 шт.

Меристемы размером до 1 мм, были оставлены на среде для ввода ещё на 36 дней (таблица 3).

Таблица 3. Состояние меристем сорта Мускат аксайский после культивирования на втором подэтапе ввода, 2015г.

Вариант		Состояние меристем, штук						
препарат	концентрация	гибель	мелкие до 1,0 мм	средние 1-3мм	крупные более 3 мм	слабый линейный рост	розетка листьев	всего развилось
Контроль	0	-	3	1	-	1	-	5
Рибавирин	замачив.	-	-	3	-	-	-	3
Рибавирин	5 мг/л	-	-	3	2	-	1	6
СК	0,14 мг/л	1	1	3	1	-	-	6
Рб+ СК	5+0,14	-	1	3	-	2	-	6
Цефотаксим	100 мг/л	-	-	2	1	1	-	4

За это время лучшее развитие меристем отмечено также в вариантах с Рибавирином, салициловой кислотой и Рибавирин + салициловая кислота. Они были пересажены на пролиферацию.

Таким образом, осуществлен ввод в культуру трех сортов винограда: Золотце, Ледяной и Мускат аксайский.

Следующий этап клонального микроразмножения — этап собственно микроразмножения (пролиферация), во время которого происходит новообразование адвентивных побегов. Показателями, характеризующими продуктивную регенерацию меристем, являются: продолжительность этапа собственно микроразмножения, число срезанных побегов в расчете на одну выделенную меристему, на один пассаж и, в том числе, на один продуктивный пассаж.

Этап собственно микроразмножения продолжался в течение двух лет. Результаты учетов и наблюдения за ходом пролиферации изучаемых сортов представлены в таблицах 4 и 5.

Таблица 4. Срезка адвентивных побегов в ходе пролиферации сортов Ледяной и Золотце, 2015–2016 гг.

Препарат	Концентрация	Срезано побегов в пассаже, штук								Коэф. размн.
		1	2	3	4	5	6	7	всего	
Сорт Ледяной										
Контроль	0	1	6	0	1	0	0	1	9	0,6
Мелафен,	10 ⁻⁷	3	0	4	0	0	0	2	9	1,5
Цефотаксим	100 мг/л	4	5	5	0	0	4	0	18	1,6
Салицилов. кислота	0,77 мг/л	3	2	6	1	0	3	2	17	1,4
Всего		11	13	15	2	0	7	5	53	1,1
Сорт Золотце										
Контроль	0	3	0	4	3	6	0	0	16	1,0
Мелафен	10 ⁻⁷	0	0	0	0	6	0	2	8	2,0
Цефотаксим	100 мг/л	6	0	17	0	0	0	0	23	2,3
Салицилов. кислота	0.77 мг/л	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Всего		9	0	21	3	12	0	2	47	1,0

Приведенные данные указывают на низкий коэффициент размножения (число побегов, образовавшихся на одну выделенную меристему) у всех 3-х сортов при вводе в культуру только апикальных меристем. Повышение коэффициента размножения в 2–2,5 раза по сравнению с контролем отмечено у сортов Ледяной и Золотце при введении в состав питательной среды регулятора роста Мелафен, антибиотика Цефотаксим, что указывает на наличие микоплазменной инфекции, которая снимается применением Цетофаксима. Салициловая кислота способствует оздоровлению от вирусной инфекции сорта Ледяной, а для сорта Золотце концентрация салициловой 0,77 мг/л оказалась токсичной и все меристемы погибли

Таблица 5. Срезка адвентивных побегов в ходе пролиферации сорта Мускат аксайский, 2015–2016 гг.

Препарат	Концентрация	Срезано побегов в пассаже, штук								Коэф. размн.
		1	2	3	4	5	6	7	всего	
Сорт Мускат аксайский										
Контроль	0	1	6	0	1	0	0	1	9	0,6
Мелафен,	10 ⁻⁷	3	0	4	0	0	0	2	9	1,5
Цефотаксим	100 мг/л	4	5	5	0	0	4	0	18	1,6
Салицилов. кислота	0.77 мг/л	3	2	6	1	0	3	2	17	1,4
Всего		11	13	15	2	0	7	5	53	1,1

У сорта Мускат аксайский самый низкий коэффициент размножения получен в контроле. Все применяемые препараты оказали положительное влияние на коэффициент размножения. Наибольшее побегообразование произошло при применении Цефотаксима и совместного применения Рибавирина и салициловой кислоты.

Выводы. Коэффициент размножения при культивировании апикальных меристем (контрольный вариант) сортов Ледяной и Мускат аксайский составил 0,6; сорта Золотце — 1,0. У сорта Мускат аксайский выявлена длительная продолжительность этапа собственно микроразмножения. Побегообразование было невысоким. У сортов Ледяной и Мускат аксайский оно составило всего 9 побегов за весь период, у сорта Золотце — 16. Таким образом, прослеживается четкое влияние сортовых особенностей на прохождение этапов ввода и собственно микроразмножения, которое следует учитывать при клональном размножении этих сортов.

Применение хемотерапии оказало положительное влияние как на коэффициент размножения этих сортов, так и на побегообразование. Коэффициент размножения сорта Ледяной увеличился в 1,8–2,7 раза, сорта Золотце в 2–2,3 раза, сорта Мускат аксайский в 2,3–2,6 раза. Наибольшее число побегов образовалось у сортов Ледяной и Мускат аксайский — 53 шт., несколько меньше у сорта Золотце — 47 шт. У сорта Ледяной лучшие варианты: Цефотаксим и салициловая кислота; у сорта Золотце — Цефотаксим; у сорта Мускат аксайский: Цефотаксим и салициловая кислота.

Таким образом, доказана целесообразность применения хемотерапии на этапе ввода апикальных меристем в культуру *in vitro* для оптимизации клонального микроразмножения.

Литература

1. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 2011. V. 47. P. 5–16.
2. Сохранение редких видов растений в генетических коллекциях *in vitro* / Е.М. Ветчинкина, И.В. Ширнина, С.Ю. Ширнин, О.И. Молканова // *Вестн. Балтийского фед. ун-та им. И. Канта.* 2012. Вып. 7. С. 109–118.
3. Новикова Т.И. Использование биотехнологических подходов для сохранения биоразнообразия растений // *Растительный мир Азиатской России*, 2013, № 2(12), С. 119–128.
4. Faccioli V.C., Marani F. Virus Elimination by Meristem Tip Culture and Tip Micrografting // *Plant Virus Disease Control.* St. Paul, 1998. P. 346–380.
5. Wang Q.C., Valkonen J.P.T. Cryotherapy of shoot tips: Novel pathogen eradication method // *Trends Plant Sci.* 2009. V. 14. P. 199–222.
6. Grout B.W.W. Meristem-Tip Culture for Propagation and Virus Elimination // *Plant Cell Culture Protocols.* Totowa 1990. P. 115–125.
7. Уайт Ф.Р. Культура растительных тканей. М.: Иностранная литература, 1949. 160с.
8. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 272 с.
9. Методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда / П.Я. Голодрига [и др.] // ВНИИВиПП «Магарач». Ялта, 1986. 56 с.
10. Дорошенко Н.П. Клональное микроразмножение и оздоровление посадочного материала винограда для создания из него сортовых маточников интенсивного типа (рекомендации) / Министерство сельского хозяйства и продовольствия РСФСР. Москва, 1992.
11. Дорошенко Н.П. Клональное микроразмножение винограда (рекомендации) – Новочеркасск: Изд-во ГНУ ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко, 2012. – 12 с.