

Ускоренное получение высококачественного посадочного материала винограда при помощи биотехнологии *in vitro*

Л.Г. Браткова, к.б.н., Н.Н. Цаценко, к.с.-х.н., А.Н. Малыхина, к.с.-х.н., М.Н. Мащенко, н.с., К.А. Макаров, мл.н.с., ФГБНУ Северо-Кавказский ФНАЦ

Важнейшее значение для устойчивого развития и повышения эффективности виноградарства в условиях рыночных отношений имеет интенсификация

отрасли виноградарства на основе инновационных научных разработок. В этой связи актуальной задачей остаётся оптимизация сортимента и формирования генофонда сортов винограда с высоким потенциалом качества и снижения себестоимости. Главная причина медленного внедрения новых сортов винограда и обновления виноградных на-

саждений заключается в дефиците высококачественного посадочного материала. Применение в производстве существующих методов размножения не обеспечивает спрос на посадочный материал в полном объёме. Кроме того, широко используемые методы не позволяют получать качественный (оздоровленный) посадочный материал. Для обновления и увеличения площади насаждений новыми перспективными сортами винограда необходимо усовершенствовать существующие и разработать новые приёмы эффективного и ускоренного производства качественного посадочного материала винограда.

Одним из наиболее эффективных методов получения оздоровлённого безвирусного посадочного материала винограда является метод, основанный на введении в стерильную культуру *in vitro* верхушечных меристем с последующим микрклональным размножением, обеспечивающим высокий коэффициент размножения [1–7]. Анализ литературных источников показывает, что использование технологии микрклонального размножения мериклонов винограда позволяет сократить сроки внедрения новых сортов в производство по сравнению с традиционными методами и ускорить переход растений от ювиальной к репродуктивной фазе развития. Данная технология даёт возможность проводить работы в течение года и сократить сроки размножения новых сортов по сравнению с традиционными методами в 4–5 раз. Кроме того, использование этого метода позволяет размножить растения, трудно размножаемые традиционными способами. Закладка промышленных виноградников оздоровлённым материалом позволяет продлить продуктивную эксплуатацию насаждений и повысить урожайность на 30–40%.

Цель исследования – разработка и усовершенствование современных методов и приёмов ускоренного размножения сортов и клонов винограда, оздоровлённых через меристемную культуру *in vitro*.

Материал и методы исследования. Исследование по оздоровлению винограда через культуру *in vitro*, совершенствование приёмов укоренения и адаптации проводили в течение восьми лет, с 2010 г. В итоге изучено влияние различных питательных сред и отдельных их компонентов на рост и развитие апикальных меристем. В культуру *in vitro* введено более 120 столовых, технических и аборигенных сортов. Создана лабораторная коллекция *in vitro* оздоровлённых сортов винограда. Установлено, что для успешного получения и размножения мериклонов винограда в качестве исходного материала для вычленения эффективно использовать почки молодых зелёных побегов с клоновых кустов в период активного роста (май) [1–3].

Операции по стерилизации и вычленению меристем осуществляются в ламинарных боксах. Используются меристематические экспланты малых размеров – от 100 до 75 микрон. Верхушки побегов

помещаются в марлевые узелки и опускаются на 45 сек. в стакан с 70-процентным этанолом. Затем на 12 мин. перекладываются в стакан с 7-процентным раствором гипохлорида натрия, после чего промываются в пяти стаканах с бидистиллированной водой, по 5 мин. в каждой.

Формирование мериклонов в культуре апикальной меристемы винограда проходит в четыре этапа: введение в культуру меристемы; пролиферация почек и побегов; удлинение побегов перед черенкованием; укоренение эксплантов.

Состав питательных сред меняется в процессе культивирования. Основными компонентами питательных сред выступают минеральные соли макро- и микроэлементов, сахара, витамины, ростовые вещества и различные органические добавки. За основу берётся среда Мурасиге и Скуга, модифицированная по содержанию минеральных солей, витаминов и стимуляторов роста (ауксины, цитокинины). В зависимости от этапа в качестве ингибитора фенольных соединений используется активированный уголь [3].

