

УДК 634.8.037:581.143

03.00.00 Биологические науки

**ВВЕДЕНИЕ НОВЫХ СОРТОВ ВИНОГРАДА
В КУЛЬТУРУ *IN VITRO***

Бунцевич Леонид Леонтьевич
канд. биол. наук

Костюк Марина Александровна
мл. научный сотрудник
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства ФАНО России, Краснодар, Россия

Трошин Леонид Петрович
доктор биол. наук, профессор

Алзубайди Хайдар Клиль Ибрахим
магистрант
Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар, Россия

Клональное микроразмножение – это основной способ получения качественного безвирусного посадочного материала. Высокая сортовая специфичность реакции эксплантов сортов винограда на состав питательной среды требует индивидуального подбора компонентов среды для наиболее успешного размножения *in vitro*. В статье представлены результаты исследований по культивированию апексов винограда *in vitro* на модифицированной среде с пониженным содержанием макроэлементов. В результате проведенных исследований установили, что для сортов винограда Академик Трубилин, Артемис, Гурман Крайнова, Мария Каллас, Низина, Пти Вердо и Траминер черный наиболее эффективная интродукция в культуру *in vitro* (приживаемость апексов 80-100%) происходит на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга (1962), отличающейся содержанием макросолей (мг/л): NH_4NO_3 – 1237; KNO_3 – 1425; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 277,5; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 277,5, витамина В₁ – 10,0 мг/л, никотиновой кислоты – 4 мг/л. Остальные сорта Кишмиш лучистый, Преображение, Рошфор К и Юбилей Новочеркаска на аналогичной среде развивались замедленно и по другому

Ключевые слова: ВИНОГРАД, *IN VITRO*, АПЕКСЫ, ЭКСПЛАНТЫ, ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА

UDC 634.8.037:581.143

Biology

INTRODUCTION OF NEW GRAPES VARIETIES TO THE *IN VITRO* CULTURE

Buntsevich Leonid Leontievich
Cand.Biol.Sci.

Kostyuk Marina Aleksandrovna
Junior Research Associate
Federal State scientific organization North Caucasian Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture of FANO of Russia, Krasnodar, Russia

Troshin Leonid Petrovich
Dr.Sci.Biol., professor

Alzubaidy Haidar Khleel Ibraheem
Master student
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

Clonal micro-multiplication – is this the basic method of obtaining the qualitative virus-free planting material. The high quality specificity of the explants reaction of the grapes varieties to the composition of nutrient medium requires the individual selection of the medium components for the most successful multiplication *in vitro*. In the article we present the results of studies on the cultivation of the grapes apexes *in vitro* the modified medium with the reduced content of macrocells. As a result of conducted investigations we have established that for the grapes varieties of Academic Trubilin, Artemis, Gurman Kraynova, Maria Kallas, Nizina, Petit Verdo and Traminer Black the most effective introduction into the *in vitro* culture (acclimatization of apexes 80-100%) occurs on modified nutrient medium to Murasige and Skoog (1962), by being differed in terms of the content macro-elements (mG/l): NH_4NO_3 – 1237; KNO_3 – 1425; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{N}_2\text{O}$ – 277,5; $\text{KN}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 277,5, of the vitamin Of v1 – 10,0 mG/l, nicotinic acid – 4 mG/l. Remaining varieties of Kishmish luchistiy, Preobrajenie, Roshfor K and Yubiley Novoчеркаска in the same medium were developed slowly and in a different way

Keywords: GRAPES, CULTURE *IN VITRO*, APEXES, EXPLANTES, MEDIUM

Введение. Виноградарство является одним из ведущих направлений агропромышленного комплекса Краснодарского края. В Российской Федерации виноград возделывается на площади 84,5 тыс. га, из которых 25,9 тыс. га – более трети - находятся в Краснодарском крае. В результате порядка половины винограда, производимого в Российской Федерации, за счет более высокой урожайности выращивается на Кубани [1, 2].

В успешности виноградарства решающее значение имеют такие показатели, как приживаемость саженцев, долговечность, продуктивность, состояние растений и качество продукции, которые, в свою очередь, зависят от качества посадочного материала [3]. Рядовые растения винограда инфицированы различными вирусными и фитоплазменными заболеваниями. Известно, что потери урожайности от вирусов могут достигать 50-80 %. Чтобы исключить распространение вредоносных болезней при закладке насаждений, следует использовать сертифицированные саженцы. Для производства сертифицированных саженцев используется базисный (базовый) посадочный материал, свободный от вирусных, бактериальных и других заболеваний. Основным способом получения качественного безвирусного посадочного материала на сегодняшний день является оздоровление растений меристемным методом *in vitro* [4-6]. Одна из важнейших особенностей работы с культурой *in vitro* заключается в сортовой специфичности реакции эксплантов винограда на состав питательной среды: практически для каждого сорта требуется индивидуальный подбор компонентов среды (макро- и микроэлементов, стимуляторов роста и пр.).

