Научная статья/Research Article
УДК 634.8.03
DOI: 10.36718/1819-4036-2024-2-30-35

Ольга Леонидовна Сегет
Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, Краснодар, Россия
olya.yakovtseva@mail.ru

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ВВЕДЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ ВИНОГРАДА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Цель исследований – совершенствование технологии клонального микроразмножения путем подбора эффективного стерилизующего вещества и модифицирования питательных сред, используемых для выращивания сортообразцов винограда в условиях in vitro. Объекты – технические сорта винограда Гранатовый, Достойный и Красностоп АЗОС. Экспериментальный опыт проводился на базе селекционно-биотехнологической лаборатории СКФНЦСВВ, г. Краснодар, 2020–2022 гг. В качестве исходных эксплантов в культуре in vitro использованы мерисистемы генотипов винограда размером 0,3–0,5 мм. Методы исследований – общепринятые в практике клонального микроразмножения растений: стерилизация исходного материала, введение в культуру, собственно клональное микроразмножение, укоренение in vitro с последующей адаптацией к условиям in vivo. Наиболее эффективным способом стерилизации из рассматриваемых веществ оказалось погружение эксплантов винограда в хлорсодержащий раствор (50 %). Доля асептических жизнеспособных эксплантов составила 53 %. Установлено, что наилучшей средой для развития генотипов винограда является модифицированная питательная среда по прописи А.Н. Реброва Приживаемость микрорастений на модифицированной среде по прописи А.Н. Реброва с добавлением регуляторов роста 1,0 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л ИУК составила для сорта Гранатовый – 29,4 %, Достойный – 31,2 и Красностоп АЗОС – 41,5 %.

Ключевые слова: *виноград, in vitro, меристема, стерилизация, питательные среды, биопотенциал*

Для цитирования*: Сегет О.Л.* Совершенствование технологии введения и культивирования изолированных тканей растений винограда в условиях *in vitro* // Вестник КрасГАУ. 2024. № 2. С. 30–35. DOI: 10.36718/1819-4036-2024-2-30-35.

Olga Leonidovna Seget
North Caucasus Federal Scientific Center for Horticulture, Viticulture, Winemaking, Krasnodar, Russia
olya.yakovtseva@mail.ru

IMPROVEMENT OF INTRODUCTION AND CULTIVATION TECHNOLOGY OF ISOLATED TISSUES OF GRAPE PLANTS UNDER *IN VITRO* CONDITIONS

The purpose of research is to improve the technology of clonal micropropagation by selecting an effective sterilizing substance and modifying the nutrient media used for growing grape varieties in vitro. Objects: technical grape varieties Granatovyj, Dostojnyj and Krasnostop AZOS. The experiment was carried out on the basis of the selection and biotechnological laboratory of the SKFNTsSVV, Krasnodar, 2020–2022. Merisystems of grape genotypes measuring 0.3–0.5 mm in size were used as initial explants in in vitro culture. Research methods are generally accepted in the practice of clonal micropropagation of plants: sterilization of the starting material, introduction into culture, clonal micropropagation itself, in vitro rooting with subsequent adaptation to in vivo conditions. The most effective method of sterilization of the

© Сегет О.Л., 2024
Вестник КрасГАУ. 2024. № 2. С. 30–35.
Bulliten KrasSAU. 2024;(2):30–35.

substances under consideration turned out to be immersion of grape explants in a chlorine-containing solution (50 %). The proportion of aseptic viable explants was 53 %. It has been established that the best medium for the development of grape genotypes is a modified nutrient medium according to A.N. Rebrov's prescription. Survival of microplants on a modified medium according to A.N. Rebrov with the addition of growth regulators 1.0 mg/l 6-BAP + 0.5 mg/l IAA was 29.4 % for the variety Granatovyj, 31.2 % for Dostojnyj and 41.5 % for Krasnostop AZOS.

***Keywords**: grapes, in vitro, meristem, sterilization, nutrient media, biopotential*

***For citation:** Seget O.L.* Improvement of introduction and cultivation technology of isolated tissues of grape plants under *in vitro* conditions // Bulliten KrasSAU. 2024;(2): 30–35. (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2024-2-30-35.

