

МОРФО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
ФОРМИРОВАНИЯ ДИАФРАГМЫ
У *IN VITRO* И *EX VIRO* РАСТЕНИЙ ВИНОГРАДА
МЕЖВИДОВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

С.В. АКимова^{1,2}, В.В. КИРКАЧ³, А.К. РАДЖАБОВ¹,
Г.Э. ТЕР-ПЕТРОСЯНЦ¹, М.Б. ПАНОВА¹, М.А. ЕРМОРИНА¹

(¹ Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева;

² Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии;

³ Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр
»Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»)

При клональном микроразмножении сорта винограда межвидового происхождения Московский белый (Vitis amurensis Rupr. × Vitis vinifera L.) выявлено, что на 40-й день этапа мультипликации микрорастения характеризуются моноподиальным типом ветвления и во всех узлах микропобегов отсутствует диафрагма. На 120-й день доращивания в контейнерах выявлено, что с 1 по 6 узлы побегов растения имеют моноподиальный тип ветвления; в 7 узле присутствуют паренхимные клетки, которые образуют неполную диафрагму; с 8 узла появляется полностью сформированная диафрагма, и тип ветвления переходит на симподиально-моноподиальный.

Ключевые слова: клональное микроразмножение, виноград межвидового происхождения, субкультивирование, адаптация к нестерильным условиям, доращивание.

Введение

В средней полосе России распространению культуры винограда способствовало появление новых столовых сортов с коротким периодом вегетации, плоды которых успевают созреть за сравнительно короткое лето и дать высокий урожай с хорошим качеством ягод [1, 9]. В 2020 г. в Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию для возделывания в Центральном регионе РФ, рекомендовано 54 сорта винограда, разнообразных по урожайности, формам, размерам и вкусовым качествам плодов [5].

Среди наиболее ощутимых проблем в развитии виноградарства можно отметить отсутствие качественного посадочного материала и старение значительных площадей виноградных насаждений. Возраст около 70% всех виноградников в России составляет более 30 лет, значительная их часть уже вышла из возраста активного плодоношения. Для наращивания объемов площадей и создания высокотехнологичных виноградных насаждений требуется посадочный материал высокого качества [11].

В нашей стране особенно остро ощущается дефицит сертифицированного посадочного материала винограда. Собственное производство в последние годы составляло около 3,5 млн саженцев в год при уровне потребности в посадочном материале свыше 7 млн в год. Данный факт вынуждает закупать посадочный материал

за границей, хотя делать это все труднее в связи с неблагоприятной геополитической и экономической конъюнктурой [11].

Технология клонального микроразмножения в наши дни занимает одно из лидирующих мест в сфере производства посадочного материала [6–8]. Данная технология позволяет получать высококачественный посадочный материал, свободный от вирусов, вредителей и болезней, обеспечивающий продление эксплуатации виноградников и повышение их продуктивности. Кроме того, данная технология позволяет сохранять и восстанавливать исчезающие и редкие сорта винограда, что напрямую влияет на сохранность генофонда. Именно поэтому совершенствование технологии клонального микроразмножения винограда является актуальной и приоритетной задачей отрасли [3, 10].

В производстве посадочного материала виноградаря зачастую сталкиваются с проблемой плохой укореняемости некоторых сортов винограда, в генотипе которых присутствует доля североамериканских видов [2]. Та же проблема проявляется на некоторых филлоксероустойчивых подвоях, как правило, имеющих североамериканское происхождение. В частности, подвой на основе вида *Vitis berlandieri* Planch. показывают неудовлетворительные результаты при классических технологиях вегетативного размножения винограда (зимняя прививка, размножение одревесневшими черенками).

Цель исследований: при клональном микроразмножении винограда межвидового происхождения изучить морфо-биологические особенности формирования диафрагмы у *in vitro* и *ex vitro* растений.

Материал и методы исследований

Опыты проводили в 2020–2021 гг. в отделах биотехнологии и ягодных культур, виноградарства, декоративных и редких культур УНПЦ садоводства и овощеводства имени В.И. Эдельштейна РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева. Объектом исследований служил сорт винограда межвидового происхождения Московский белый.

