

МОДИФИКАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ДЕПОНИРОВАНИЯ ВИНОГРАДА IN VITRO

MODIFICATION OF THE NUTRIENT MEDIUM FOR THE DEPOSIT OF GRAPE IN VITRO

Н.П. Дорошенко

N.P. Doroshenko

ФГБНУ «Всероссийский
научно-исследовательский институт
виноградарства и виноделия
имени Я.И. Потапенко»,
г. Новочеркасск, Россия,
E-mail: ruswine@yandex.ru

FSBSI «Ya. I. Potapenko Institute for
Viticulture & Winemaking»,
Novocherkassk, Rostov region, Russia,
E-mail: ruswine@yandex.ru

Аннотация. Модификация питательной среды заключалась во введении в состав различных концентраций макросолей CaCl_2 и $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Исследования осуществлялись на аборигенных сортах винограда Варюшкин, Крестовский, Пухляковский.

При введении в состав питательной среды этих макросолей выявлена оптимальная сохранность и развитие растений при концентрации 3,0 мМ, снижение ростовых процессов при 6,0-7,5 мМ.

Выявлено преимущество нитрата кальция по влиянию на большинство параметров растений, находящихся на хранении. Улучшились сохранность и жизнеспособность растений.

Доказана возможность беспересадочного хранения в течение 490 дней растений винограда при содержании в питательной среде 3,0 и 7,5 мМ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

Summary. Modification of the nutrient medium was similar to the introduction of the various concentrations of macrosoma CaCl_2 and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. The study was carried out on indigenous grape varieties Varuskin, Krestovsky, Puhljakovsky.

When introduced into nutrient medium of these macrosoma identified the optimal probability preservation and development of plants at a concentration of 3,0 mm, the reduction processes in the 6,0-7,5 mm.

Revealed the advantage of calcium nitrate on the impact on most parameters of plants at the store-NII. Improved the safety and viability-the ability of plants.

Proven capability non-stop storage for 490 days plant grapes at the maintenance in a food environment, 3,0 and 7,5 mm $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

Ключевые слова: виноград, коллекция генофонда in vitro, модификация питательной среды, макросоли, сохранность и жизнеспособность растений.

Keywords: grapes, the collection of gene pool in vitro, the modification of nutrient medium, makrosoli., safety and the viability of the plants.

Введение. В настоящее время развивается новая междисциплинарная наука – биотехнология сохранения растений, основной задачей которой является дополнение существующих

традиционных методов сохранения биоразнообразия *ex situ* и *in situ* современными биотехнологическими инструментами, обеспечивающими возможность устойчивого управления генетическими ресурсами [1].

Возможность создания банка культур *in vitro* для длительного хранения генофонда растений является важнейшим достижением биотехнологии [2, 3, 4, 5]. Технологии *in vitro* позволяют одновременно достичь высокого уровня мультипликации растительного материала и освобождения от вирусных, бактериальных инфекций.

При хранении коллекций *in vitro* в оптимальных условиях роста растений ($t = 20-23^{\circ}\text{C}$), возникает необходимость частого переноса микрорастений на свежую питательную среду, что повышает стоимость хранения образца и увеличивает риск его инфицирования различными микроорганизмами, особенно когда в работу вовлечены растения, не прошедшие тестирования на патогены. Кроме того, частое пассирование микропобегов стимулирует активное деление клеток, что может способствовать возникновению соматональных вариантов. Для увеличения интервала между пассажами используют различные методы и приемы, основанные на замедлении роста пробирочных растений.

Хранение в условиях замедленного роста позволяет поддерживать биологический материал без субкультивирования в течение нескольких месяцев до 2–3 лет [6, 7]. Замедление роста обычно достигается за счет модификации сред или условий культивирования. Модификации сред включают разбавление минеральной основы, снижение содержания сахарозы, изменение концентраций или комбинаций регуляторов роста, добавление осмотически активных веществ [8].