Введение. Для увеличения срока эксплуатации виноградных насаждений необходим переход к их закладке сертифицированным посадочным материалом [1].

Микроклональное размножение является одним из современных способов репродуцирования растений в культуре тканей и клеток [2]. Полученные растения *in vitro* генетически идентичны исходному экземпляру. При использовании данного способа происходит освобождение тканей микропобегов от возбудителей многих заболеваний, снижающих урожайность виноградных насаждений до 30–80 % и продолжительность эксплуатации в 1,5–2 раза [3].

Процесс размножения *in vitro* состоит из следующих методических этапов: интернирование эксплантов и их обеззараживание, обособление апекса, индукция адвентивного побегообразования, укоренение побегов, получение пробирочных растений и их размножение, высадка растений-регенератов в почвенный субстрат.

Получение оздоровленных методом *in vitro* растений связано с оптимизацией условий их культивирования на каждом этапе [4, 5]. К резкому снижению скорости роста и размножения, а также к ухудшению физиологического состояния регенерантов приводят даже небольшие отклонения от оптимума [6, 7].

Одним из важных условий при работе с культурой изолированных тканей является соблюдение строгой стерильности [8]. Питательная среда – хороший субстрат для развития микроорганизмов. Изолированные от растения апексы, которые высаживаются на питательную среду, легко поражаются микроорганизмами [9]. Для этого, чтобы предотвратить заражения апексов сортообразцов растений, необходимо проводить как стерилизацию эксплантов, так и самой питательной среды, на которой будут культивироваться апексы [10–12].

Результативность клонального микроразмножения, как отмечают ряд авторов научных исследований, в значительной степени определяется правильным выбором питательных сред, так как состав среды является важнейшим фактором для эффективного морфогенеза и дальнейшего успешного развития первичных эксплантов. Детализированный состав питательных сред, отработанный для одних сортообразцов, в полной мере не может соответствовать для других [13–15].

Таким образом, эффективность микроклонального размножения зависит от многих факторов: морфогенетического потенциала размножаемого растения, стерилизующих веществ при введении в *in vitro*, от размера, вырезаемого меристемного апекса, состава питательной среды, влажности и температуры на различных этапах, укоренения микрорастений, адаптации винограда к условиям *in vivo.* Для этого важное значение приобретает изучение того или иного фактора на каждом этапе культивирования микрорастений.

Цель исследований – совершенствование некоторых элементов технологии микроклонального размножения винограда *in vitro* путем подбора эффективного стерилизующего вещества для вводимых эксплантов и оптимально-приемлемого состава питательной среды для получения безвирусных клонов с целью производства здорового посадочного материала винограда.

Объекты и методы. Объекты – технические сорта винограда Гранатовый (Vitis Vin.), Достойный (Vitis Vin.) и Красностоп АЗОС (Vitis Lab.). Опыт проводился на базе селекционно-биотехнологической лаборатории СКФНЦСВВ, г. Краснодар, 2020–2022 гг. В качестве исходных эксплантов в культуре *in vitro* использованы меристемы генотипов винограда размером 0,3–0,5 мм. Для стерилизации эксплантов примене-

ны: этиловый спирт (70 %), пероксид водорода (3 %), дезинфицирующие таблетки ОКА-ТАБ, содержащие 50 % активного хлора (обработка 0,5 %-м раствором в течение 5 минут с 3-кратной промывкой дистиллированной водой). Для введения сортообразцов винограда *in vitro* использованы среды – Murasige-Skuga (MS – контроль) (Тимофеева С.Н., Смолькина Ю.В. и др. Технологии микроразмножения *in vitro*: учеб.-метод. пособие. Саратов, 2016; Реброва А.Н. Патент № 2636030. Питательная среда для ввода и регенерации меристем винограда в условиях *in vitro*, 17.11.2017). Закладку опытов проводили в трехкратной повторности, в одной повторности 30 пробирок. Наблюдения в опытах проводились по общепринятым в биотехнологии методикам П.Я. Голодрига (1986), Н.П. Дорошенко (2012).