Результаты исследования. Этап собственного микрклонального размножения – наиболее ответственный для биотехнологического цикла культивирования. Экспланты культивируются в течение 4–5 недель при 16-часовом фотопериоде и температуре воздуха 22–25°C с 85-процентной влажностью на модифицированной твёрдой питательной среде. Она включает минеральные соли и витамины MS с 1/2 концентрацией неорганических солей, 1/2 содержанием F_c-хелата и агар-агара (5 мг/л), введением 0,1 мг/л ИУК и 1,5 мг/л БАП при pH = 5,8. Всего в культуру было введено более 30000 шт. меристем. Приживаемость и развитие меристем в среднем составляла от 0 до 85% в зависимости от сорта (рис. 1).



Рис. 1 – Развитие растений винограда из верхушечной меристемы

Следующий этап – пролиферация почек и побегов. На этом этапе добиваются получения их максимального количества. Лучшие результаты нами получены на среде М-2 по прописи

Н.И. Медведевой [6] с уменьшенным содержанием агар-агара (4,5–5,0 г/л). Через 12–14 дней экспланты формируют агрегаты из многочисленных почек и побегов (рис. 2).



Рис. 2 – Проплиферация почек и побегов

Приживаемость и дифференциация эксплантов на этом этапе значительно выше, чем в первом, и составила в среднем 83,4%. Изучаемые сорта показали высокий уровень пролиферации побегов и почек. Значительно повысить коэффициент размножения можно за счёт расчленения подросших агрегатов на части через каждые 14 дней, повторно помещая их на свежую среду этого же состава. Перед укоренением для получения большего числа микрочеренков последний пассаж агрегатов почек проводится на среде, способствующей удлинению побегов и увеличению глазков у растений. Лучшие результаты получены на среде, включающей 100 мл/л макроэлементов и 5,0 мл/л микроэлементов MS, 10,0 мл/л F_c-хелата, 100 мг/л мезоинозита, вит. В₁ и В₆ – 5,5 и 5,7 мг/л, 1,0 – БАП, 0,1 – ИУК, Na₂HPO₄ – 170,0 мг/л, CaCl₂ – 332 мг/л, сахарозы – 30,0 г/л, агар-агара – 5,0 г/л Агрегаты из побегов и почек извлекают из пробирок, расчленяют на 20–40 и более частей и пересаживают на питательную среду для удлинения побегов (рис. 3).

Через 4–5 недель число междоузлий составляло 7–10 шт. на одном мериклоне (рис. 4).

На коэффициент размножения оказывают влияние и генотипические особенности сорта. Это нужно учитывать при планировании объёма работ.

После получения нужного количества микропобегов наступает этап их укоренения, от которого зависит успех клонального размножения. На этом этапе уменьшают в 2, а иногда в 4 раза (в зависимости от сорта), концентрацию минеральных солей, количество сахара, полностью исключают цитокинины, оставляя ауксины. Хорошо укореняются микрочеренки размером 1,5–2,0 см с хорошо выполненным листочком. Первые корешки появляются через 7–10 дней. Через 3–4 недели растения уже готовы к пересадке для адаптации *in vivo* (рис. 5).

Общий период выращивания оздоровлённого пробирочного растения винограда от меристемы до высадки в почву в среднем составляет 334 дня (табл.).



Рис. 3 – Расчленение и пересадка агрегатов почек и побегов на питательную среду для вытягивания



Рис. 4 – Развитие побегов винограда на среде для вытягивания побегов через 4 недели

Период развития сортов винограда от меристемы до высадки в почву

Сорт	Продолжительность, дн.
Виктор	392
Заграва	300
Италия	418
Кодрянка	286
Монарх	332
Надежда АЗОС	342
Памяти Негруля	290
Преображение	299
Суперэкстра	388
Юбилей Новочеркаска	294
Среднее:	334

Критическим этапом для растений, выращенных биотехнологическими методами на питательных средах, является их адаптация к нестерильным условиям. Это связано с отсутствием на листовых пластинках пробирочных растений винограда эпикутикулярного слоя воска и подверженностью их к очень быстрому обезвоживанию.

