

УДК 634.8.03.05

## НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ СОЗДАНИЯ ОЗДОРОВЛЕННЫХ КОЛЛЕКЦИЙ ВИНОГРАДА АБОРИГЕННЫХ ДОНСКИХ СОРТОВ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

### SOME ASPECTS OF CREATION OF HEALTHY GRAPEVINE COLLECTIONS OF ABORIGINAL DON VARIETIES IN VITRO

Н.С. Венценосцева

N.S. Wensenostseva

Всероссийский научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия им. Я.И. Потапенко – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный Ростовский аграрный научный центр» г. Новочеркасск, Россия, e-mail: 777natalim777@gmail.com

All-Russian Research Ya.I. Potapenko Institute for Viticulture and Winemaking – Branch of Federal State Budget Scientific Institution «Federal Rostov Agricultural Research Center», Novocherkassk, Russia, e-mail: 777natalim777@gmail.com

**Аннотация.** В статье рассматриваются некоторые аспекты усовершенствования элементов технологии создания оздоровленной коллекции аборигенных сортов винограда *in vitro*. Для оздоровления от фитоплазменной инфекции разработан способ хемотерапии с применением антибиотика Цефотаксим. При высоких концентрациях антибиотика отмечена интоксикация растений и ухудшение их качественных характеристик. У растений сорта Махроватчик отмечено улучшение приживаемости при концентрациях антибиотика 100 и 200 мг/л: 64,3 и 60,7 % соответственно. Для продолжительного беспересадочного культивирования изучали эффективность замедления ростовых процессов с помощью увеличения плотности питательной среды. Исследование проводили на сортах Махроватчик, Цимлянский Сергиенко. Изучали концентрации агара (6, 8, 10, 12, 13 и 15 г/л). Снижение скорости ростовых процессов отмечено на всех изучаемых сортах, однако интенсивность замедления была различна.

**Summary.** The article discusses some aspects of improving the elements of technology for creating of healthy collection of indigenous grape varieties *in vitro*. To recover from phytoplasma infection, a chemotherapy method using the antibiotic Cefotaxime has been developed. At high concentrations of the antibiotic, intoxication of plants and deterioration in their quality characteristics were noted. Plants of Makhrovatchik variety showed an improvement in survival rate at antibiotic concentrations of 100 and 200 mg/l: 64.3 and 60.7%, respectively. For long-term cultivation without replantings, the effectiveness of slowing down growth processes by increasing the density of the nutrient medium was studied. The study was carried out on the varieties Makhrovatchik, Tsimlyansky Sergienko. Studied concentrations of agar-agar were (6, 8, 10, 12, 13 and 15 g/l). A decrease in the rate of growth processes was noted in all studied varieties, but the rate of the decrease was different.

**Ключевые слова:** создание коллекций растений винограда *in vitro*, депонирование, аборигенные донские сорта

**Keywords:** creation of collections *in vitro* grape plants, depositing, native Don varieties

**DOI:** 10.32904/2712-8245-2023-26-16-24

**Введение.** Использование аборигенных донских сортов винограда дает возможность производства высококачественных и уникальных вин, прославивших виноградарство и виноделие Дона [1]. Это донские белые вина из сортов Сибирьковский, Кумшацкий белый, Пухляковский и красные вина высочайшего

качества из сортов Красностоп золотовский, Цимлянский черный, Плечистик и др. [2]. В настоящее время их площади значительно сократились, и возникла необходимость закладки новых насаждений этих сортов винограда для высококачественного виноделия. Многие аборигенные сорта винограда представляют значительную ценность для использования в селекционной работе. Их необходимо также сохранить для поддержания генетического разнообразия [3, 4].

Цель работы – разработать и усовершенствовать приемы, способствующие оздоровлению микрорастений для создания коллекции генофонда *in vitro*.