Результаты и их обсуждение. Наиболее действенным стерилизатором из экспериментальных веществ оказалось погружение эксплантов винограда в хлорсодержащий раствор (таблетки ОКА-ТАБ, 50 % активного хлора). Доля асептических жизнеспособных эксплантов составила 53 %. Применение этилового спирта, пероксида водорода характеризуется меньшим процентом выживаемости эксплантов растений винограда ввиду недостаточно эффективной стерилизации (рис. 1).

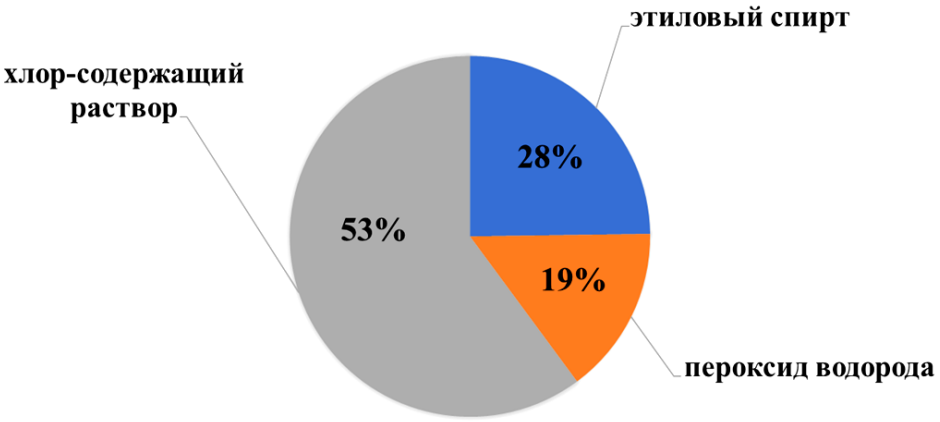

Рис. 1. Доля эксплантов, % асептических жизнеспособных эксплантов

Прошедшие стерилизацию фрагменты растений высаживали в пробирки на питательные среды, приготовленные по прописи Murasige-Skuga (MS) и модифицированные по прописи А.Н. Реброва. Результаты культивирования первичных эксплантов в течение 18 дней в беспересадочной культуре показали, что повышенная регенерационная активность меристем винограда наблюдалась на экспериментальной среде по прописи А.Н. Реброва (рис. 2).

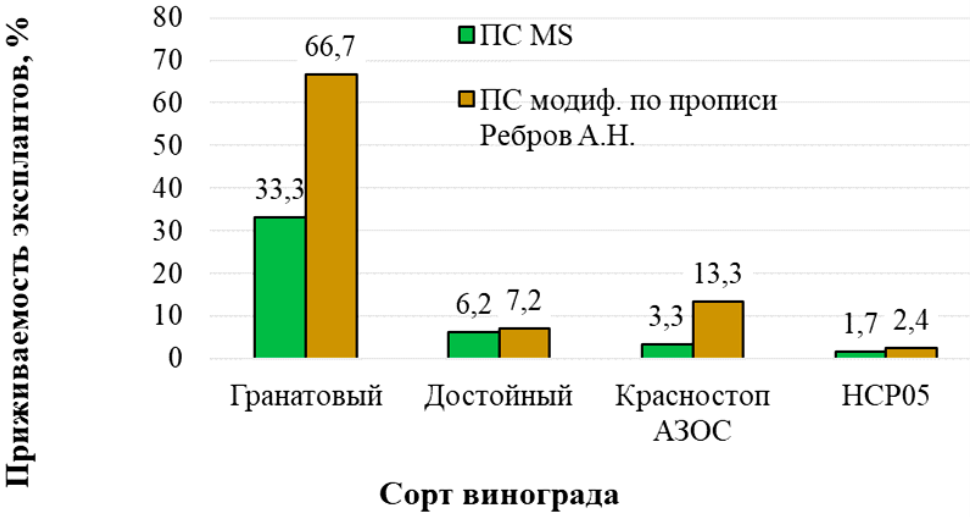

Рис. 2. Приживаемость меристем селекционно-ценных генотипов в культуре in vitro

Сравнение регенерационной активности изучаемых генотипов винограда показало, что приживаемость эксплантов сортов Гранатовый и Красностоп АЗОС была выше на модифицированной среде по прописи А.Н. Реброва, чем в контроле, на 33,4 и 10 %. Адаптированность меристем сорта Достойный к контрольной и модифицированной среде не показало существенного различия и составила всего 1,0 %.