На этапе мультипликации микрорастения высаживали на питательную среду с минеральными сорлями по прописи Мурасига и Скуга (MS) [12], обогащенную следующими веществами, мг/л: тиамин (B1); пиридоксин (B6); никотиновая кислота (PP) по 0,5; глицин – 1; 6-БАП – 0,1; инозитол – 100; сахароза – 30000; агар-агар – 7000. На этапе ризогенеза питательная среда по прописи Мурасига и Скуга (MS) содержала минеральные микро- и 1/2 макросоли, а также следующие органические вещества, мг/л: витамины тиамин (B1); пиридоксин (B6); никотиновую кислоту (PP) – по 0,5; ИМК – 0,5; сахарозу – 15000; агар-агар – 7000.

В ламинарном боксе в каждый сосуд помещали по 10 микрочеренков длиной в 2–3 узла и далее инкубировали в световой комнате при интенсивности освещения 2500 люкс, фотопериоде 16\8 и температуре 20–22°C. Длительность субкультивирования на обоих этапах составляла 40 дней.

Пересадку укорененных микрорастений на этапе адаптации к нестерильным условиям осуществляли в течение 40 дней после пассажа на укоренение. В качестве субстрата использовали смесь переходного обогащенного торфа «Пельгорское-М» и перлита в соотношении 3:1, посадку осуществляли в пластиковые кассеты (49 ячеек, 4 × 4 см). Субстрат обрабатывали фунгицидом «Максим» – 20 мл/10 л. Далее, после 40 дней адаптации, адаптированные *ex vitro* растения пересаживали на доращивание в контейнеры объемом 1,06 л и переносили в отсек для доращивания.

У опытных растений винограда после 40 дней субкультивирования на этапе мультипликации и 120 дней доращивания в контейнерах (рис. 1.) препарировали под стереомикроскоп STEMI 2000 все узлы с целью обнаружения диафрагмы. Срезы

выполняли с помощью медицинского скальпеля, далее их окунали в 5%-ный раствор йода, переносили на предметное стекло и фотографировали.

Результаты и их обсуждение

Виноград культурный имеет симподиально-моноподиальный тип ветвления побегов. За симподиальный рост отвечает диафрагма, которая образуется в результате смещения конуса нарастания, индуцирует образование усика или соцветия и при вегетативном размножении зелеными или одревесневшими черенками часто препятствует успешному укоренению черенков. Вероятно, это связано с тем, что диафрагма сдерживает успешное перемещение гормоноподобных веществ по растению. Поэтому важно изучать морфо-биологические особенности формирования диафрагмы для совершенствования технологии клонального микроразмножения растений винограда различного происхождения.

При клональном микроразмножении сорта Московский белый, который является гибридом между видами *Vitis amurensis* Rupr. и *Vitis vinifera* L., выявлено, что после 40 дней субкультивирования на этапе мультипликации во всех узлах микропобегов нет диафрагмы. Это является признаком моноподиального роста микропобегов растений-регенерантов, и поэтому, вероятно, данный сорт легко размножается растяжением и делением микропобегов на микрочеренки.

В задачи исследований входило также определение порядкового номера узла, в котором начинается формирование диафрагмы и, следовательно, симподиально-моноподиальное ветвление в соответствии с генетическим происхождением сорта Московский белый.

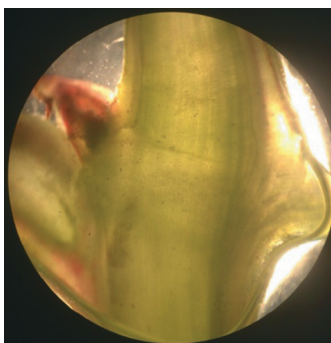
После 120 дней дорастивания в контейнерах выявлено, что в 7 узле побегов диафрагма отсутствует, однако присутствует значительное количество окрашенных паренхимных клеток, которые, вероятно, образуют неполную диафрагму, присущую моноподиальному типу ветвления. Анализ продольного среза 8 узла выявил наличие полностью сформированной диафрагмы (рис. 3).