**Объекты и методы исследований** изучение и управление особенностями морфогенеза пробирочных растений аборигенных донских сортов винограда с целью их эффективного микроразмножения и депонирования в оздоровленной коллекции *in vitro*.

**Материалы и методы.** Опыты были проведены в лаборатории биотехнологии института виноградарства и виноделия имени Я.И. Потапенко по общепринятым в биотехнологии методикам Ф.Р. Уайт [5]. Р.Г. Бутенко [6]; П.Я. Голодрига и др., [7], усовершенствованным в лаборатории биотехнологии ГНУ ВНИИВиВ им Я.И. Потапенко [8]. Все работы в лаборатории биотехнологии проведены с соблюдением строгой стерильности. Материалом исследования были растения *in vitro* сортов винограда Махроватчик, и Цимлянский, черный (клон Сергиенко), Цимлянский белый, Кабашный.

Антибиотик Цефотаксим изучался в концентрациях: 0 мг/л, 100 мг/л, 300 мг/л, 500 мг/л. Содержание агар-агара в среде изучалось в диапазоне концентраций 6–15 г/л. В качестве эксплантов были взяты микрочеренки по всей длине побегов растений, выращенный *in vitro*. Использовалась питательная среда Мурасиге и Скуга, модифицированная П.Я. Голодрига. Антибиотик вносился в среду после автоклавирования, охлажденную до 40°C. Агар-агар вносился до автоклавирования.

В каждом варианте опыта было 3 повторности, в повторности 28 растений. Статистическая обработка экспериментальных данных проведена по методике Б.А. Доспехова [9] с помощью программы Microsoft Excel.

**Результаты исследования.** В связи с тем, что в процессе микроклонального размножения часто возникает необходимость деконтаминации пробирочных растений от фитомикоплазменной инфекции [10], мы изучали эффективность для этих целей антибиотика Цефотаксим [11].

В опыте на растениях сорта Цимлянский Сергиенко (клон Цимлянский черный) отмечена незначительная инфицированность растений, которую мы определяли по реакции на антибиотик в контрольном варианте – 96,4%.

Антибиотик оказал следующее влияние на приживаемость растений: улучшилась приживаемость при концентрации антибиотика 100,0 и, особенно, 200,0 мг/л, что можно объяснить деконтаминацией, как растений, так и питательной среды. Снижение приживаемости при концентрации 300,0 и 500,0 мг/л происходит из-за угнетения растений антибиотиком (таблица 1).

**Таблица 1.** Влияние антибиотика Цефотаксим на рост и развитие растений, сорт Цимлянский Сергиенко (клон Цимлянский черный), 2017–2018 гг.

Цефотаксим, мг/л	Приживаемость, %	Корни		Высота растения, см	Число листьев, шт.	Скорость роста побега, см/сут.
		число, шт.	длина, см			
32 дня культивирования						
0	96,4	3,7	1,9	2,7	2,2	0,06
100	100,0	3,9	1,2	2,1	1,7	0,05
200	100,0	3,8	1,5	1,9	1,5	0,04
300	82,1	2,3	1,3	1,6	0,9	0,04
500	89,3	2,3	1,2	1,9	1,5	0,04
80 дней культивирования						
0	96,4	4,2	2,7	5,9	6,2	0,07
100	96,4	4,7	1,7	4,9	5,8	0,06
200	100,0	4,5	1,9	5,0	5,9	0,06
300	71,4	3,8	0,5	4,4	5,3	0,06
500	82,1	3,4	1,4	4,4	5,5	0,06
110 дней культивирования						
0	92,8	5,1	2,5	7,5	9,2	0,06
100	96,4	5,0	1,8	6,2	7,7	0,06
200	100,0	4,8	2,0	6,8	8,0	0,06
300	71,4	4,6	1,7	5,8	7,5	0,05
500	82,1	4,1	1,6	5,2	6,5	0,05
140 дней культивирования						
0	92,8	5,3	3,2	12,1	9,5	0,08
100	96,4	5,5	2,2	14,1	8,5	0,1
200	100,0	5,1	2,4	13,9	9,2	0,1
300	71,4	5,1	2,1	13,3	8,8	0,1
500	82,1	4,9	1,9	13,7	7,5	0,1