Для изучения влияния регуляторов роста на укоренение, рост и развитие растений винограда *in vitro* на модифицированной среде по прописи А.Н. Реброва были использованы два варианта сочетания 6-БАП и ИУК, в качестве контроля использована среда с содержанием 6-БАП-1 мг/л (рис. 3).

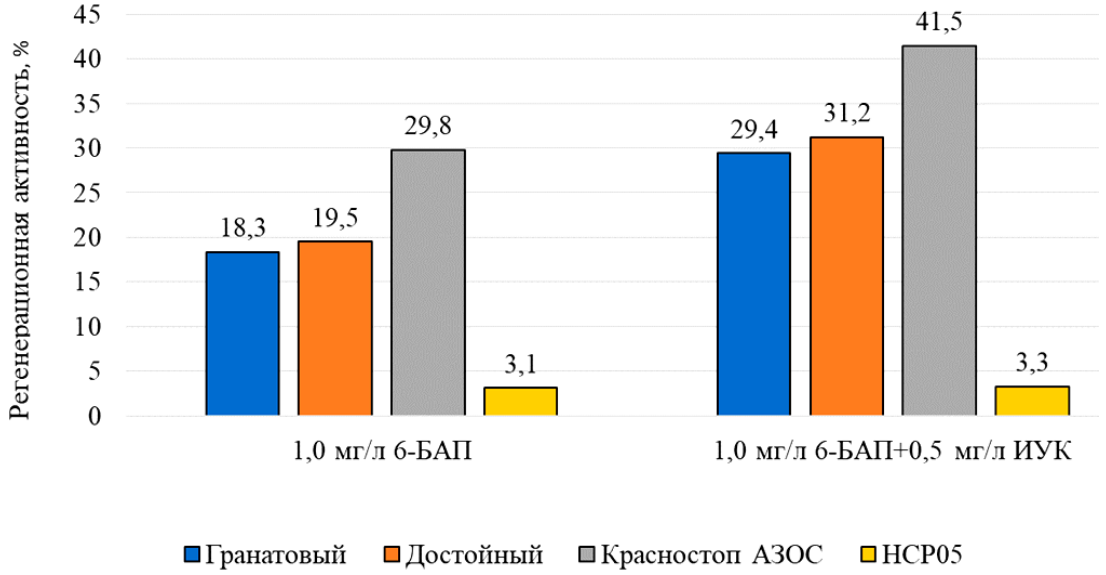

Рис. 3. Регенерация сортов винограда на модифицированной среде по прописи А.Н. Реброва с различным содержанием регуляторов роста (через 30 дней культивирования)

На основании полученных данных учетов и наблюдений было отмечено, что лучшее развитие генотипов отмечалось на исследуемой среде, содержащей 1,0 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л ИУК. Приживаемость микрорастений сортов Гранатовый, Достойный, Красностоп АЗОС была выше на 11,1 и 11,7 %, чем в контроле, и составляла 29,4 %, 31,2 и 41,5 %. В контрольном варианте – среда с содержанием 6-БАП-1 мг/л, регенерация исследуемых сортов составила 18,3 %, 19,5 и 29,8 %.

В ходе наблюдений была выявлена закономерность, что развитие пробирочных растений происходит не линейно и зависит от следующих факторов: периода развития и сортовой специфики.

Заключение. На этапе введения в культуру *in vitro* винограда наиболее эффективный стерилизующий агент – таблетки ОКА-ТАБ (50 % активного хлора). Доля асептических жизнеспособных эксплантов составила 53 %.

Оптимизирован компонентный состав питательной среды для выращивания сортов винограда Гранатовый, Достойный и Красностоп АЗОС в культуре *in vitro*. Приживаемость микрорастений на модифицированной среде по прописи А.Н. Реброва с добавлением регуляторов роста 1,0 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л ИУК составила для сорта Гранатовый – 29,4 %, Достойный – 31,2 и Красностоп АЗОС – 41,5 %.