Цель исследования - выявить влияние измененной минеральной основы питательной среды Мурасиге и Скуга [9] на ростовые процессы мериклонов винограда для создания и продолжительного беспересадочного хранения растений в коллекции *in vitro*.

Методы исследования. Исследования проводились в стационарных условиях лаборатории биотехнологии ВНИИВиВ имени Я.И. Потапенко по общепринятым в биотехнологии методикам. Оздоровление растений винограда перед постановкой на хранение осуществляли методом культуры апикальных меристем при относительном размере эксплантов 0,1 - 0,2 мм. Для повышения регенерационной способности меристем, микроразмножения полученных растений, применяли схему и технологию клонального микроразмножения, разработанную в лаборатории биотехнологии [10].

Жизнеспособность растений оценивали с периодичностью один

раз в месяц по количеству некрозов тканей листьев и побегов: 0 баллов — визуальная гибель растения, 1 балл — некроз более 50% тканей растения, 2 балла — некроз менее 50% тканей, 3 балла — растения без некроза.

Питательная среда Мурасиге-Скуга предназначена для интенсивного роста растений. Определение характера воздействия отдельных компонентов этой питательной среды на продолжительность беспересадочного хранения растений винограда было выполнено на аборигенных сортах Крестовский, Варюшкин, Пухляковский в 2011 - 2015 гг. Изучались следующие концентрации CaCl_2 и $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$: 1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 7,5 мМ.

Обсуждение полученных результатов. Лучшая приживаемость микрочеренков и сохранность растений сорта Крестовский на протяжении всего времени культивирования наблюдалась в вариантах с концентрацией CaCl_2 3,0 — 4,5 мМ.

При культивировании в течение 35 дней во всех вариантах, кроме варианта с 1,5 мМ CaCl_2 , видно замедление роста растений, особенно заметное при отсутствии CaCl_2 в составе питательной среды или при максимальных её концентрациях: 6,0- 7,5 мМ.

В течение всего периода культивирования это положение сохранялось. Снижение ростовых процессов растений составило 74,1 - 80,1%, а облиственность уменьшилась на 78,1-85,7%. Но этого недостаточно для длительного хранения, поскольку растения уже выросли на высоту пробирки и отмечено снижение их жизнеспособности. Более высокую приживаемость микрочеренков и некоторое снижение ростовых процессов необходимо отметить при 3,0 мМ CaCl_2 в составе питательной среды.

Результаты детального анализа растений после культивирования в течение 200 дней отражены в таблице 1.

Как видно из приведенных данных, по комплексу таких показателей как число сохранившихся растений, высота и облиственность их, воздушно- сухой вес листьев и стеблей выделился вариант с содержанием хлорида кальция 3,0 мМ. То есть в этом варианте выявлено лучшее развитие растений при среднесрочном хранении. Близкие результаты получены и при содержании в питательной среде 4,5 мМ CaCl_2 . В других вариантах отмечено снижение числа сохранившихся растений при 0-1,5 мМ CaCl_2 в 1,9-3,8 раза, при 6,0-7,5 мМ в 1,8-1,9 раза. Уменьшение высоты растений отмечено при отсутствии хлорида кальция в питательной среде, при минимальной концентрации 1,5 мМ и при повышенных концентрациях 6,0 и 7,5 мМ. Воздушно сухая масса листьев, стеблей и корней изменялась аналогичным образом.

Таблица 1

Состояние растений сорта Крестовский после культивирования в течение 200 дней на питательной среде с различным содержанием CaCl_2 (2011-2012 гг.)

