

УДК 634.8 :581.16.04

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ УСКОРЕННОГО РАЗМНОЖЕНИЯ
ВИНОГРАДА**

Батукаев А.А., доктор с.-х. наук, Эдиева Х.
Чеченский государственный университет (Грозный)

Батукаев М.С.
*Чеченский научно-исследовательский институт сельского хозяйства
(Грозный)*

Реферат. В статье приводятся результаты исследований по совершенствованию технологии введения в культуру *in vitro* и дальнейшему размножению сортов винограда. Усовершенствована питательная среда с применением регуляторов роста.

Ключевые слова: виноград, размножение, питательная среда, регуляторы

Summary. The result of research on improvement of technology of culture introduction *in vitro* and further reproduction of grapes varieties are given in the article. The nutrient environment used with application of growth regulators is improved.

Key words: grapes, reproduction, nutrient environment, regulators

Введение. Виноград – одна из самых распространенных сельскохозяйственных культур, играющая существенную роль в мировой экономике. Увеличение производства винограда требует не только расширения площадей, но и разработки и совершенствования технологий, обеспечивающих ускоренное размножение перспективных сортов, повышение урожайности виноградных насаждений [1, 2].

Основой поддержания высокой урожайности сортов и здорового фитосанитарного состояния растений является научно-обоснованная система производства посадочного материала. Современная технология производства оздоровленного посадочного материала в качестве составной части включает биотехнологические приемы, комплексное оздоровление с использованием культуры изолированных апексов, ускоренное размножение оздоровленных экземпляров на искусственных питательных средах и создание коллекций оздоровленных форм *in vitro* [3, 4].

Объекты и методы исследований. Объектом исследований явились комплексно-устойчивые сорта винограда селекции Всероссийского НИИВиВ имени Я.И.Потапенко, НИИВиВ "Магарач", молдавской, венгерской селекции и др. В качестве исходного материала были взяты интенсивно растущие зеленые побеги винограда, которые разрезали на одноглазковые черенки и далее проводили вычленение меристем в ламинарных боксах.

В эксперимент были включены следующие сорта: Августин, Молдова, Восторг, Мускат итальянский, Ранний Магарача, Подарок Магарача, Виорика.

Одноглазковые черенки перед вычленением меристемы стерилизовали в 2 %-м растворе гипохлорита натрия. Простерилизованные органы помещали в стерильную чашку Петри. Перед вычленением с верхушки глазка удаляли покровные чешуи, последовательно обнажая верхушечную меристему с примордиальными листочками. Эту операцию проводили с помощью препаровальной иглы под стереоскопическим микроскопом МБС-10, установленным в пылезащитной камере (ламинар-боксе).

Вычленяли меристемы от 300 до 600 микрон специальной препаровальной иглой и медленно помещали на поверхность агаризованной среды в чашки Петри, которые в свою очередь были размещены в культуральной комнате с соответствующими условиями: освещенность 3-4 тыс. люкс, температура 27-28⁰С, относительная влажность воздуха 65-70 %.

При этом использовали модифицированную питательную среду MS (Мурасиге и Скуга) с витаминами – тиамин – 1 мг/л, пиридоксин – 1 мг/л, никотиновая кислота – 1 мг/л, мезоинозит – 50 мг/л, источник углерода (сахароза) – 2 %, агар – 0,7 % и доводили рН до 6,4-6,5.

В качестве регуляторов роста в питательную среду добавляли ауксины и цитокинины в различных концентрациях и сочетаниях. Из группы ауксинов было изучено влияние ИМК и ИУК, из группы цитокининов – 6-бензиламинопурина (БАП), а также гибберелловая кислота (ГК).

Культивирование растительного материала осуществляли на первом этапе в чашках Петри, далее в пробирках размером 40 x 120 мм, содержащих 20 мл питательной среды. Пересадку эксплантов проводили по мере необходимости, при этом учитывали следующие показатели: интенсивность роста эксплантов, формирование и развитие корневой системы.