Список источников

1. *Куликов И.М., Упадышев М.Т., Высоцкий В.А.* Достижения и перспективные направления биотехнологических исследований в ФГБНУ «Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства» // Биотехнология в плодоводстве: матлы междунар. науч. конф. Самохваловичи, 2016. С. 26–28.
2. Оптимизация методологии получения плодовых растений из почек в культуре тканей

in vitro / *В.А. Зленко* [и др.] // Магарач. Виноградарство и виноделие. 2017. № 1. 3 с.
3. *Кухарчик Н.В.* Биотехнологии в плодоводстве Беларусии // Наука и инновации. 2016. № 6 (160). С. 17–22.
4. *Батукаев А.А., Палаева Д.О., Собралиева Э.А.* Совершенствование состава питательных сред при микрочеренковании винограда *in vitro* // Научные труды Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия. Краснодар, 2018. Т. 18. С. 76–80.
5. *Янковская М.Б.* Модификация питательных сред при работе с культурой *in vitro* // Генетические основы селекции сельскохозяйственных культур: мат-лы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. памяти акад. РАН, д-ра с.-х. наук, проф. Н.И. Савельева (24–26 мая 2017 г.). Воронеж: Кварта, 2017. С. 362–366.
6. *Браткова Л.Г., Малыхина А.Н., Цаценко Н.Н.* Приемы адаптации мериклонов винограда к условиям *in vivo* // Плодоводство и виноградорство юга России. 2015. № 34 (04). С. 14–29.
7. The effect of foliar fertilizing on ecological optimization of the application of fungicides on the productivity and phenolic complex composition of grapes / *A.A. Batukaev* [et al.] // Preservation and innovation: expectations at the environmental, economic and social level book of abstracts of 42st world congress of vine and wine 17th general assembly of the oiv. 2019. P. 61–63.
8. Relief of necrosis of the tips of shoots during propagation of grapes *in vitro* cv. Red ball / *N.K. Surakshaa* [et al.] // Scientia horticulturae Vol. 248. 2019. P. 118–125.
9. *Дорошенко Н.П., Пузырнова В.Г.* Оздоровление растений от фитоплазм и микоплазм при клональном микроразмножении винограда // Русский виноград. 2018. Т. 8. С. 44–52.
10. Phenolics and their antifungal role in grapevine wood decay: Focus on the Botryosphaeriaceae family / *C. Lambert* [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 60, is. 48. 2012. P. 11859–11868.
11. *Zawadzka M., Orlikowska T.* Factors modifying regeneration *in vitro* of adventitious shoots in five red raspberry cultivars // J. Fruit ornamental Plant Res. 2006. Vol. 14. P. 105–115.
12. Control of contamination during micropropagation process of Rootstocks Mariana (*Prunus mariana*) / *S. Amiri* [et al.] // Annals of Biological Research. 2013. Vol. 4 (3). P. 149–151.
13. *Кастрицкая М.С., Змушко А.А., Красинская Т.А.* Микроразмножение растений рода *Prunus* L.: инициация и размножение // Плодоводство: сб. науч тр. Самохваловичи, 2018. Т. 30. С. 258–264.
14. *Маркова М.Г., Сомова Е.Н.* Влияние питательной среды и спектрального состава света на размножение земляники *in vitro* // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2018. Т. 63, № 2. С. 35–41.
15. *Иванова-Ханина Л.В.* Влияние состава субстрата на приживаемость микрорастений *Vitis vinifera* L. *in vivo* // Ekosystemy. 2018. Vol. 13 (43). С. 84–88.