Содержание CaCl_2	Число растений, шт.	Число корней, шт.	Длина корней, см	Ризогенная зона, см	Высота растений, см	Число листьев, шт.	Площадь листьев, cm^2	Масса, г		
								листья	стеблей	корней
0	3,5	5,1	4,5	22,9	17,3	19,6	1,6	0,12	0,05	0,03
1,5	2,5	3,0	5,7	17,1	19,1	19,6	1,6	0,09	0,05	0,03
3,0	13,5	4,3	3,9	16,8	24,2	19,8	1,6	0,45	0,38	0,13
4,5	11,0	4,8	3,6	17,3	22,4	19,0	1,7	0,40	0,27	0,14
6,0	7,0	4,1	4,0	16,4	24,3	18,8	2,0	0,24	0,23	0,05
7,5	7,5	4,0	4,0	16,0	22,2	17,7	2,0	0,21	0,20	0,08

Таким образом, при культивировании в течение 200 дней выделились по морфологическим показателям растения в вариантах с содержанием хлорида кальция 3,0 и 4,5 мМ. Некоторое снижение ростовых процессов отмечено при отсутствии CaCl_2 в питательной среде, при минимальной (1,5 мМ) и, особенно, повышенной концентрации (7,5 мМ). Этого недостаточно для среднесрочного хранения, но может быть получен положительный результат в сочетании с другими факторами, что представляет интерес.

При замене хлорида кальция нитратом кальция (табл. 2) отмечена высокая приживаемость микрочеренков и сохранность растений в течение 149 дней культивирования.

Растения, культивируемые на питательной среде с нитратом кальция, отличались большей жизнеспособностью и интенсивной окраской листьев. Этот эффект проявлялся, вероятно, не только из-за появления в среде дополнительного источника азота, но и за счет увеличения концентрации кальция при существенном снижении содержания ионов хлора.

Учет состояния растений, проведенный через 30 дней после посадки микрочеренков на питательную среду с добавлением $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, показал хорошую приживаемость микрочеренков при всех изучаемых концентрациях, уменьшение корнеобразования при концентрации 3,0 мМ и выше, что привело к уменьшению длины ризогенной зоны. Отмечена тенденция к снижению высоты и скорости роста растений, особенно при максимальной концентрации нитрата кальция.

Таблица 2

Динамика ростовых процессов пробирочных растений сорта Крестовский при различных концентрациях, Са (NO₃)₂, 2011-2012гг.

Са(NO ₃) ₂ мМ	Прижив аем. м/ч, сохран. раст. %	Корни			Высот а, см	Листь- ев, шт.	Ско рость, см/сут.	Коэфф ициент полярн ости
		число, шт.	длина, см	ризоген. зона, см				
Учёт через 30 дней культивирования								
0	92,8	2,9	1,7	4,9	2,8	2,7	0,09	1,8
1,5	92,8	2,8	2,0	5,6	2,4	2,1	0,08	2,3
3,0	100	2,2	1,9	4,2	2,1	2,5	0,07	2,0
4,5	100	1,9	2,1	4,0	1,8	2,6	0,06	2,2
6,0	96,4	2,2	1,9	4,2	2,0	2,5	0,07	2,1
7,5	100	2,3	2,2	5,1	1,8	2,9	0,06	2,8
Учёт через 58 дней культивирования								
0	82,1	3,2	2,1	6,9	5,6	5,9	0,1	1,2
1,5	89,3	3,2	2,4	7,8	5,7	6,3	0,1	1,4
3,0	100	2,6	2,2	5,8	5,5	6,1	0,09	1,1
4,5	100	2,2	2,6	5,7	4,5	5,9	0,08	1,3
6,0	96,4	2,6	2,5	6,5	4,8	6,1	0,08	1,3
7,5	92,8	2,5	3,0	7,5	3,9	5,7	0,07	1,9
Учёт через 86 дней культивирования								
0	78,6	4,1	2,2	9,0	8,6	8,1	0,10	1,0
1,5	89,3	3,7	2,3	8,5	10,2	9,9	0,12	0,8
3,0	100	3,6	2,2	7,9	10,6	9,8	0,12	0,7
4,5	100	2,4	2,9	7,0	8,5	10,0	0,10	0,8
6,0	96,4	3,0	3,0	9,0	9,0	10,5	0,10	1,0
7,5	92,8	2,9	3,0	8,7	7,4	10,2	0,09	1,1
Учёт через 117 дней культивирования								
0	78,6	4,2	2,9	12,1	10,6	11,4	0,09	1,1
1,5	85,7	3,6	2,7	9,7	13,1	13,7	0,11	0,7
3,0	100	3,6	3,0	10,8	13,2	13,9	0,11	0,8
4,5	100	3,4	3,2	10,8	12,2	13,2	0,10	0,8
6,0	96,4	3,3	3,4	11,2	12,6	13,9	0,11	0,9
7,5	92,8	3,3	3,2	10,5	10,9	13,4	0,09	1,0
Учёт через 149 дней культивирования								
0	35,7	4,6	3,8	17,5	13,8	12,5	0,09	1,3
1,5	85,7	4,5	2,8	12,6	15,0	14,6	0,10	0,8
3,0	100	4,2	2,8	11,7	15,3	15,4	0,10	0,7
4,5	100	3,5	3,6	12,2	14,4	14,0	0,10	0,8
6,0	96,4	3,4	3,6	12,2	14,9	15,7	0,10	0,8
7,5	92,8	3,3	3,9	12,8	13,1	14,7	0,09	1,0

