

УДК 634.8

**ПРИЖИВАЕМОСТЬ И КИНЕТИКА РОСТОВЫХ ПРОЦЕССОВ
РАЗЛИЧНОГО ТИПА МИКРОЧЕРЕНОКОВ ВИНОГРАДА IN VITRO**

**SURVIVAL RATE AND KINETICS OF GROWTH PROCESSES OF VARIOUS TYPES
OF VINE MICRO-CUTTINGS IN VITRO**

В.Г. Пузырнова, Н.П. Дорошенко

Всероссийский научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия имени Я.И. Потепенко – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный Ростовский аграрный научный центр», Новочеркасск, Россия,
e-mail: valentina.puzirnova@yandex.ru

V.G. Puzirnova, N.P. Doroshenko

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: valentina.puzirnova@yandex.ru

Аннотация. Представлены новые данные об особенностях роста и развития растений винограда сортов Махроватчик и Белобуланый при субкультивировании в зависимости от места расположения донорских микрочеренков на побеге. Выделено 3 типа микрочеренков: 1 тип – 1–4 микрочеренок из нижней части побега, 2 тип – из средней части, 5–8 от основания побега; 3 тип – из верхней части побега, 9–12 от основания побега. При культивировании в условиях повышенной температуры и пониженной влажности воздуха лучшее развитие отмечено у растений сорта Махроватчик, сформированных из глазков средней части побега. Торможение роста побегов и более высокая жизнеспособность растений в течение всего периода культивирования позволяет считать 1 тип (низ) микрочеренков оптимальным для закладки коллекции, а микрочеренки верхней и средней части побега использовать при массовом размножении сорта Белобуланый. Доказана высокая регенерационная способность вызревших микрочеренков сорта Каберне Совиньон.

Ключевые слова: виноград, генофонд, коллекция *in vitro*, микрочеренок, микроразмножение.

Summary. New data on the peculiarities of the growth and development of plants of the Mahrovatchik and Belobulaniy grape varieties during subcultivation, depending on the location of donor micro-gears on the shoot, are presented. There are 3 types of micro gears: type 1–1–4 micro gears from the lower part of the shoot, type 2 – from the middle part, 5–8 from the base of the shoot; type 3 – from the upper part of the shoot, 9–12 from the base of the shoot. When cultivated in conditions of high temperature and low humidity, the best development was noted in the plants of the Mahrovatchik variety formed from the eyes of the middle part of the shoot. Inhibition of shoot growth and higher plant viability during the entire cultivation period allows us to consider type 1 (bottom) of micro-gears optimal for laying a collection, and micro-gears of the upper and middle part of the shoot to be used for mass reproduction of the Belobulaniy variety. The high regenerative ability of the ripened micro-gears of the Cabernet Sauvignon variety has been proven.

Keywords: vine, gene pool, *in vitro* collections, micro cuttings, micro propagation.

DOI: 10.32904/2712-8245-2023-26-41-48

Введение. Приживаемость, особенности роста и развития растений в культуре *in vitro* зависят от многих факторов: состава культуральной среды, физических условий культивирования (освещенность, температура) и качества исходного материала.

В статье рассматривается влияние вызревания микрочеренка (зеленый или одревесневший) и места его расположения на побеге (верх, низ, середина) на приживаемость, регенерацию, скорость роста побега и развитие корневой системы.

Исследователи отмечают видоспецифичный и даже сортоспецифичный ответ растений на вариации этого параметра. Так при изучении этого вопроса на этапе ввода меристем выявлено, что для сорта Каберне Совиньон оптимальными являются меристемы из почек нижней и средней части побегов [1]. На этапе микрочеренкования во ВНИИВиВ изучено влияние места расположения микрочеренка на побеге на развитие из него растения. Этот аспект был изучен на сортах: Фиолетовый ранний, Платовский, Каберне Совиньон, Кобер 5 ББ [2].

У растений сорта Платовский лучшее развитие отмечено у растений, инициированных из средней и, особенно, нижней части побегов, более продолжительная сохранность растений в коллекции выявлена у растений из микрочеренков верхней части – 280 суток.

У сорта Фиолетовый ранний растения, инициированные из верхней части побегов, при стопроцентной приживаемости, сохранились в течение 341 суток, в то время как растения из нижней части побегов сохранились лишь 117 суток, а растения из средней части побегов 147 суток.

