

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА В СИСТЕМЕ ПРОИЗВОДСТВА ОЗДОРОВЛЕННОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ВИНОГРАДА

А.А. Батукаев, А.А.Зармаев, М.С.Батукаев\*

*Чеченский государственный университет, Грозный, РФ*

*\*Чеченский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Грозный, РФ*

*e-mail: batukaevmalik@mail.ru*

### **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.

Современное виноградарство России должно базироваться на производстве сертифицированного посадочного материала. Производство посадочного материала высших категорий в РФ отсутствует [1].

Основная цель исследований заключалась в совершенствовании технологий клонального микроразмножения с использованием регуляторов роста. Задача состоит в получении здорового посадочного материала винограда и введение системы сертификации посадочного материала по образцу европейских стран.

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* [2]. Наиболее иллюстративным примером реализации потенциала растений (или их отдельных тканей и органов) с помощью биотехнологических приемов может стать клональное микроразмножение, при котором реальные коэффициенты размножения в сотни и даже тысячи раз выше, чем при любом из традиционных приемов [3].

### **Методы исследования**

Объектом исследований явились комплексно-устойчивые сорта винограда селекции Всероссийского НИИВиВ имени Я.И. Потапенко, НИВиВ "Магарач" Украинской академии аграрных наук, 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 200 до 400 микрон специальной препаровальной иглой и немедленно 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 27–28°C, 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 pH 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 индолил-масляная кислота (ИМК) и индолил-уксусная кислота (ИУК), из группы цитокининов: 6-бензиламинопурин (6-БАП), 2-изопентил-аденин (2iP), кинетин, а также гибберелловая кислота (ГК).

Культивирование растительного материала осуществляли на первом этапе в чашках Петри, далее в пробирках размером 40x120 мм, содержащих 20 мл питательной среды. Пересадку эксплантов проводили по мере необходимости, при этом учитывали следующие показатели: приживаемость верхушечных меристем и одноглазковых эсплантов, интенсивность роста эксплантов, формирование и развитие корневой системы.

### **Результаты и обсуждение**

Метод получения свободных от вирусов растений основывается на том, что по направлению к верхушке побега содержание вирусов в больном растении снижается. Апикальная меристема обычно свободна от вирусов. Собственно апикальная меристема, представляет собой конус активно делящихся клеток высотой 0,2–0,4 мм [3, 4, 5]. Однако собственно меристему бывает трудно вычленивать 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 Магарача) находится в среднем на уровне 50%, а у технических сортов (Подарок Магарача, Виорика, Ркацителли) – 40–45%. Гибель апикальных меристем в процессе культивирования, по-видимому, наступает за счет повреждения апикальных структур в процессе вычленения.

Прижившиеся апикальные меристемы, через месяц после посадки были пересажены на питательную среду с содержанием тех же компонентов. Пересадку производили в биологические пробирки размером 40x120 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 Ркацителли и более 90% у сорта Молдовы и Мускат итальянский. 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).

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 40% приживаемость 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.



А

В

С

D

Рисунок 1 – Растения различных сортов винограда в культуре *in vitro* (А–В), в адаптационных сосуд-пакетах (С), на дорастивании до стандартных саженцев в защищенном грунте (D)

Одним из важнейших и неотъемлемых компонентов питательной среды являются регуляторы роста [6, 7]. 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 гибли. 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 (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние 6-БАП на развитие одноглазковых черенков винограда *in vitro* (см).

Сорта	Концентрация, мг/л					НСР <sub>05</sub>
	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
Ркацители	4,9	9,1	11,8	6,1	0,0	2,35

Для ускорения процесса удлинения микропобегов параллельно проводили изучение действия гибберелловой кислоты в различных концентрациях в сочетании 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 ускоряло 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 (1,0 мг/л) и пониженной концентрации 6-БАП (0,5 мг/л) 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 были испытаны на укоренение побегов *in vitro* различные концентрации 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 (таблица 2).

Таблица 2 – Влияние ИМК на развитие корней у одноглазковых черенков *in vitro* (n = 20)

№ п/п	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 <sub>05</sub>			1,94	
Сорт Подарок Магарача					
1	Среда без ИМК (контроль)	1,4	3,2	3,1	8,8
2	0,5	1,9	6,3	4,0	14,0
3	1,0	2,3	14,5	5,6	20,4
4	2,0	2,8	18,4	5,8	38,3
5	5,0	1,5	13,5	4,2	23,7
	НСР <sub>05</sub>			1,46	

Спустя месяц число 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, при концентрации ИМК 5,0 мг/л наблюдалось почернение корней.