Цель исследования – определить сортовую реакцию винограда при интродукции эксплантов экспериментальных сортов *in vitro* на модифицированную питательную среду.

Объекты и методы исследований. Для снижения возможных соматоклональных изменений, часто происходящих при размножении *in vitro* эксплантов из боковых почек [7], в культуру *in vitro* вводились централь-

ные апексы. В качестве исходного материала использованы зеленые побеги 11 сортов винограда длиной около 10 см, выращенные путем выгонки в лабораторных условиях.

Подготовка материала и стерилизация: промывка апексов в проточной воде 3 часа (в качестве стерилизующего раствора использовалась сулема - 0,1 % в экспозиции 30 секунд), двукратная промывка апексов в стерильной дистиллированной воде.

Апексы вычленили в асептических условиях в ламинарных боксах марки ВЛ-12 и переносились на питательную среду. Для введения в культуру *in vitro* была выбрана стандартная среда по прописи Мурасиге и Скуга (1962) и модифицированная среда (М1) Медведевой Н.И. и др., ранее применявшаяся на иных сортах винограда [8]. В модифицированной среде М1 содержание солей NH_4NO_3 , KNO_3 и $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ на 25 % ниже, чем в стандартной, а $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ на 38,7 % выше. Многократно увеличено содержание витамина B_1 , с 0,5 мг/л в стандартной среде до 10 мг/л в модифицированной, а также витамина РР с 0,5 мг/л до 4 мг/л, мезоинозита больше на 25 мг/л, витамин B_6 в модифицированную среду не вводился. Среда М1 отличается более мягкой консистенцией за счет уменьшения количества агар-агара на 1 г/л (табл. 1).

Экспланты культивировали в пенициллиновых пробирках при температуре + 24-25°C и освещении 5 тыс. люкс при 16-ти часовом фотопериоде.

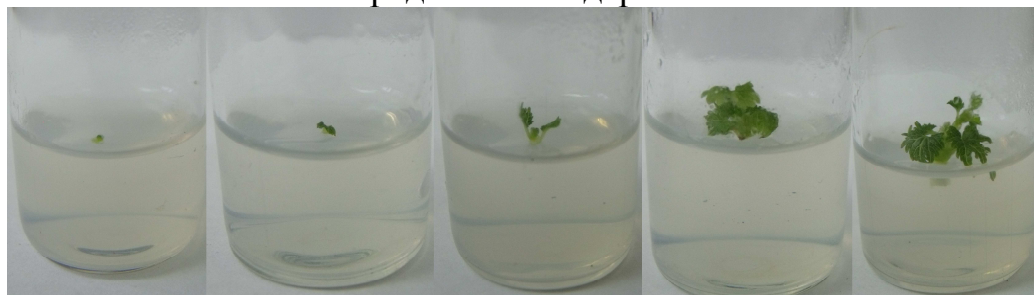
Таблица 1. – Состав изучаемых питательных сред

Элементы среды	Состав среды	
	МС стандартная (мг/л)	M1 (мг/л)
Макроэлементы	NH ₄ NO ₃ – 1650; KNO ₃ – 1900; MgSO ₄ · 7H ₂ O – 370; KH ₂ PO ₄ · H ₂ O – 170; CaCl ₂ – 440	NH ₄ NO ₃ – 1237; KNO ₃ – 1425; MgSO ₄ · 7H ₂ O – 277,5; KH ₂ PO ₄ · H ₂ O – 277,5; CaCl ₂ – 440
Микроэлементы	H ₃ BO ₃ – 6,2; MnSO ₄ · 4H ₂ O – 24,1; ZnSO ₄ · 7 H ₂ O – 8,6; KJ - 0,83; Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O – 0,25; CuSO ₄ · 5H ₂ O – 0,025; CoCl ₂ · 5H ₂ O – 0,025	H ₃ BO ₃ – 6,2; MnSO ₄ · 4H ₂ O – 22,3; ZnSO ₄ · 7 H ₂ O – 8,6; KJ - 0,83; Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O – 0,25; CuSO ₄ · 5H ₂ O – 0,025; CoCl ₂ · 5H ₂ O – 0,025
Fe-хелат	FeSO ₄ · 7H ₂ O – 27,8; Na ₂ – ЭДТА – 37,3	FeSO ₄ · 7H ₂ O – 13,9; Na ₂ – ЭДТА – 16,8
Витамины	B ₁ , B ₆ , PP – 0,5; глицин – 10; мезоинозит – 75;	B ₁ - 10; PP – 4; глицин – 10; мезоинозит – 100;
Фитогормоны	6-БАП – 1,0	6-БАП – 1,0
Сахара	сахароза – 30 г/л	сахароза – 30 г/л
Агар-агар	7 г/л	6 г/л