Лучшая приживаемость, образование корней и сохранность растений сорта Каберне Совиньон отмечена у микрочеренков, выделенных из верхней части побегов. Продолжительность их беспересадочного культивирования составила 375 дней. Высокая приживаемость, развитие ризогенной зоны, побегов и их облиственности, высокая скорость роста наблюдалась у микрочеренков из средней части растений. Однако продолжительность их культивирования составила 230 суток. Более продолжительное хранение отмечено у растений, полученных из микрочеренков нижней части побегов (313 суток).

Совершенно иное положение выявлено, при культивировании растений из разных частей побега у сорта Кобер 5ББ. Растения, полученные из верхней части побегов, интенсивно развивались в течение 230 дней. У них отмечено образование большего числа корней и увеличение их длины, что обеспечило увеличение длины ризогенной зоны. Также выявлено увеличение роста побегов, их облиственности, увеличение скорости роста растений. Растения из нижней части побегов находились на культивировании 313 суток, а затем были сняты из-за высыхания. Следует отметить их слабое развитие на протяжении всего периода культивирования. Растения, полученные из средней части побегов, характеризовались хорошим развитием, как корней, так и побегов. На 375 сутки культивирования сохранилось 42,9 % растений.

То есть, установлено четкое влияние местоположения исходных микрочеренков на побеге на регенерацию, рост и развитие, продолжительность беспересадочного культивирования сформированных растений в коллекции *in vitro* и выявлена различная реакция сортов винограда на этот фактор [3].

Доказано [4], что при хранении в коллекции вызревших растений, продолжительность беспересадочного культивирования можно увеличить до 3–4х лет. В связи с этим необходимо изучить приживаемость и ход ростовых процессов, вызревших микрочеренков в сравнении с обычными зелеными микрочеренками при клональном микроразмножении.

Изучение возраста растения донора *Cedrela montana* в культуре *in vitro* показало, что разница в органогенном потенциале существует и ювенильный этап предпочтительнее для отбора эксплантов [3]. К аналогичным выводам привели исследования на Пассифлоре (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*) [4].

В турецком институте садоводства ученые сравнили 3-х и 5-ти летние растения в качестве доноров и два типа эксплантов (верхушка побега и боковые почки). В результате было определено, что влияние типа экспланта было значительнее, чем возраст растения-донора. Экспланты из верхушки побега лучше приживались и развивались, образовывали больше корней. Существенной разницы между донорами по возрасту не выявлено [5].

Цель исследования – выявить влияние местоположения микрочеренков на побеге на интенсивность ростовых процессов, сохранность жизнеспособных растений, продолжительность беспересадочного культивирования в коллекции *in vitro* у абoriginalных сортов винограда Махроватчик и Белобуланый. А также выявить регенерационную способность вызревших микрочеренков в сравнении со стандартными зелеными

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 [6]. Р.Г. Бутенко [7]; П.Я. Голодрига и др., [8], усовершенствованным в лаборатории биотехнологии ВНИИВиВ – филиал ФГБНУ ФРАНЦ [9, 10]. Все работы в лаборатории биотехнологии проведены с соблюдением строгой стерильности. Предметом исследования были растения *in vitro* сортов винограда Каберне Совиньон, Махроватчик, Белобуланый.

Для опытов отбирали пробирочные растения в хорошем состоянии визуально здоровые. В операционной комнате в ламинарном боксе «Фортран» осуществляли микрочеренкование растений. Типы эксплантов: 1 тип – микрочеренки из нижней части побега, 1–4 глазок от основания побега; 2 тип – микрочеренки из средней части побега, 5–8 глазок от основания побега; 3 тип – микрочеренки из верхней части побега, 9–12 глазок от основания побега. Полученные микрочеренки высаживали по одному в пробирку на твердую питательную среду Мурасиге и Скуга следующего состава мг/л: макроэлементы: NH_4NO_3 – 138, KNO_3 – 950, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) – 185, KH_2PO_4 – 68, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 166; микроэлементы: H_3BO_3 – 6,2, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) – 22,3, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,025, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,025, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 8,6, Na_2MoO_4 – 0,25, KJ – 0,83; хелат железа: железо серноокисное 7-водное $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 27,8, трилон-Б- $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ – 37,3; витамины: мезоинозит – 50, тиамин HCl – 0,2; ИУК-0,1–3 мг/л; pH среды перед автоклавированием 5,7–5,9. В каждом варианте

опыта было 3 повторности, в повторности 10 растений. Культивирование осуществляли в культуральной комнате при освещенности 3,0 тыс. люксов, фото-периоде – 16 /8 часов, температуре $25 \div 27 \pm 2^\circ\text{C}$, влажности воздуха $70 \div 75\%$.