Обсуждение результатов. Метод получения свободных от вирусов растений основывается на том, что по направлению к верхушке побега содержание вирусов в большом растении снижается. Апикальная меристема обычно свободна от вирусов. Собственно апикальная меристема представляет собой конус активно делящихся клеток высотой 0,2-0,4 мм [5, 6, 7]. Однако собственно меристему бывает трудно вычленить без повреждения, поэтому часто отделяли вместе с ней один-два листовых примordia.

Проведенные наблюдения показали, что на первом этапе выращивания (2 недели) часть меристем (40-60% в зависимости от сорта) начали некротизировать. Оставшиеся меристемы через месяц после посадки развились в микропобеги размерами 2-2,5 мм. Эти микропобеги повторно пересаживали на такую же по составу питательную среду. Пересадку производили в биологические пробирки.

Степень приживаемости апикальных меристем на этапе введения в культуру *in vitro* у группы столовых сортов (Августин, Восторг, Мускат итальянский, Ранний Магараца) находится в среднем на уровне 50 %, а у технических сортов (Подарок Магараца, Виорика, Ркацителли) – 40-45 % (табл.1). Гибель апикальных меристем в процессе культивирования, по-видимому, наступает за счет повреждения апикальных структур в процессе вычленения.

Таблица 1 – Приживаемость апикальных меристем на этапе введения в культуру *in vitro*

Сорт	Количество высаженных меристем, шт.	Инфицировано, шт.	Инфицированность, %	Погибло, шт.	Приживаемость	
					шт.	%
Августин	20	4	20,0	6	10	50,0
Молдова	20	5	25,0	4	11	55,0
Восторг	20	2	10,0	7	11	55,0
Мускат итальянский	20	2	10,0	6	12	60,0
Ранний Магараца	20	4	20,0	4	12	60,0
Подарок Магараца	20	5	25,0	6	9	45,0
Виорика	20	4	20,0	8	8	40,0
Ркацителли	20	8	40,0	4	8	40,0

Прижившиеся апикальные меристемы через месяц после посадки развились в микропобеги размерами 2-3 мм, которые были пересажены на питательную среду с содержанием тех же компонентов. Пересадку производили в биологические пробирки размером

40 x 120 мм, в течение 45-55 дней образовались регенеранты размерами 6-10 см. Далее эти микрорастения были расчеренкованы и получены микроклоны.

На этапе пересадки кластер-побегов приживаемость их достаточно высокая, которая колеблется в зависимости от сорта: 75% у сорта Ркацители и 90 % у сортов Молдова и Мускат итальянский (табл.2). Очень низок процент инфицированных побегов. По-видимому, здесь сыграл фактор стерилизации апикальных меристем при введении в культуру *in vitro*, а также пересадки растений в стерильных условиях (ламинар-боксах).

Таблица 2 – Приживаемость микропобегов и образование регенерантов растений

Сорт	Количество высаженных микропобегов, шт.	Инфицировано, шт.	Погибло, шт.	Приживаемость	
				шт.	%
Августин	10	0	2	8	80,0
Молдова	11	0	1	10	90,1
Восторг	11	0	2	9	81,8
Мускат итальянский	12	1	0	11	91,6
Ранний Магарача	12	0	2	10	83,3
Подарок Магарача	9	0	2	7	77,8
Виорика	8	0	1	7	87,5
Ркацители	8	2	0	6	75,0

В течение 55-60 дней образовались регенеранты растений размерами 6-10 см. Далее мы приступили к их клональному микроразмножению. Растения-регенеранты разрезали на фрагменты, включавшие узел с листом и почкой (нижняя часть междоузлия длиннее верхней на 1-2 см). Полученные микрочеренки высаживали в биологические пробирки (40x120 мм) на агаровую среду так, чтобы нижняя часть междоузлия была погружена в агар. Пробирки закрывали фольгой и помещали их в культуральную комнату с соответствующими методике условиями.

Резюмируя полученные результаты, следует отметить, что 50% приживаемости апикальных меристем дает возможность дальнейшего их культивирования и размножения, при котором возможно получение безвирусного посадочного материала. Дальнейшие исследования нами были проведены с одноглазковыми эксплантами, полученными из изолированных апикальных меристем.