Выявленная тенденция подтвердилась и в течение последующего месяца. Следует отметить, что уменьшение числа корней в варианте с максимальной концентрацией нитрата кальция компенсировалось их удлинением, но длина ризогенной зоны не увеличивалась и была ниже, чем в контрольном варианте. Четко проявилось снижение роста растений — в 1,5 раза по сравнению с растениями в варианте с

концентрацией 1,5 мМ. Аналогичное положение отмечено и при учетах через 86, 117 и 149 дней культивирования.

Таким образом, на протяжении всего периода культивирования при концентрациях $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ выше 4,5 мМ, отмечалось замедление скорости роста уменьшение числа корней, снижение высоты растений, уменьшение числа листьев. Наиболее четко это проявилось при концентрации $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -7,5 мМ.

При сравнительной оценке хлорида и нитрата кальция, выявлено преимущество нитрата кальция (табл. 3) по влиянию на большинство параметров растений, находящихся на хранении в течение 200 дней.

Таблица 3

Состояние растений сорта Крестовский после культивирования в течение 200 дней на питательной среде с различным содержанием $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 2011-2012 гг.

Концентрация, мМ/л	Растений, шт.	Корней, шт.	Дли на корней, см	Ризогенная зона, см	Высота, см	Листьев, шт.	Площадь листьев, см ²	Масса, г		
								листьев	стеблей	корней
0	13	2,8	4,2	11,8	22,9	21,6	1,3	0,40	0,33	0,07
1,5	12	4,0	3,4	13,6	23,5	21,5	1,5	0,35	0,26	0,06
3,0	14	3,6	4,4	15,8	26,0	19,4	1,9	0,50	0,54	0,24
4,5	12	3,3	3,6	11,9	26,0	21,3	1,5	0,37	0,35	0,08
6,0	12	2,9	4,3	12,4	24,9	21,3	1,5	0,31	0,40	0,07
7,5	13	2,6	4,8	12,4	22,0	21,0	1,4	0,40	0,31	0,08

Во-первых, это касается сохранности растений, которая выше при введении в состав питательной среды нитрата кальция. Во-вторых, несмотря на уменьшение числа корней, длины ризогенной зоны, корни развивались более сильными, на что указывает их воздушно сухая масса. Это можно сказать о высоте растений и, особенно о массе стеблей, которая намного выше при всех концентрациях нитрата кальция. Аналогичное положение сложилось и в отношении облиственности растений и воздушно сухой массы листьев. Визуально растения в вариантах с нитратом кальция выглядели намного лучше, чем растения в вариантах с хлоридом кальция

Учитывая, что наметилась тенденция к замедлению роста, отсутствует снижение жизнеспособности растений, считаем возможным применять нитрат кальция для беспересадочного хранения пробирочных растений в течение 5-6 месяцев.

Дальнейшие исследования проведены на сортах Варюшкин (2013), Пухляковский (2012-2013), Цимладар (2014). Растения, всех сортов проявили высокую приживаемость микрочеренков и сохранность растений в течение 149 дней культивирования. Они отличались большей жизнеспособностью и интенсивной окраской листьев.