Показатели, учитываемые при регенерации и сохранении растений: приживаемость, гибель от инфекции, гибель из-за отсутствия развития, число корней, длина корней, средняя длина корня, ризогенная зона, высота растений, количество листьев всего и на 1 см побега, скорость роста, коэффициент полярности.

Обсуждение результатов. На донских аборигенных сортах Махроватчик и Белобуланый исследовали влияние типа микрочеренков на их дальнейшее развитие (таблица 1).

Таблица 1. Приживаемость, рост, развитие растений, инициированных из разных частей побега, сорт Махроватчик, 2022 г.

Вариант	Приживаемость, %	Корни			Высота, см	Листьев на 1 см побега	Скорость роста, мм/сутки
		число, шт.	длина, см	ризогенная зона, см			
35 суток культивирования							
Верх	76,7	1,8	2,3	4,4	0,5	0,0	0,1
Середина	83,3	1,3	2,9	4,0	0,5	0,8	0,2
Низ	90,0	1,0	2,3	2,3	0,4	0,8	0,1
95 суток культивирования							
Верх	73,3	2,8	2,1	6,0	6,8	0,8	0,7
Середина	83,3	3,0	2,3	6,9	6,9	0,8	0,7
Низ	83,3	2,8	2,2	6,2	7,4	0,7	0,8
140 суток культивирования							
Верх	26,7	3,1	2,6	8,1	10,4	0,9	0,7
Середина	40,0	3,1	2,8	8,7	11,7	0,7	0,8
Низ	46,7	3,2	2,4	7,6	10,6	0,9	0,8

Исследования на сорте Махроватчик проводились при повышенных температурах (30°C) для имитации засухи. В таких условиях увеличилась гибель растений из-за усыхания во всех вариантах опыта. Через 140 суток культивирования сохранность растений, образовавшихся из глазков верхней части побегов, составила 26,7 %.

Максимальная сохранность отмечена у растений, сформировавшихся из микрочеренков нижней части побегов – 46,7 %. Среди таких показателей, как число и длина корней, размер ризогенной зоны, высота растений, облиственность, различия по вариантам опыта были незначительны, но, тем не менее, длина ризогенной зоны и высота растений имели более высокие показатели у растений, сформировавшихся из микрочеренков средней части побегов. Таким образом, при культивировании в условиях повышенной температуры и пониженной влажности воздуха лучшее развитие растений отмечено у растений,

сформированных из глазков средней части побегов. Изучение влияния места расположения микрочеренков на приживаемость, развитие и сохранность жизнеспособных, сформированных растений винограда сорта Белобуланый проводилось на протяжении 2021–2022 гг. (таблица 2).

Таблица 2. Рост и развитие растений, инициированных из разных частей побега, сорт Белобуланый, 2021–2022 гг.

Часть побега	Приживаемость / сохранность, %	Корни			Высота, см	Листья, шт.	
		число, шт.	длина, см	ризогенная зона, см		всего	на 1 см
33 суток культивирования							
Верх	100	2,0	2,6	4,9	4,0	4,8	1,1
Средина	100	2,5	1,6	3,9	3,2	3,5	1,1
Низ	96,7	2,2	1,9	4,3	2,8	3,0	1,1
67 суток культивирования							
Верх	100	2,5	3,0	7,5	7,2	9,2	1,3
Средина	96,7	2,7	2,5	6,8	6,8	7,7	1,2
Низ	96,7	2,8	3,0	8,4	6,1	7,5	1,2
100 суток культивирования							
Верх	100	2,8	3,4	9,5	8,5	13,1	1,5
Средина	96,7	2,9	2,8	8,1	8,4	10,9	1,3
Низ	96,7	3,1	3,2	9,8	7,4	11,3	1,5
135 суток культивирования							
Верх	100	2,8	3,7	10,7	9,2	14,7	1,7
Средина	96,7	3,5	2,9	10,2	8,6	11,9	1,4
Низ	96,7	3,9	3,4	13,1	7,8	11,3	1,5
170 суток культивирования							
Верх	100	3,6	3,6	13,0	9,8	14,7	1,5
Средина	96,7	3,9	3,2	12,5	8,5	13,0	1,7
Низ	96,7	4,0	3,8	15,2	8,4	11,7	1,4
258 суток культивирования							
Верх	70,0	3,6	3,6	13,0	11,2	14,8	1,3
Средина	73,3	3,9	3,2	12,5	10,4	13,0	1,3
Низ	76,7	4,0	3,8	15,2	9,8	1,7	1,2
295 суток культивирования							
Верх	53,3	3,6	3,6	13,0	11,8	17,4	1,5
Средина	63,3	3,9	3,2	12,5	10,8	15,3	1,4
Низ	63,3	4,0	3,8	15,2	10,2	15,3	1,5
328 суток культивирования							
Верх	26,7	3,6	3,6	13,0	14,1	20,1	1,4
Средина	20,0	3,9	3,2	12,5	15,7	18,5	1,2
Низ	26,7	4,0	3,8	15,2	13,9	18,9	1,4