Одним из важнейших и неотъемлемых компонентов питательной среды являются регуляторы роста. Их тщательный подбор и выявление оптимальных концентраций позволяют повысить эффективность метода клонального микроразмножения винограда.

Проведенные эксперименты показали, что регенерация побегов из изолированных апексов происходила при всех концентрациях 6-БАП, кроме добавки препарата в количестве 5,0 мг/л, когда верхушки сразу начинали чернеть и гнили. Микропобеги, выращиваемые на среде с концентрацией 0,1 мг/л 6-БАП, развивались очень медленно. Вероятно, это связано с тем, что такие низкие концентрации препарата слабо стимулируют процессы органогенеза растений.

Эффективное влияние 6-БАП оказал в диапазоне концентрации 0,5-1,0 мг/л. Тем не менее, следует отметить наибольший прирост микропобегов, который был зафиксирован в варианте с концентрацией 1,0 мг/л. Минимальная длина микропобега наблюдалась в вариантах с концентрациями 0,1, а при концентрации 5,0 мг/л вообще подавлялось развитие побега. Это свидетельствует о том, что низкая концентрация недостаточна для роста и развития микропобега, а во втором случае, наоборот, высокая концентрация препарата ингибирует развитие микропобегов (табл. 3).

Таблица 3 – Влияние 6-БАП на развитие одноглазковых черенков винограда *in vitro*, см

Сорта	Концентрация, мг/л					НСР ₀₅
	0,1	0,5	1,0	2,0	5,0	
Августин	4,8	10,2	12,1	8,2	0,0	1,96
Молдова	5,1	11,5	11,9	7,9	0,0	2,06
Восторг	5,0	9,9	10,6	7,2	0,0	1,84
Мускат итальянский	4,8	9,8	12,0	8,1	0,0	2,08
Ранний Магарача	5,1	11,6	11,9	8,4	0,0	1,86
Подарок Магарача	4,4	7,0	9,2	5,0	0,0	1,56
Виорика	4,6	8,2	11,5	5,8	0,0	2,18
Ркацител	4,9	9,1	11,8	6,1	0,0	2,35

Длительное выращивание эксплантов винограда на средах с повышенной концентрацией цитокининов вызывало торможение роста побегов. Побеги, пересаженные на среде укоренения, очень часто не образовывали корней и гибли. Поэтому перед этапом укоренения целесообразно ввести фазу удлинения побегов (элонгации).

Как показали эксперименты, для доведения побегов до длины, пригодной для укоренения (более 10 мм), достаточно было осуществить пересадку на среду с содержанием 6-БАП 0,1-0,5 мг/л. Применение такой концентрации 6-бензиламинопурина позволило уменьшить ингибирующее действие цитокининов, что привело к росту побегов. На такой среде побеги активно росли и через 14-15 дней достигали длины до 20 мм.

Для ускорения процесса удлинения побегов параллельно проводили изучение действия гибберелловой кислоты в различных концентрациях в сочетании с 6-БАП. Как показал опыт, при сочетании 0,5 мг/л 6-БАП + 1,0 мг/л ГК был достигнут наилучший результат.

Такое сочетание препаратов ускорило вытягивание стеблей у растений, и через две недели размер побегов достигал 25-26 мм. В других сочетаниях побеги намного уступали побегам, выращенным на среде с 6-БАП в концентрации 0,1 мг/л. Таким образом, проведенные нами эксперименты показали эффективное действие ГК и пониженной концентрации 6-БАП для удлинения побегов перед этапом укоренения.

Важнейшим моментом размножения растений *in vitro* является этап укоренения побегов. Именно в этот период необходимо обеспечить развитие нормальной корневой системы, после чего растения можно высаживать в почву, либо помещать на длительное хранение при пониженных температурах. Как известно, для стимуляции корнеобразования применяют ауксины. Учитывая это, нами был изучен характер действия регулятора роста ауксиновой природы с целью установления оптимальной концентрации использования препарата.