Известно, что моноподиальный тип ветвления на первых нескольких узлах характерен для растений винограда, выращенных из семян. Поэтому можно предполагать, что технология клонального микроразмножения способствует реювенилизации исследуемых растений и усиливает способность к вегетативному размножению.

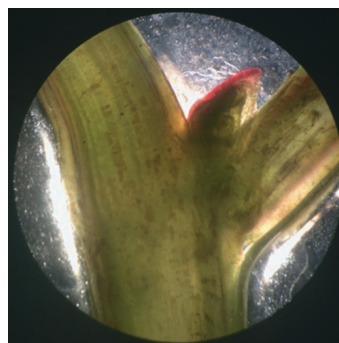


Рис. 1. Объекты исследований: *in vitro* растения; часть побега *ex vitro* растения с начиная с 7 узла

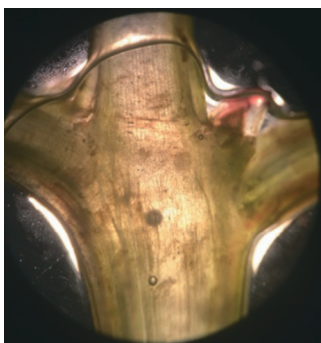
1-й узел



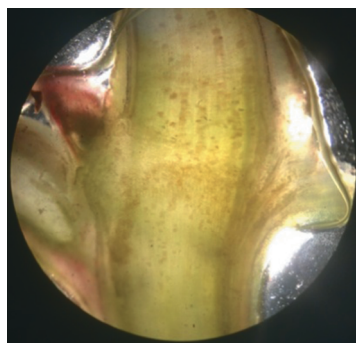
2-й узел



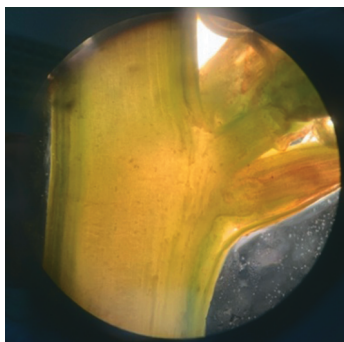
3-й узел



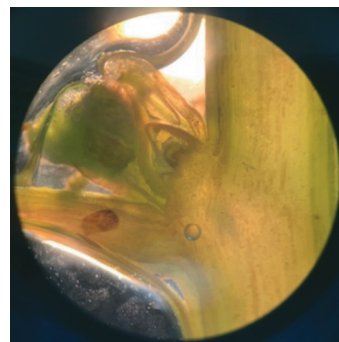
4-й узел



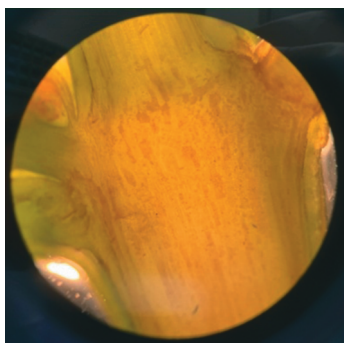
5-й узел



6-й узел



7-й узел



8-й узел

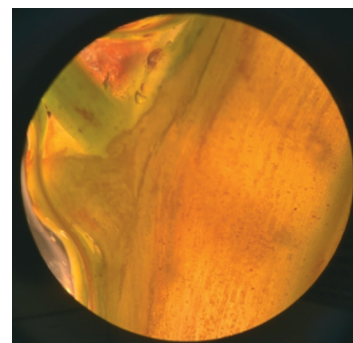
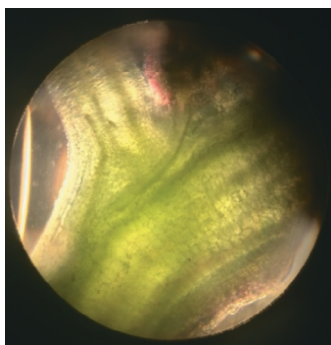
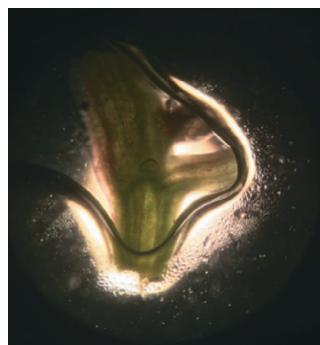