Растения сорта Пухляковский, культивируемые на питательной среде с нитратом кальция (табл. 4), также отличались жизнеспособностью и интенсивной окраской листьев.

Таблица 4

Динамика ростовых процессов пробирочных растений сорта Пухляковский при различных концентрациях, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 2012 г.

Концентрации, мМ/л	Приживаем., %	Корни			Высота, см	Листьев, шт.	Скорость, см/день	Коэфф. полярн.
		число, шт.	длина, см	ризоген. зона, см				
Учёт через 30 дней культивирования								
0	100,0	2,9	2,9	8,3	3,4	3,4	0,1	2,4
1,5	100,0	3,1	3,8	11,6	3,5	3,5	0,1	3,4
3,0	100,0	2,5	4,5	10,9	3,2	3,8	0,1	3,4
4,5	100,0	2,6	4,7	12,2	3,2	3,9	0,1	3,8
6,0	100,0	1,6	5,7	9,1	2,8	3,5	0,09	3,3
7,5	100,0	1,8	4,9	7,5	1,6	1,9	0,05	4,7
Учёт через 80 дней культивирования								
0	100,0	3,8	3,8	14,2	8,4	7,3	0,1	1,7
1,5	100,0	3,1	5,0	16,0	8,6	8,1	0,1	1,9
3,0	100,0	2,2	6,6	14,6	8,0	8,5	0,1	1,8
4,5	100,0	2,3	7,1	16,3	7,2	7,7	0,09	2,3
6,0	100,0	1,6	8,6	13,7	6,3	6,7	0,08	2,2
7,5	100,0	1,6	9,4	14,6	6,2	6,2	0,08	2,4
Учёт через 150 дней культивирования								
0	92,9	4,0	3,6	14,4	11,4	9,4	0,08	1,3
1,5	96,5	3,1	4,6	14,3	13,7	11,2	0,09	1,0
3,0	100,0	2,4	6,9	16,6	13,2	11,2	0,09	1,3
4,5	96,5	2,7	6,2	16,7	13,3	11,2	0,09	1,3
6,0	100,0	1,8	9,4	16,9	12,1	10,8	0,08	1,4
7,5	100,0	2,3	8,5	19,6	12,8	9,8	0,08	1,5

Учет состояния растений, проведенный через 30 дней после посадки микрочеренков на питательную среду с добавлением нитрата кальция, показал хорошую их приживаемость при всех изучаемых концентрациях, уменьшение корнеобразования при концентрациях 3,0 мМ и выше компенсировалось увеличением их длины и длины ризогенной зоны. Отмечено замедление ростовых процессов при максимальной концентрации $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ - 7,5 мМ: уменьшение длины ризогенной зоны в 1,1; высоты растений в 2,1; облиственности в 1,8; скорости роста растений в 2 раза по сравнению контролем. В этом варианте обнаружен самый высокий коэффициент полярности, что указывает на преимущественное развитие корней по сравнению с побегами

Через 80 дней культивирования выявлено замедление ростовых

процессов у растений как при концентрации 7,5мМ, так и при концентрации 6,0мМ Ca(NO₃)₂. После 150 дней культивирования это отставание в развитии растений менее заметно по сравнению с контрольными, но более очевидно по сравнению с растениями вариантов 1,5 – 4,5 мМ, у которых лучшее в опыте развитие корней, высота растений, облиственность, соотношение «корни-побеги».

Состояние растений в это время было следующим: в первом варианте при нулевом содержании Ca(NO₃)₂ растения были зеленые, но разнокачественные. Наряду с растениями нормального роста были отмечены и отстающие в росте (до 1/2 пробирки) с мелкими листьями, таких растений было 37,0%.

Во втором варианте при концентрации нитрата кальция 1,5мМ сохранились все растения, состояние их лучше, чем в предшествующем варианте. Все листья зеленые. При содержании Ca(NO₃) в питательной среде 3,0 и 4,5 мМ растения визуально выглядят очень хорошо: побеги большего диаметра, листья зеленые и крупные. Хорошее состояние растений отмечено и при увеличении содержания нитрата кальция до 6,0-7,5 мМ, но отмечено замедление роста.