Обсуждение результатов. В ходе исследований проводилась оценка эффективности применения модифицированной среды M1 на этапе интродукции эксплантов винограда в культуру *in vitro*. Эффективность оценивали по приживаемости и степени развития эксплантов (рис. 1, табл. 2).



Среда MS стандартная



Среда M1

Рисунок 1 – Развитие растений винограда сорта Артемис на изучаемых питательных средах

Таблица 2. – Результаты интродукции апексов экспериментальных сортов винограда в культуру *in vitro*

№ п/п	Сорт	МС стандартная			М1		
		посажено, шт.	прижилось, шт.	%	посажено, шт.	прижилось, шт.	%
1	Кишмиш лучистый	36	15	41,7	45	17	37,8
2	Юбилей Новочеркаска	42	18	42,9	50	13	26
3	Траминер черный	33	17	51,5	108	92	85,2
4	Мария Каллас	25	20	80	45	39	86,7
5	Артемис	20	15	75	19	19	100
6	Пти Вердо	30	21	70	56	55	98,2
7	Академик Трубилин	15	10	66,7	13	11	84,6
8	Преображение	10	5	50	10	6	60
9	Низина	15	8	53,3	15	13	86,7
10	Рошфор	15	6	40	14	7	50,0
11	Гурман Крайнова	15	9	60	15	12	80

В результате исследований у большинства сортов винограда была отмечена высокая приживаемость эксплантов на модифицированной среде М1. Из таблицы 2 видно, что высокая приживаемость эксплантов на среде М1 отмечается у сортов Артемис - 100 %, Пти Вердо - 98,2 %, у сортов Траминер черный, Мария Каллас, Академик Трубилин, Низина и Гурман Крайнова - в пределах 80-86,7 %. Начало развития апексов отмечалось на 5-7 день после интродукции. У сорта Мария Каллас высокая приживаемость отмечена на обеих средах, на стандартной среде - 80 %, на модифицированной среде М1 – 86,7 %. У сортов Артемис, Пти Вердо, Академик Трубилин и Гурман Крайнова приживаемость на стандартной среде колеблется от 60 до 75 %, что на 20 – 30 % ниже, чем на

модифицированной среде. Самый низкий процент живых эксплантов как на стандартной среде, так и на М1 отмечался у сортов Рошфор К, Кишмиш лучистый и Юбилей Новочеркаска. При этом у сортов Кишмиш лучистый и Юбилей Новочеркаска низкая приживаемость отмечалась на среде М1 - 37,8 и 26 % соответственно. Установлено, что на модифицированной среде М1 экспланты всех сортов винограда, кроме сортов Кишмиш лучистый и Юбилей Новочеркаска, развивались быстрее, имели более интенсивную зеленую окраску, мощный стебель и крупнее листья.

Заключение. В результате проведенных исследований пришли к заключению, что для эффективной интродукции в культуру *in vitro* (приживаемость апексов 80-100 %) сортов винограда Артемис, Пти Вердо, Траминер черный, Мария Каллас, Академик Трубилин, Низина и Гурман Крайнова следует использовать модифицированную питательную среду Мурасиге и Скуга (1962) с пониженным содержанием макроэлементов (мг/л): NH_4NO_3 – 1237; KNO_3 – 1425; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 277,5; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 277,5; B_1 – 10,0 мг/л, никотиновая кислота – 4 мг/л. Для сортов Кишмиш лучистый и Юбилей Новочеркаска как среда модифицированная, так и стандартная среда MS не показали высокой эффективности при введении эксплантов в культуру *in vitro*.

Литература

1. Трошин, Л.П. Ампелография с основами селекции винограда. - Краснодар: КубГАУ, 2016. – 172 с.
2. Трошин, Л.П. Ампелографическая и селекционная научно-исследовательская работа Кубанского госагроуниверситета / Л.П. Трошин // Научный журнал КубГАУ [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ, 2012. – № 81 (07). – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2012/07/pdf/39.pdf>.