References

1. *Kulikov I.M., Upadyshev M.T., Vysockij V.A.* Dostizheniya i perspektivnye napravleniya biotehnologicheskih issledovanij v FGBNU «Vserossijskij selekcionno-tehnologicheskij institut sadovodstva i pitomnikovodstva» // Biotehnologiya v plodovodstve: mat-ly mezhdunar. nauch. konf. Samohvalovichi, 2016. S. 26–28.
2. Optimizaciya metodologii polucheniya plodovyh rastenij iz pochek v kul'ture tkanej *in vitro* / *V.A. Zlenko* [i dr.] // Magarach. Vinogradarstvo i vinodelie. 2017. № 1. 3 s.
3. *Kuharchik N.V.* Biotehnologii v plodovodstve Belarusii // Nauka i innovacii. 2016. № 6 (160). S. 17–22.
4. *Batukaev A.A., Palaeva D.O., Sobralieva `E.A.* Sovershenstvovanie sostava pitatel'nyh sred pri mikrocherenkovanii vinograda *in vitro* // Nauchnye trudy Severo-Kavkazskogo federal'nogo nauchnogo centra sadovodstva, vinogradarstva, vinodeliya. Krasnodar, 2018. T. 18. S. 76–80.
5. *Yankovskaya M.B.* Modifikaciya pitatel'nyh sred pri rabote s kul'turoj *in vitro* // Geneticheskie osnovy selekcii sel'skohozyajstvennyh kul'tur: mat-ly mezhdunar. nauch.-prakt. konf., posvyasch. pamyati akad. RAN, d-ra s.-h. nauk, prof. N. I. Savel'eva (24-26 maya 2017 g.). Voronezh: Kvarta, 2017. S. 362–366.
6. *Bratkova L.G., Malyhina A.N., Cacenko N.N.* Priemy adaptacii meriklonov vinograda k usloviyam *in vivo* // Plodovodstvo i vinogradorstvo yuga Rossii. 2015. № 34 (04). S. 14–29.

7. The effect of foliar fertilizing on ecological optimization of the application of fungicides on the productivity and phenolic complex composition of grapes / *A.A. Batukaev* [et al.] // Rreservation and innovation: expectations at the environmental, economic and social level book of abstracts of 42st world congress of vine and wine 17th general assembly of the oiv. 2019. P. 61–63.
8. Relief of necrosis of the tips of shoots during propagation of grapes *in vitro* cv. Red ball / *N.K. Surakshaa* [et al.] // Scientia horticulturae Vol. 248. 2019. P. 118–125.
9. *Doroshenko N.P., Puzyrnova V.G.* Ozdorovlenie rastenij ot fitoplazm i mikoplazm pri klonal'nom mikrorazmnozhenii vinograda // Russkij vinograd. 2018. T. 8. S. 44–52.
10. Phenolics and their antifungal role in grapevine wood decay: Focus on the Botryosphaeriaceae family / *C. Lambert* [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 60, is. 48. 2012. P. 11859–11868.
11. *Zawadzka M., Orlikowska T.* Factors modifying regeneration *in vitro* of adventitious shoots in five red raspberry cultivars // J. Fruit ornamental Plant Res. 2006. Vol. 14. P. 105–115.
12. Control of contamination during micropropagation process of Rootstocks Mariana (*Prunus mariana*) / *S. Amiri* [et al.] // Annals of Biological Research. 2013. Vol. 4 (3). P. 149–151.
13. *Kastrickaya M.S., Zmushko A.A., Krasinskaya T.A.* Mikrorazmnozhenie rastenij roda *Prunus* L.: iniciaciya i razmnozhenie // Plodovodstvo: sb. nauch tr. Samohvalovichi, 2018. T. 30. S. 258–264.
14. *Markova M.G., Somova E.N.* Vliyanie pitatel'noj sredy i spektral'nogo sostava sveta na razmnozhenie zemlyaniki *in vitro* // Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka. 2018. T. 63, № 2. S. 35–41.
15. *Ivanova-Hanina L.V.* Vliyanie sostava substrata na prizhivaemost' mikrorastenij *Vitis vinifera* L. *in vivo* // Ekosystemy. 2018. Vol. 13 (43). S. 84–88.

Статья принята к публикации 11.09.2023 / The article accepted for publication 11.09.2023.

Информация об авторах:

Ольга Леонидовна Сегет, научный сотрудник лаборатории управления воспроизводством в ампелоценозах и экосистемах, кандидат сельскохозяйственных наук

Information about the authors:

Olga Leonidovna Seget, Researcher, Laboratory of Reproduction Management in Ampelocenoses and Ecosystems, Candidate of Agricultural Sciences