Рис. 2. Продольные срезы узлов опытных микрорастений после 40 дней субкультивирования на этапе мультипликации (сорт Московский белый)

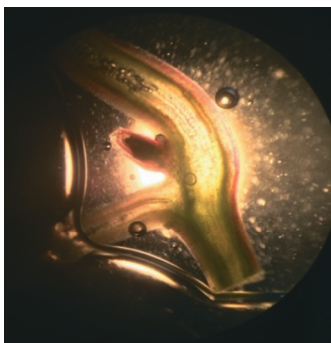
1-й узел



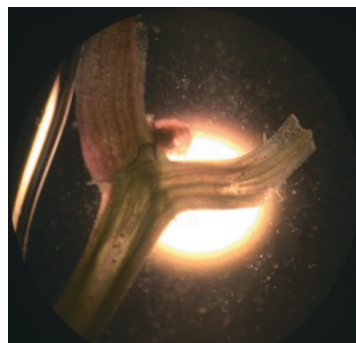
2-й узел



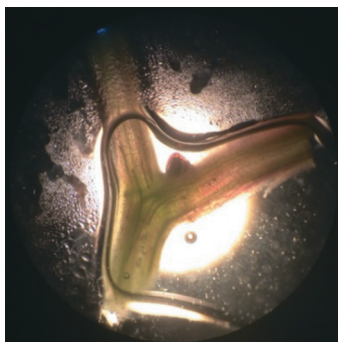
3-й узел



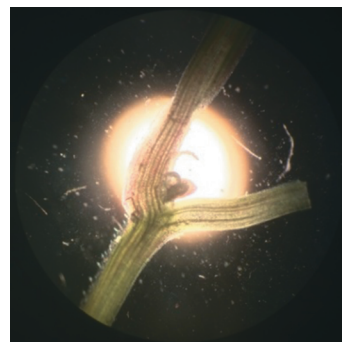
4-й узел



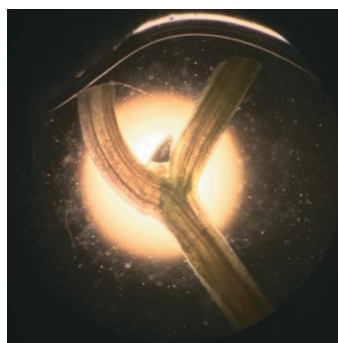
5-й узел



6-й узел



7-й узел



8-й узел

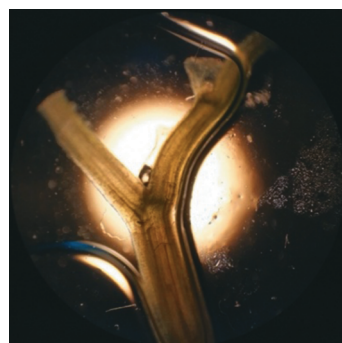


Рис. 3. Продольные срезы узлов опытных растений после 120 дней доращивания в контейнерах (сорт Московский белый)

Выводы

При клональном микроразмножении винограда сорта Московский белый, который является гибридом между видами *Vitis amurensis* Rupr. и *Vitis vinifera* L., выявлено, что на 40-й день субкультивирования на этапе мультипликации у микрорастений наблюдается моноподиальный тип ветвления микропобегов, так как во всех узлах нет диафрагмы, поэтому данный сорт легко размножается *in vitro*. После 120 дней дорастивания в контейнерах выявлено, что с 1 по 6 узлы побегов нет диафрагмы и наблюдается моноподиальный тип ветвления; в 7 узле побегов присутствуют паренхимные клетки, которые образуют неполную диафрагму. Наличие полностью сформированной диафрагмы выявлено в 8 узле, и тип ветвления переходит в симподиально-моноподиальный.