В последующем, с целью увеличения коэффициента размножения исследовали два варианта комбинаций регуляторов роста – 6-БАП с 2-iP и 6-БАП с кинетином. Контролем служила модифицированная среда Мурасиге-Скуга, дополненная 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л и 1,0 мг/л. На экспериментальные среды высаживали одноглазковые микрочеренки винограда сортов Августин и Надежда АЗОС. Длительность культивирования составляла 4 недели, после чего определяли коэффициент размножения и среднюю длину побегов.

Присутствие 2iP в питательной среде оказывало отрицательное действие на образование дополнительных побегов у эксплантов винограда, снижая как коэффициент размножения, так и среднюю длину побегов. Так, при одинаковой концентрации 6-БАП, равной 0,5 мг/л, коэффициент размножения у эксплантов сорта Августин снизился от 2,5 до 1,9; у эксплантов сорта Надежда АЗОС – от 2,7 до 1,9. Еще в большей степени снижение коэффициента размножения наблюдали в вариантах с использованием комбинации 2-iP с 6-БАП в концентрации 1,0 мг/л.

Присутствие кинетина в питательной среде в комбинации с 6-БАП положительно влияло на развитие эксплантов. Так, на фоне концентрации 6-БАП 0,5 мг/л присутствие кинетина (0,5 мг/л) обеспечило максимальный коэффициент размножения для обоих сортов винограда 2,9 и некотором уменьшении средней длины побегов. В вариантах с концентрацией 6-БАП 1,0 мг/л присутствие кинетина не уменьшало коэффициент

размножения побегов сорта Августин, по сравнению с вариантом без кинетина. При культивировании эксплантов сорта Надежда АЗОС отмечено некоторое уменьшение коэффициента размножения – на 11% (кинетин 0,25 мг/л) и 20% (кинетин 0,5 мг/л). Таким образом, для этапа микроразмножения винограда сортов Августин и Надежда АЗОС целесообразно совместное использование 6-БАП и кинетина в концентрации 0,5 мг/л каждого, что обеспечивает максимальный коэффициент размножения.

#### **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.

Приживаемость апикальных меристем, из которых вырастает растение *in vitro* (10–12 см), дает возможность дальнейшего их культивирования и размножения (путем повторного черенкования), при котором возможно получение безвирусного посадочного материала.

Из испытанных регуляторов роста наиболее результативно проходила регенерация побегов 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 *in vitro*.

Присутствие кинетина в питательной среде в комбинации с 6-БАП положительно влияло на развитие эксплантов. Так, на фоне концентрации 6-БАП 0,5 мг/л присутствие кинетина (0,5 мг/л) обеспечило максимальный коэффициент размножения для испытываемых сортов винограда

#### **Список литературы**

1. Кравченко, Л.В. Производство сертифицированного посадочного материала винограда через культуру *in vitro* на иммунных песках опытного поля ВНИИВиВ им. И. Потапенко // Современные достижения биотехнологии в виноградарстве и других отраслях сельского хозяйства. Материалы конференции. – Новочеркасск – 2005 – С. 3–31.
2. Бургутин, А.Б. Быстрое клональное размножение виноградного растения / Р.Г. Бутенко, Н.В. Катаева, П.Я. Голодрига // С.-х. биология. – 1983. – № 7. – С. 48–50.
3. Высоцкий, В.А. Биотехнологические приемы в современном садоводстве / В.А. Высоцкий // Сборник научных работ ВСТИСиП РАСХН – Т. XXVI. – Москва, 2011. – С. 3–10.
4. Дорошенко, Н.П. Повышение регенерационной способности меристем при получении безвирусного материала винограда / Н.П. Дорошенко // Виноград и вино России. – 1997. – №2. – С. 6–9.
5. Garre, M. La cultur de meristemes et la multilpication Végetative in Vitro au service de la pepiniere / M. Garre, J. Martin-Tanguy, P. Mussillon // Bulletin Petits Fruit. – 1979. – № 14. – P. 7–65.
6. Гамбург, К.З. Ауксины в культурах тканей и клеток растений / К.З. Гамбург, Н.И. Рекославская, С.Г. Швецов. – Новосибирск: Наука, 1990. – 243 с.
7. Кулаева, О.Н. Цитокинины, их структура и функции / О.Н. Кулаева – М.: Наука, 1973. – 264 с.