В варианте с содержанием в питательной среде Цефотаксима в концентрации 100 мг/л увеличилось образование корней. При повышенных концентрациях (200 и 300 мг/л) отмечено четкое уменьшение числа корней, особенно на начальных этапах культивирования (40–80 дней). Длина корней уменьшилась по сравнению с контролем во всех вариантах с Цефотаксимом. Это повлияло на снижение длины ризогенной зоны (длина и число корней), наиболее существенное при содержании антибиотика в питательной среде – 500 мг/л.

Рост растений, облиственность, скорость роста и коэффициент полярности также были выше в контрольном варианте без применения Цефотаксима, то есть наблюдалось ингибирование ростовых процессов. И только через 140 дней культивирования улучшился рост растений, что можно объяснить разложением антибиотика (таблица 2).

**Таблица 2.** Влияние антибиотика Цефотаксим на рост и развитие пробирочных растений сорт Махроватчик, 2017–2018 гг.

Цефотаксим, мг/л	Жизнеспособных микрорастений, %	Корни		Высота растения, см	Число листьев, шт.	Скорость роста побега, см/сут.
		число, шт.	длина, см			
32 дней культивирования						
0,0	89,3	1,5	0,9	3,4	0,1	0,10
100,0	92,8	1,1	1,0	1,2	0,3	0,04
200,0	96,4	1,0	0,1	3,5	0,2	0,11
300,0	78,6	2,4	1,3	2,1	0,1	0,06
500,0	78,6	0,5	0,5	0,3	0,7	0,09
64 дней культивирования						
0,0	67,8	1,3	3,5	3,3	3,2	0,05
100,0	67,8	1,7	5,0	2,7	2,9	0,04
200,0	64,3	1,5	6,1	3,3	3,1	0,05
300,0	60,7	1,5	2,9	1,9	2,6	0,03
500,0	46,4	2,9	3,8	2,5	2,5	0,03
110 дней культивирования						
0,0	57,1	1,5	5,8	6,5	6,3	0,05
100,0	64,3	2,0	4,6	7,1	7,0	0,06
200,0	60,7	2,7	2,8	8,7	8,2	0,08
300,0	50,0	2,5	2,1	5,7	6,0	0,05
500,0	42,9	3,1	1,8	6,8	7,2	0,06
150 дней культивирования						
0,0	57,1	1,7	5,7	8,3	8,3	0,06
100,0	64,3	2,0	5,0	8,0	9,6	0,06
200,0	60,7	2,4	3,4	10,5	9,3	0,08
300,0	46,4	2,6	1,8	8,0	9,0	0,06
500,0	42,9	3,5	1,8	8,3	8,5	0,06

У растений сорта Махроватчик в начале культивирования приживаемость микрочеренков была достаточно высокой – 89,3 %, что предполагало невысокую инфицированность фитоплазмами (таблица 2). Однако при более продолжительном культивировании в течение 64 и, особенно 110 и 140 дней, возросла гибель от инфекции и приживаемость растений резко снизилась. Это можно объяснить наличием внутренней скрытой инфекции. На этом фоне резко снизилась приживаемость в вариантах с содержанием Цефотаксима 300 и 500 мг/л (46,4 и 42,9 % соответственно). На протяжении всего периода культивирования у этих растений отмечено уменьшение длины корней и длины ризогенной зоны, высоты растений и облиственности по сравнению с контрольным вариантом. Более высокая приживаемость отмечена при концентрациях антибиотика 100 и 200 мг/л: 64,3 и 60,7% соответственно. Растения в этих вариантах имеют более развитую ризогенную зону, рост и облиственность. Всё это позволяет рекомендовать для оздоровления от (таблица 3).