Библиографический список

1. *Акимова С.В.* Разработка элементов технологии ускоренного клонального микроразмножения сортов винограда межвидового происхождения для зон рискованного виноградарства: Учебно-методическое пособие / С.В. Акимова, А.К. Раджабов, Д.А. Бухтин, В.В. Киркач. – М.: АНО Редакция журнала «МЭСХ», 2018. – 78 с.
2. *Акимова С.В.* Влияние биологически активных веществ кремнийорганической природы на укореняемость и дальнейшее развитие одревесневших и зеленых черенков винограда межвидового происхождения / С.В. Акимова, А.К. Раджабов, Д.А. Бухтин, М. Трофимова // Известия ТСХА. – 2015. – Вып. 4. – С. 36–48.
3. *Батукаев А.А.* Совершенствование технологии ускоренного размножения и оздоровления посадочного материала винограда методом *in-vitro*. – М., 1998. – 223 с.
4. *Бунцевич Л.Л.* Разработка составов питательных сред для интродукции в культуру *in vitro* эксплантов сортов малины и крыжовника / Л.Л. Бунцевич, Е.Н. Беседина, М.А. Костюк, М.В. Макаркина // Плодоводство и виноградарство юга России. – 2014. – № 28 (4). – С. 46–55
5. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию: Официальное издание. – Т. 1. Сорта растений. – М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2020. – 680 с.
6. *Деменко В.И.* Проблемы и возможности микроразмножения садовых растений. Введение в культуру // Известия ТСХА. – 2005. – № 2. – С. 48–58.
7. *Деменко В.И.* Биологические основы инновационных технологий вегетативного размножения садовых культур: Учебное пособие / В.И. Деменко, С.В. Акимова, В.В. Киркач, А.Н. Викулина. – М.: АНО Редакция журнала «МЭСХ», 2019. – 157 с.
8. *Кухарчик Н.В.* Вегетативное размножение плодовых и ягодных культур *in vitro* / Н.В. Кухарчик [и др.] // Генетические основы селекции растений: В 4 т. – Т. 3. Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия; Науч. ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. – Минск, 2012. – С. 289–315.
9. *Федоров А.В.* Совершенствование этапов клонального микроразмножения винограда (*Vitis vinifera* L.) / А.В. Федоров, Т.Г. Леконцева // Магарач. Виноградарство и виноделие. – 2019. – 21 (1). – С. 6–10.
10. *Шорников Д.Г.* Укоренение *in vitro* и адаптация нетрадиционных садовых культур / Д.Г. Шорников, М.Б. Янковская, С.А. Муратова // Материалы VIII Международной научно-методической конференции «Интродукция нетрадиционных и редких растений» (г. Воронеж, 2008 г.). – Воронеж, 2008. – Т. 1. – С. 335–337.

11. Щеголихина Т.А. Современное состояние и перспективы развития виноградарства в Российской Федерации / Т.А. Щеголихина // Научно-информационное обеспечение инновационного развития АПК. – 2019. – Секция 1. – С. 130–135.

12. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plantarum*. – 1962. – V. 3. – № 15 (3). – P. 473–497.

MORPHOBIOLOGICAL FEATURES OF DIAPHRAGM FORMATION IN *IN VITRO* AND *EX VITRO* GRAPE PLANTS OF INTERSPECIFIC ORIGIN

S.V. AKIMOVA^{1,2}, V.V. KIRKACH³, A.K. RADZHABOV¹,
G.E. TER-PETROSYANTS, M.B. PANOVA¹, M.YU. ERMOLINA

(¹ Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy;

²All-Russian Research Institute of Phytopathology,

³Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology”

of the Russian Academy of Sciences (Research Center of Biotechnology RAS)

Clonal micropropagation of grape varieties of interspecific origin Moscow white (Vitis amurensis Rupr. × Vitis vinifera L.) showed that on the 40th day of the animation stage, a monopodial type of branching is typical for micro-plants, and there is no diaphragm in all nodes of micro-shoots. On the 120th day of growing in containers, the researchers revealed that the nodes of the plant shoots, from the 1st to the 6th, have a monopodial branching type. Parenchymal cells which form an incomplete diaphragm are present in the seventh node. A fully formed diaphragm appears from the eighth node, and the branching type switches to a sympodial-monopodial one.