3. Малтабар, Л.М. Виноградное питомниководство по-новому // Виноград и вино России, 1998. – Специальный выпуск. – С. 35-43.
4. Дорошенко, Н.П. Особенности клонального микроразмножения винограда / Н.П. Дорошенко. – Новочеркасск: Изд-во ФГБНУ ВНИИВиВ Я.И. Потапенко, 2014. – 204 с.
5. Дорошенко Н.П. Физиологическое обоснование применения препарата Эмистим при клональном микроразмножении винограда / Н.П. Дорошенко // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ) [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ, 2010. – №04(058). С. 498 – 510. – Шифр Информрегистра: 0421000012\0076, IDA [article ID]: 0581004032. – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2010/04/pdf/32.pdf>, 0,812 у.п.л.
6. Бунцевич Л.Л. Вирусные и вирусоподобные болезни плодовых культур и оздоровление растений способом клонального микроразмножения *in vitro* / Л.Л. Бунцевич, М.В. Захарова, М.А. Костюк, Ю.П. Данилюк, Р.С. Захарченко // В сборнике: Проблемы интенсивного садоводства. - Краснодар, 2010. - С. 191-193.
7. Vanilas, G. Rapid micropropagation of grapevine (cv. Agiorgitiko) through lateral bud development / G. Vanilas, E. Korkas // E. J. Sci. Tech. – 2007. - V. 2. - P. 31-38.
8. Медведева Н.И. Методические рекомендации по микроразмножению винограда *in vitro* / Н.И. Медведева, Н.В. Поливар, Л.П. Трошин // Научный журнал КубГАУ [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ, 2010. – №08(62). – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2010/08/pdf/31.pdf>.

REFERENCES

1. Troshin, L.P. Ampelografia s osnovami selektsii vinograda. - Krasnodar: KubGAU, 2016. – 172 s.
2. Troshin, L.P. Ampelograficheskaya i selektsionnaya nauchno-issledovatel'skaya rabota Kubanskogo gosagrouniversiteta / L.P. Troshin // Nauchnyi zhurnal KubGAU [Elektronnyi resurs]. – Krasnodar: KubGAU, 2012. – № 81 (07). – Rezhim dostupa: <http://ej.kubagro.ru/2012/07/pdf/39.pdf>.
3. Maltabar, L.M. Vinogradnoe pitomnikovodstvo po-novomu // Vinograd I vino Rossii, 1998. – Spetsial'nyi vypusk. – S. 35-43.

4. Doroshenko, N.P. Osobennosti klonal'nogo mikrorazmnozheniya vinograda / N.P. Doroshenko. – Novocherkassk: Izd-vo FGBNU VNIIViV im. Ya.I. Potapenko, 2014. – 204 s.
5. Doroshenko, N.P. Fiziologicheskoe obosnovanie primeneniya preparata Emistim pri klonal'nom mikrorazmnozhenii vinograda / N.P. Doroshenko // Nauchnyi zhurnal KubGAU [Elektronnyi resurs]. – Krasnodar: KubGAU, 2010. – №04(058). S. 498 – 510. – Shifr Informregistra: 0421000012\0076, IDA [article ID]: 0581004032. – Rezhim dostupa: <http://ej.kubagro.ru/2010/04/pdf/32.pdf>, 0,812 u.p.l.
6. Buntsevich L.L. Virusnye i virusopodobnye bolezni plodovyh kul'tur i ozdorovlenie rastenii sposobom klonal'nogo mikrorazmnozheniya *in vitro* / L.L. Buntsevich, M.V. Zaharova, M.A. Kostyuk, Ju.P. Danilyuk, R.S. Zaharchenko // V sbornike: Problemy intensivnogo sadovodstva. - Krasnodar, 2010. - S. 191-193.
7. Banilas, G. Rapid micropropagation of grapevine (cv. Agiorgitiko) through lateral bud development / G. Banilas, E. Korkas // E. J. Sci. Tech. – 2007. - V. 2. - P. 31-38.
8. Medvedeva N.I. Metodicheskie rekomendatsii po mikroklonal'nomu razmnozheniyu vinograda *in vitro* / N.I. Medvedeva, N.V. Polivara, L.P. Troshin // Nauchnyi zhurnal KubGAU [Elektronnyi resurs]. – Krasnodar: KubGAU, 2010. – №08(62). – Rezhim dostupa: <http://ej.kubagro.ru/2010/08/pdf/31.pdf>.