Для адаптации отбирались мериклоны, имеющие 5–6 междоузлий с 2–3 корнями длиной



Рис. 5 – Укоренённые микрочеренки винограда

2,0–3,5 см, 3–5 листочков и открывали их на срок от 7 до 14 дней (рис. 6).

Результаты исследования показали, что адаптация пробирочных растений заканчивается на 7–9-й день при появлении нового листа. Большой её срок приводит к перерастанию растений, что плохо сказывается на дальнейшем их укоренении в кубиках. Через 7–9 дней растения готовы к пересадке в условия *in vivo* для доращивания в минераловатных кубиках.

Выводы. Представленная усовершенствованная технология ускоренного размножения *in vitro* высококачественного посадочного материала винограда способствует улучшению количественно-качественных параметров относительно существующих традиционных способов размножения и имеет ряд преимуществ: высокий коэффициент размножения (10^5 – 10^8); сокращение сроков размножения новых сортов по сравнению с традиционными методами; возможность продления продуктивной эксплуатации промышленных насаждений виноградников с увеличением урожайности; выращивание саженцев с закрытой корневой системой (контейнерная культура) на искусственных субстратах – грунтозаменителях, что позволяет производить посадку зелёных черенков и пробирочных растений в любое время года и др.

В результате проведённого многолетнего исследования нами были введены в культуру *in vitro*

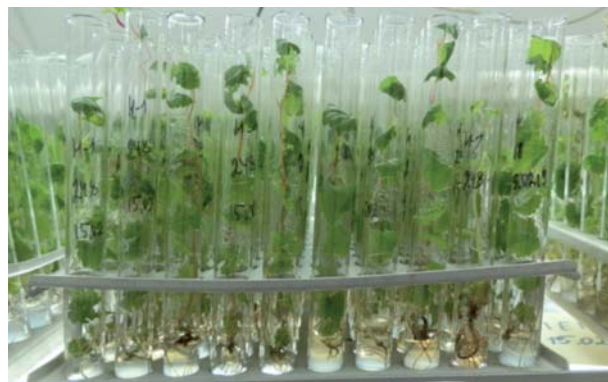


Рис. 6 – Этап адаптации пробирочных растений

более 120 столовых, технических и аборигенных сортов винограда. Оптимизированы питательные среды для всех этапов получения мериклонов и их размножения, подобраны режимы культивирования оздоровлённых пробирочных растений винограда и режимы их адаптации к условиям *in vivo* с последующим доращиванием в кубиках и дальнейшим выращиванием в открытом грунте.

Литература

1. Методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда / П.Я. Голодрига, В.А. Зленко, Л.А. Чекарёв [и др.]. Ялта, 1986. 56 с.
2. Дорошенко Н.П. Повышение регенерационной способности меристем при оздоровлении винограда от вирусной инфекции // Перспективы внедрения современных биотехнологических разработок для повышения эффективности сельскохозяйственного производства: матер. регион. конференции. Ставрополь, 2000. 72 с.
3. Научно обоснованное получение оздоровлённого посадочного материала ценных аборигенных и перспективных сортов винограда с использованием современных биотехнологий: методич. рекомендации / А.А. Куценко В.В., Кулинцев, Л.Г. Браткова [и др.]. Михайловск, 2011. 20 с.
4. Браткова Л.Г., Малыгина А.Н., Цаенко Н.Н. Приёмы адаптации мериклонов винограда к условиям *in vivo* // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2015. № 34 (04). С. 1–16.
5. Бургутин А.Б. Микроклональное размножение винограда // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений: сб. ст. под ред. Р.Г. Бутенко М.: Наука, 1991. С. 216–220.
6. Медведева Н.И., Поливарова Н.В., Трошин Л.П. Методические рекомендации по микроклональному размножению винограда *in vitro* // Научный журнал Кубанского ГАУ. 2010. № 62 (08). С. 314–326.
7. Упальшев М.Т. Вирусные болезни и современные методы оздоровления плодовых и ягодных культур: автореф. дисс. ... докт. с.-х. наук. М., 2011. 47 с.