Key words: *clonal micropropagation, grape interspecific hybrid varieties, subcultivation, adaptation to non-sterile conditions, growing.*

References

1. Akimova S.V., Radzhabov A.K., Bukhtin D.A., Kirkach V.V. Razrabotka elementov tekhnologii uskorennoogo klonal'nogo mikrorazmnozheniya sortov vinograda mezhhvidovogo proiskhozhdeniya dlya zon riskovannogo vinogradarstva: uchebno–metodicheskoye posobiye [Development of technology elements for accelerated clonal micropropagation of grape varieties of interspecific origin for areas of risky viticulture: study guide]. Moscow: ANO redaktsiya zhurnala “MESKH”. 2018: 78. (In Rus.)

2. Akimova S.V., Radzhabov A.K., Bukhtin D.A., Trofimova M. Vliyanie biologicheskikh aktivnykh veshchestv kremniyorganicheskoy prirody na ukorenyaemost' i dal'neyshee razvitie odrevesnevshikh i zelenykh cherenkov vinograda mezhhvidovogo proiskhozhdeniya [Effect of biologically active substances of organosilicon nature on rooting and further development of lignified and green grape cuttings of interspecific origin]. Izvestiya TSKHA: Nauchno-teoreticheskiy zhurnal Rossiyskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta – MSKHA imeni K.A. Timiryazeva. 2015; 4: 36–48. (In Rus.)

3. Batukaev A.A. Sovershenstvovanie tekhnologii uskorennoogo razmnozheniya i ozdorovleniya posadochnogo materiala vinograda metodom in-vitro [Improving the technology of accelerated reproduction and healing of planting material of grapes using the in-vitro method]. Moscow. 1998: 223. (In Rus.)

4. Buntsevich L.L., Besedina E.N., Kostyuk M.A., Makarkina M.V. Razrabotka sostavov pitatel'nykh sred dlya introduksii v kul'turu *in vitro* eksplantov sortov maliny

и kryzhovnika [Development of nutrient media compositions for the introduction into *in vitro* culture of explants of raspberry and gooseberry varieties]. Plodovodstvo i vinogradarstvo yuga Rossii. 2014; 28 (4): 46–55. (In Rus.)

5. Gosudarstvenniy reestr selektsionnykh dostizheniy, dopushchennykh k ispol'zovaniyu. T.1. "Sorta rasteniy" (ofitsial'noe izdanie) [State register of breeding achievements approved for use. Vol. 1. "Plant Varieties" (official publication)]. Moscow: FGBNU "Rosinformagrotekh". 2020: 680. (In Rus.)

6. *Demenko V.I.* Problemy i vozmozhnosti mikroklonal'nogo razmnozheniya sadovykh rasteniy. Vvedenie v kul'turu [Problems and possibilities of micropropagation of garden plants. Introduction to the subject]. Izvetiya TSKHA. 2005; 2: 48–58. (In Rus.)

7. *Demenko V.I., Akimova S.V., Kirkach V.V., Vikulina A.N.* Biologicheskie osnovy innovatsionnykh tekhnologiy vegetativnogo razmnozheniya sadovykh kul'tur: ucheb. posobie [Biological bases of innovative technologies of vegetative propagation of garden crops: textbook]. Moscow: ANO Redaktsiya zhurnala "MESKH". 2019: 157. (In Rus.)

8. *Kukharchik N.V. et al.* Vegetativnoe razmnozhenie plodovykh i yagodnykh kul'tur in vitro. Geneticheskie osnovy selektsii rasteniy: v 4 t. T. 3. [Vegetative propagation of fruit and berry crops in vitro. Genetic foundations of plant breeding: in 4 volumes. V. 3]. Biotehnologiya v selektsii rasteniy. Kletochnaya inzheneriya. Minsk. 2012: 289–315. (In Rus.)