**Таблица 3.** Влияние добавления антибиотика Цефотаксим в питательную среду, на рост и развитие пробирочных растений сорт Цимлянский белый 2017–2018 гг.

Цефотаксим, мг/л	Приживаемость, %	Корни		Высота, см	Листья, шт.	Скорость роста, см/сут.
		число, шт.	длина, см			
32 дня культивирования						
0	50,0	2,1	1,7	2,6	2,1	0,08
100	100,0	2,3	1,6	2,7	2,9	0,08
200	89,3	1,9	1,0	1,8	2,8	0,06
300	85,7	1,5	0,7	1,7	2,2	0,05
500	85,7	1,7	1,0	1,8	2,6	0,06
64 дня культивирования						
0	50,0	3,4	2,7	7,0	6,0	0,10
100	100,0	3,2	2,6	7,0	5,8	0,10
200	89,3	2,9	3,4	6,2	6,5	0,09
300	85,7	3,2	1,1	5,3	5,9	0,08
500	85,7	3,0	1,1	5,6	7,0	0,09
104 дня культивирования						
0	50,0	3,5	2,7	9,8	8,2	0,09
100	100,0	3,5	2,2	9,8	8,6	0,09
200	85,7	3,7	1,5	8,4	8,5	0,08
300	82,1	3,5	1,1	7,4	8,3	0,07
500	75,0	6,6	1,2	7,5	8,5	0,07
140 дней культивирования						
0	50,0	3,9	2,8	13,4	11,5	0,10
100	100,0	3,7	2,6	13,5	12,6	0,10
200	85,7	3,5	1,6	10,9	11,5	0,08
300	82,1	3,9	1,1	9,4	10,5	0,06
500	75,0	3,5	1,4	9,2	11,7	0,06

Растения сорта Цимлянский белый в контрольном варианте имели низкую приживаемость – 50,0%, в основном, из-за гибели микрочеренков от инфекции. Введение Цефотаксима в питательную среду способствовало деконтаминации растений и повышению их приживаемости на 35,7–50,0 %. Лучшие показатели по приживаемости (100,0 %), развитию корневой системы и росту растений отмечены при концентрации антибиотика 100 мг/л. На достаточно высоком уровне находились эти показатели при концентрации 200,0 мг/л. Более высокие концентрации вызвали умеренное торможение ростовых процессов.

Таким образом, применение антибиотика Цефотаксим в количестве 100–200 мг/л способствует оздоровлению растений сорта Цимлянский белый от микоплазменной инфекции. При концентрациях 300 и 500 мг/л происходит умеренное снижение ростовых процессов. Благодаря этому, возможно рассматривать применение антибиотика для создания коллекции генофонда винограда *in vitro* (таблица 4).

**Таблица 4.** Влияние добавления антибиотика Цефотаксим в питательную среду, на рост и развитие пробирочных растений сорт Кабашный, 2017–2018 гг.

Цефотаксим, мг/л	Приживаемость, %	Корни		Высота, см	Листья, шт.	Скорость роста, см/сут
		число, шт.	длина, см			
32 дня культивирования						
0	69,6	1,7	1,3	1,8	1,6	0,06
100	100,0	1,7	1,6	1,7	1,7	0,05
200	85,7	1,8	1,2	1,7	1,4	0,05
300	80,7	1,9	1,3	2,2	1,9	0,07
500	64,3	2,5	1,0	2,5	2,5	0,09
62 дня культивирования						
0	64,3	2,0	1,9	5,9	4,1	0,1
100	100,0	2,4	1,8	7,2	5,7	0,1
200	82,1	2,7	1,7	6,0	4,9	0,1
300	78,6	2,5	1,7	7,4	5,1	0,1
500	64,3	3,9	1,2	6,2	5,0	0,1
94 дня культивирования						
0	64,3	2,7	2,1	9,9	6,5	0,1
100	100,0	3,3	1,8	11,6	7,3	0,07
200	82,1	3,5	1,5	10,7	7,2	0,11
300	78,6	3,4	1,4	11,2	7,1	0,12
500	60,7	4,9	1,3	10,4	8,2	0,11
147 дней культивирования						
0	64,3	3,3	2,4	12,1	9,9	0,08
100	96,4	3,9	2,0	14,1	9,7	0,09
200	78,6	4,0	1,8	13,9	10,2	0,09
300	78,6	3,7	1,8	13,3	9,5	0,09
500	57,1	5,1	1,7	13,7	12,3	0,09