Вначале было испытано влияние на укоренение побегов винограда *in vitro* различных концентраций ИМК. Через 15 дней после применения наибольшее число корней образовалось в варианте опыта при концентрации ИМК 2,0 мг/л. В дальнейшем корнеобразование продолжалось, и через 30 дней количество корней увеличилось. Параллельно начался интенсивный рост растений, удлинялись черешки листьев, разрасталась листовая пластинка, вытягивался стебель (табл. 4).

Спустя месяц, количество укоренившихся побегов ни при одной концентрации ИМК не увеличилось, продолжался только рост центральных и частично боковых корней. Следует отметить, что к 30-му дню у многих растений винограда, при концентрации ИМК 5,0 мг/л наблюдалось почернение корней.

Таблица 4 – Влияние ИМК на развитие корней у одноглазковых черенков *in vitro* (n = 20)

ИМК, мг/л	Через 15 дней		Через 30 дней	
	Кол-во корней, шт.	Длина корней, мм	Кол-во корней, шт.	Длина корней, мм
Сорт Августин				
Среда без ИМК (контроль)	1,9	3,8	4,2	10,3
0,5	2,4	7,4	6,3	18,5
1,0	3,2	17,4	8,6	40,8
2,0	3,8	20,3	8,4	39,4
5,0	2,4	12,5	5,8	27,7
НСР ₀₅			1,94	
Сорт Подарок Магарача				
Среда без ИМК (контроль)	1,4	3,2	3,1	8,8
0,5	1,9	6,3	4,0	14,0
1,0	2,3	14,5	5,6	20,4
2,0	2,8	18,4	5,8	38,3
5,0	1,5	13,5	4,2	23,7
НСР ₀₅			1,46	

Выводы. Проведенные исследования показали возможность успешного размножения испытуемых сортов винограда методом культуры изолированных тканей и органов *in vitro*, что объясняется высокой потенциальной способностью винограда к вегетативному размножению вообще и к микроклональному в частности.

Раствор 2%-го гипохлорита натрия при экспозиции 10 мин. оказался более эффективным при стерилизации эксплантов винограда, что позволяло существенно снизить их зараженность.

Из испытанных регуляторов роста наиболее результативно регенерация побегов из изолированных апексов проходила при концентрации 6-БАП 0,5...1,0 мг/л. При массовом размножении побегов оптимальной оказалась концентрация 6-БАП 2 мг/л. Действие ГК в концентрации 1,0 мг/л в сочетании с 6-БАП 0,5 мг/л ускорило вытягивание стеблей у микрорастений.

Литература

1. Дорошенко, Н.П. Повышение регенерационной способности меристем при получении безвирусного материала винограда / Н.П. Дорошенко. – Виноград и вино России. – 1997. – №2. – С.6-9.
2. Литвак, А.И. Технология клонального микроразмножения винограда / А.И.Литвак, А.П. Кузьменко, Н.И. Гузун, Р.И. Минакова // Питомниководство – решающий фактор развития виноградарства. – Кишинев. – 1985. – С. 66-67.
3. Бургутин, А.Б. Быстрое клональное размножение виноградного растения / А.Б. Бургутин, Р.Г. Бутенко, Н.В. Катаева, П.Я. Голодрига // С.-х. биология. – 1983. – №7. – С. 48-50.
4. Бургутин А.Б. Микроклональное размножение винограда: перевод растения в почвенную культуру / А.Б. Бургутин // Биотехнология культивируемых клеток и биотехнология. – Междунар. конф.: Тез. докл. – Новосибирск. – 1988. – Т. 2. – 312 с.
5. Engelbrecht D.J., Schwerdtfeger U. *In vitro* grafting of grapevine shoot apices as an aid to the recovery of virus-free clones // Phytolactica. – 1979. – № 11. – P. 183-185.
6. Everent N.P., Wang T.L. Street H.E. Hormone regulation of cell growth and development *in vitro* // Frontiers of Plant Tissue Culture / University of Calgary. – 1978. – P. 307-316.
7. Garre M., Martin-Tanguy J., Mussillon P. La cultur de meristemes et la multilpication Végetative *in Vitro* au service de la pepiniere // Bulletin Petits Fruit. – 1979. – № 14. – P. 7-65.