9. *Fedorov A.V., Lekontseva T.G.* Sovershensovovanie etapov klonal'nogo mikro-razmnozheniya vinograda (*Vitis vinifera* L.) [Improvement of the stages of clonal micropropagation of grapes (*Vitis vinifera* L.)]. Magarach. Vinogradarstvo i vinodeliye. 2019; 21 (1): 6–10. (In Rus.)

10. *Shornikov D.G., Yankovskaya M.B., Muratova S.A.* Ukorenenie in vitro i adaptatsiya netraditsionnykh sadovykh kul'tur [Rooting in vitro and adaptation of non-traditional horticultural crops]. VIII Mezhdunarodnaya nauchno-metodicheskaya konferentsiya "Introduktsiya netraditsionnykh i redkikh rasteniy". Voronezh. 2008; 1: 335–337. (In Rus.)

11. *Shchegolikhina T.A.* Sovremennoe sostoyanie i perspektivy razvitiya vinoradarstva v Rossiyskoy Federatsii [The current state and prospects for the development of wine making in the Russian Federation]. Nauchno-informatsionnoe obespechenie innovatsionnogo razvitiya APK-2019-sektsiya 1-S. 2019: 130–135. (In Rus.)

12. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Phisiol. Plantarum. 1962; V 3, 15 (3): 473–497.

Акимова Светлана Владимировна, канд. с.-х. наук, доцент кафедры плодородства, виноградарства и виноделия Института садоводства и ландшафтной архитектуры, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: asv11@yandex.ru).

Киркач Вадим Валерьевич, канд. с.-х. наук, старший научный сотрудник группы альгобиотехнологии Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук» (119071, Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2; e-mail: kirkach93@mail.ru).

Раджабов Агамагомед Курбанович, директор Института садоводства и ландшафтной архитектуры, заведующий кафедрой плодородства, виноградарства и виноделия, д-р с.-х. наук, профессор, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: plod@timacad.ru).

Тер-Петросянц Георг Эдвардович, аспирант и ассистент кафедры плодородства, виноградарства и виноделия, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: georgep.as117@yandex.ru).

Панова Мария Борисовна, доцент кафедры плодородства, виноградарства и виноделия Института садоводства и ландшафтной архитектуры, канд. с.-х. наук, доцент, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: zamdekanaplod@rgau-msha).

Ермолина Мария Юрьевна, магистр кафедры плодородства, виноградарства и виноделия, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: mary.ermolina@gmail.com).

Svetlana V. Akimova, PhD (Ag), Associate Professor, the Department of fruit growing, viticulture and winemaking, Institute of Horticulture and Landscape Architecture, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow (127550, Russian Federation; E-mail: asv11@yandex.ru).

Vadim V. Kirkach, Senior Research Associate, Algobiotechnology Groups, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences (Research Center of Biotechnology RAS) (33 build.2 Leninskiy Prospekt, Moscow (119071, Russian Federation; E-mail: kirkach93@mail.ru).

Agamagomed K. Radzhabov, DSc (Ag), Professor, Director of the Institute of Horticulture and Landscape Architecture, Head of the Department of fruit growing, viticulture and winemaking, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow (127550, Russian Federation; E-mail: plod@timacad.ru).

Georg E. Ter-Petrosyants, postgraduate student, assistant, the Department of fruit growing, viticulture and winemaking, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow (127550, Russian Federation; E-mail: georgep.as117@yandex.ru).

Maria B. Panova, PhD (Ag), Associate Professor, the Department of fruit growing, viticulture and winemaking, Institute of Horticulture and Landscape Architecture, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow (127550, Russian Federation; E-mail: zamdekanaplod@rgau-msha).

Maria Yu. Ermolina, MSc student, the Department of fruit growing, viticulture and winemaking, Institute of Horticulture and Landscape Architecture, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49 Timiryazevskaya Str., Moscow (127550, Russian Federation; E-mail: mary.ermolina@gmail.com).