Все растения имели потенциал для дальнейшего хранения, что и подтвердилось при депонировании.

Беспересадочное культивирование растений сорта Пухляковский на питательной среде с нитратом кальция продолжалось в течение 490 дней. При культивировании в течение 8 месяцев (243 дня) отмечена высокая сохранность растений и хорошее их состояние. При хранении в течение 270 дней начиналось подсыхание растений, прорастание почек и образование новых побегов с зелеными листьями. При последующем учете (385 дней) в вариантах с содержанием нитрата кальция остались жизнеспособными от 32,1 до 60,7% растений. Наибольшее количество сохранившихся растений оказалось в варианте с 3 мМ/л: 60,0% растений с 42,8 % зеленых листьев.

При учете, проведенном через 490 дней, наибольшее число жизнеспособных растений- 13 шт. (46,4%) также оказалось в этом варианте. В других вариантах сохранилось от 5 до 12 растений (17,9-25,8%), содержащих 3,0-5,0 зеленых листьев. Хорошие, результаты по числу растений с жизнеспособными, зелеными листьями, получены при максимальном содержании нитрата кальция в питательной среде —7,5 мМ.

У сорта Варюшкин через 450 дней депонирования сохранилось, в зависимости от концентраций, от 10,7 до 42,8 % растений. При этом большее число растений сохранилось при концентрации 4,5мМ. Единичные растения сохранились при повышенных концентрациях:6,0-

7,5 мМ. Следует отметить высокий коэффициент жизнеспособности у сохранившихся растений, который составлял 1,5-2 балла.

Выводы. Доказана возможность длительного беспересадочного культивирования (490 дней) растений для создания коллекции винограда *in vitro*. При введении в состав питательной среды этих макросолей выявлена оптимальная сохранность и развитие растений при концентрации 3,0мМ, снижение ростовых процессов при 6,0-7,5мМ.

Литература

1. Benson E.E. In vitro micropropagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant/ E.E. Benson, J.E. Danaher, I.M. Pimbley// *Biodiversity and Conservation*.-2000. - V. 9.- P. 711–726.
2. Новикова, Т.И. Сохранение редких и полезных растений в коллекции Центрального сибирского ботанического сада /Т.И. Новикова, А.Ю. Набиева, Т.В. Полубоярова//*Вестн. ВОГиС*.- 2008.- Т. 12,- № 4.- С. 564–572.
- 3.Новикова Т.И. Сохранение редких и исчезающих видов флоры Сибири методами *ex situ* /Т.И., Новикова, О.В. Дорогина// *Тр. Том. гос. ун-та. Сер. Биол.*- 2010.-Т. 274.-С. 276-278.
4. Fay, M.F. Conservation of rare and endangered plants using in vitro methods/ M.F. Fay // *In Vitro Cell Dev. Biol.*- 1992.- V. 28.-P. 1–4.
5. Sarasan V. Conservation in vitro of threatened plants-Progress in the past decade/ V.Sarasan, R.Cripps, M.M. Ramsay, C. Atherton, M.M. Michen, G. Prendergast, J.K. Rowntree // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.*- 2006.- V. 42.- P. 206–214.
6. Бутенко, Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе / Р. Г. Бутенко // М.-, 1999. -160 с
7. Cruz-Cruz C.A., González-Arao M.T., Engelmann F. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity // *Resources*. 2013. V. 2. P. 73–95.
8. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 2011. V. 47. P. 5–16
9. Методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда / П.Я. Голодрига. [и др.]. Ялта: ВНИИВВиПП «Магарач».1986. —57с.
10. Дорошенко Н. П. Клональное микроразмножение и оздоровление посадочного материала винограда для создания из него сортовых маточников интенсивного типа / Н. П. Дорошенко: Рекомендации. – М., 1998. – 24 с.