Наибольший рост побегов в течение всего периода культивирования отмечен у растений, образовавшихся из микрочеренков верхней части растений. В первые 6 месяцев культивирования по всем вариантам опыта приживаемость

высокая (96,7–100 %). Начиная с 258 суток культивирования отмечены подсыхание и гибель растений, сохранность растений уменьшилась до 70 %, на 328 день культивирования до 26,7%.

Для растений, сформированных из микрочеренков нижней части побегов, характерно самое высокое в опыте образование корней и развитие ризогенной зоны, слабый рост побегов и высокий коэффициент полярности – в среднем 1,5 за весь период наблюдений. Этот показатель характеризует преимущественное развитие корней перед побегами. Такие особенности развития растений обеспечили достаточно высокую сохранность растений в коллекции.

Растения, созданные из микрочеренков средней части побегов, имели промежуточные показатели развития, средний коэффициент полярности равнялся 1,2, что указывает на некоторое преимущество в развитии ризогенной зоны перед побегами. Сохранность растений в коллекции была несколько меньше, чем в двух предшествующих вариантах.

Фотосинтетическая активность, содержание гормонов в разных частях растения неодинаковы. Вследствие полярности развития виноградного растения углеводы и другие продукты обмена движутся к активно растущим участкам. Поэтому часть побега, с которой был взят микрочеренок, оказывает влияние на приживаемость растений, ризогенез, развитие побегов, скорость роста, соотношение между ростом корней и побегов и продолжительностью нахождения растений в культуре *in vitro*. Зная это, необходимо выбирать такое местоположение микрочеренков, которое будет способствовать массовому тиражированию оздоровленных растений или продолжительному беспересадочному хранению растений в культуре *in vitro*. У сорта Белобуланый максимальные показатели высоты зафиксированы у растений из микрочеренков верхней и средней части побега, а максимальные значения ризогенной зоны у растений из микрочеренков нижней части побега.

В эксперименте по изучению вызревания микрочеренков на сорте Каберне Совиньон мы сравнили микрочеренки с вызревшей лозой и зеленые. Вызревание лозы составляло 70,0 %.

Микрочеренки из вызревшей и невызревшей части побега были высажены на культуральную среду Мурасиге и Скуга и культивировались в одинаковых условиях.

Скорость роста растений из зеленых микрочеренков выше. Показатели высоты и размера ризогенной зоны превышают аналогичные значения вызревших микрочеренков (таблица 3).

Это можно объяснить тем, что в период вызревания лозы ростовые процессы в растении замедлены. Фотосинтетическая деятельность, интенсивность дыхания корней, как и листьев, по мере старения снижается. Имеются также данные о том, что цитокинины уменьшаются во время созревания древесины [13].

Таблица 3. Развитие растений винограда сорта Каберне Совиньон из вызревших и зеленых микрочеренков, 2022–2023.

Черенок	Приживаемость, %	Корни			Высота, см	Число листьев, шт.		Скорость роста, мм/ сутки
		число, шт.	длина, см	ризогенная зона, см		всего	на 1 см побега	
30 дней культивирования								
Вызревший	95	2,0	0,9	1,8	1,0	1,0	1,0	0,3
Зеленый	83,9	2,3	1,2	2,8	2,2	2,2	1,0	0,7
110 дней культивирования								
Вызревший	81	2,3	3,0	6,9	7,5	6,2	0,8	0,7
Зеленый	79,2	2,6	3,3	8,6	9,8	8,2	0,8	0,9
150 дней культивирования								
Вызревший	81	2,8	2,6	7,3	13,1	11,0	0,8	0,7
Зеленый	75,7	3,4	3,5	11,9	14,0	13,3	1,0	0,9

В зеленых побегах процессы роста протекают по-прежнему активно. Этим можно объяснить разницу в показателях роста надземной и ризогенной зон микрочеренков одревесневших и невызревших.

Выводы.