Цефотаксим не оказал отрицательного влияния на рост растений. Наоборот, под его действием во всех вариантах произошло увеличение ростовых процессов: скорости роста и высоты растений. Таким образом, отмечено положительное влияние антибиотика Цефотаксим на растения сорта Кабашный, которое заключается в улучшении приживаемости и ростовых процессов растений.

На этапе микроразмножения исследовалось влияние плотности питательной среды на метаболизм растений винограда сортов Махроватчик и Цимлянский Сергиенко (клон Цимлянский черный). В состав питательной среды Мурасиге и Скуга, модифицированной П.Я. Голодригой, вводили агар-агар в количестве 6, 8, 10, 12, 13, 15 г/л. В каждом варианте опыта было 3 повторности по 28 растений в каждой (таблица 5).

**Таблица 5.** Влияние изменения плотности питательной среды при помощи агар-агара, на рост и развитие пробирочных растений Цимлянский Сергиенко (клон сорта Цимлянский черный), 2017–2018 гг.

Агар-агара	Приживаемость, %	Корни		Высота, см	Листья, шт.	Скорость роста, см/сут
		число, шт.	длина, см			
32 дня культивирования						
6,0 г/л (контроль)	100,0	3,7	0,9	1,2	0,6	0,03
8,0 г/л	100,0	3,5	1,0	1,3	1,3	0,04
10,0 г/л	100,0	3,0	1,2	1,7	1,2	0,05
12,0 г/л	100,0	2,5	1,2	1,2	1,0	0,03
77 дней культивирования						
6,0 г/л (контроль)	100,0	3,9	1,9	6,3	6,3	0,08
8,0 г/л	100,0	3,8	1,9	5,1	6,0	0,06
10,0 г/л	100,0	2,9	2,4	5,6	5,7	0,06
12,0 г/л	100,0	2,6	2,0	2,9	4,8	0,08
116 дней культивирования						
6,0 г/л (контроль)	97,1	4,7	2,3	12,1	11,4	0,1
8,0 г/л	100,0	4,6	2,3	11,6	11,7	0,1
10,0 г/л	100,0	4,2	2,7	10,9	10,9	0,1
12,0 г/л	100,0	3,6	2,4	11,3	10,8	0,1
170 дней культивирования						
6,0 г/л (контроль)	97,1	5,1	4,3	13,3	12,2	0,1
8,0 г/л	100	4,8	3,7	12,6	12,3	0,1
10,0 г/л	100	4,6	3,7	13,1	11,6	0,1
12,0 г/л	100	3,9	3,5	11,9	11,6	0,1

Оптимальное развитие растений отмечено при содержании агар-агара в питательной среде 6,0 г/л. Отмечена различная сортовая отзывчивость на уплотнение питательной среды. С увеличением плотности питательной среды незначительно снижается приживаемость микрочеренков и сохранность растений, происходит снижение интенсивности ростовых процессов: наиболее заметно уменьшаются число корней и длина ризогенной зоны.

Длина корней несколько увеличилась, но длина ризогенной зоны в сравнении с контрольным вариантом (6 мг/л) была также меньше в 1,4 раза при культивировании в течение 77 дней уменьшился рост растений в 2,2 раза и облиственность в 1,3 раза. У растений сорта Махроватчик на плотной питательной среде отмечалось более четкое уменьшение показателей числа и длины корней, а также высоты растений. После двух месяцев культивирования минимальные показатели роста зафиксированы при самой большой концентрации агар-агара - 15 г/л (таблица 6).