1. В результате исследований установлено, что место расположения микрочеренков оказывает влияние на приживаемость растений, ризогенез, развитие побегов, скорость роста и продолжительностью нахождения жизнеспособных растений в культуре.

2. При культивировании в условиях повышенной температуры и пониженной влажности воздуха лучшее развитие отмечено у растений сорта Махроватчик, сформированных из глазков средней части побега. Достаточно высокое число сохранившихся жизнеспособных растений при культивировании в течение 140 суток позволяет считать этот тип микрочеренков оптимальным донором в этих условиях.

3. В течение всего периода культивирования сорта Белобуланый не проявилась разнокачественность микрочеренков в отношении приживаемости и жизнеспособности сформированных растений, разница между вариантами была незначительной.

4. Разнокачественность микрочеренков оказала более четкое влияние на интенсивность ростовых процессов. Выявлено усиленное развитие ризогенной зоны под действием микрочеренков 1 типа (низ), усиленный рост побегов при 3-ем типе микрочеренков (верх). Промежуточное положение занимали микрочеренки 2 типа (середина). Торможение роста побегов и более высокая жизнеспособность растений в течение всего периода культивирования позволяет считать 1 тип (низ) микрочеренков оптимальным для закладки коллекции, а

микрочеренки верхней и средней части побега использовать при массовом размножении сорта.

5. Сравнительное испытание вызревших и зеленых микрочеренков растений сорта Каберне Совиньон показало высокую регенерационную способность вызревших микрочеренков. Доказана высокая приживаемость (81 %) и замедленное скорости роста (0,7 мм/сутки). Формирование коллекции из вызревших микрочеренков позволяет продлить, срок беспересадочного культивирования растений. Высокие темпы роста зеленых микрочеренков необходимы при массовом тиражировании растений.

Литература

1. Пузырнова В.Г., Дорошенко Н.П. Клональное микроразмножение сорта Каберне Совиньон // Русский виноград. 2022. Т. 19. С. 25–35.
2. Puzyrnova V.G., Doroshenko N.P. Choice of explant, its size and method of its placement in a test tube to increase the productivity of clonal micropropagation of Fioletoviy ranniy variety // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Ussurijsk, 20–21 июня 2021 года. – Ussurijsk, 2021. P. 022114.
3. Патент № 2764104 С1 Российская Федерация, МПК А01Н 4/00. Способ формирования коллекции и длительного депонирования винограда *in vitro* : № 2021111285 : заявл. 20.04.2021 : опубл. 13.01.2022 / Н.П. Дорошенко, В.Г. Пузырнова ; заявитель ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ РОСТОВСКИЙ АГРАРНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР".
4. Патент № 2797364 С1 Российская Федерация, МПК А01Н 4/00. Способ хранения в культуре *in vitro* растений винограда с вызревшей лозой. № 2022127205: заявл. 18.10.2022 : опубл. 05.06.2023 / Н.П. Дорошенко, В.Г. Пузырнова, Н.В. Венценосцева; заявитель ФГБНУ "Федеральный Ростовский аграрный научный центр"
5. Effects of donor plant age and explants on *in vitro* culture of *Cedrela montana* Moritz ex Turcz / S. Basto, C. Serrano, B. Hodson, E. Jaramillo // Univ. Sci. [online]. 2012, vol.17, n.3 [cited 2023-07-25], P. 263–271.
6. Becerra D., Forero A., Góngora G. Age and Physiological Condition of Donor Plants Affect *in vitro* Morphogenesis in Leaf Explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2004. 79. 87–90.
7. Hatice Büşra Yavuz, Nuray Çömlekçioğlu. Effects of Donor Plant Age and Explant Types on Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) Micropropagation // International Journal of Agriculture Forestry and Life Sciences. 2022. № 6. P. 12–17.
8. Уайт Ф.Р. Культура растительных тканей. М.: Иностранная литература, 1949. 160 с.
9. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 272 с.
10. Методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда / П.Я. Голодрига [и др.] // ВНИИВиПП «Магарач». Ялта, 1986. 56 с.
11. 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.
12. Дорошенко Н.П. Клональное микроразмножение винограда (рекомендации). Новочеркасск: Изд-во ГНУ ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко, 2012. 12 с.
13. Вальдес А.Е., Фернандес Б., Сентено М.Л. Изменения эндогенных уровней цитокининов после прививки *Pinus radiata* подтверждают соотношение цитокининов как показатель старения и силы // Физиологии растений. 2003. № 160 (11). С. 1407–1410.