**Таблица 6.** Влияние плотности питательной среды, на рост и развитие пробирочных растений при депонировании, сорт Махроватчик, 2017–2018 гг.

Агар-агар	Приживаемость, %	Корни		Высота, см	Листья, шт.	Скорость роста, см/сут
		число, шт	длина, см			
34 дня культивирования						
6,0 г/л (контроль)	92,9	3,0	1,7	1,6	1,3	0,05
10,0 г/л	87,9	3,5	2,2	2,0	1,5	0,06
13,0 г/л	95,0	3,2	2,1	2,6	1,9	0,08
15,0 г/л	92,9	2,7	2,2	2,1	1,6	0,06
НСР 0,95		–	–	0,48	–	
62 дня культивирования						
6,0 г/л (контроль)	85,7	4,1	2,6	3,7	3,6	0,05
10,0 г/л	85,7	3,6	2,6	3,9	3,2	0,06
13,0 г/л	92,9	3,0	2,5	3,9	3,6	0,06
15,0 г/л	92,9	2,8	2,0	3,6	3,5	0,05
НСР 0,95	–	0,7	–	–	–	

Таким образом, плотность питательной среды может оказывать влияние на ростовые процессы растений в культуре *in vitro*, что следует проверить при дальнейшем культивировании [10].

**Выводы.** Установлено что наиболее эффективными концентрациями антибиотика Цефотаксима при деконтаминации от фитомикоплазменной инфекции пробирочных микрорастений аборигенных донских сортов являются 100,0 и 200,0 мг/л. При этих концентрациях отмечена максимальная приживаемость растений, значительного ингибирования роста не происходило. Увеличение концентрации агар-агара в среде на начальном этапе культивирования стимулирует рост побега и корней. При дальнейшем культивировании скорость роста при повышенных концентрациях снижается.

### Литература

1. Алиев А.М., Кравченко Л.В., Наумова Л.Г. Происхождение донских сортов винограда // Виноделие и виноградарство. 2005. № 3. С. 27–29.
2. Дорошенко Н.П., Хохлова М.А. Способ создания коллекции генофонда «*in vitro*» // Виноград и вино России. 1993. № 6. С. 18–19.
3. Дорошенко Н.П., Соколова Г.В. Промышленная технология производства оздоровленного посадочного материала винограда // Промышленное производство оздоровленного посадочного материала плодовых, ягодных и цветочно-декоративных культур. Москва, 1998. С. 211.
4. Дорошенко Н.П. Клональное микроразмножение и оздоровление посадочного материала винограда для создания из него сортовых маточников интенсивного типа (рекомендации) Москва, 1992.

5. Уайт Ф.Р. Культура растительных тканей. М.: Иностранная литература, 1949. 160 с.
6. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 272 с.
7. Методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда / П.Я. Голодрига [и др.] // ВНИИВиПП «Магарач». Ялта, 1986. 56 с.
8. Дорошенко Н.П. Клональное микроразмножение и оздоровление посадочного материала винограда для создания из него сортовых маточников интенсивного типа (рекомендации) / Министерство сельского хозяйства и продовольствия РСФСР. Москва, 1992.10. Дорошенко Н.П. Оздоровление винограда от хронических болезней методом водной терапии // Виноделие и виноградарство. 2004. № 6. С. 24–26.
9. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами обработки результатов исследований). М.: Колос, 1985. 377 с.
10. Дорошенко Н.П., Венценосцева Н.С. Оздоровление от фитоплазменной инфекции при культивировании *in vitro* // Русский виноград. 2020. Т 11. С. 50–59.
11. Дорошенко Н.П., Пузырнова В.Г., Венценосцева Н.С. Плотность питательной среды при культивировании винограда *in vitro* // Русский виноград. 2019. Т 9. С. 13–19.