

Blue в контейнерах (0,5л). Установлено, что до 56-го дня культивирования эффективно в качестве источника освещения применять светодиодные фитолампы (UnionPowerStar - 40W-T) с фотопериодом 16/8 часов, и вносить в субстрат минеральные удобрения $N_{16}P_{16}K_{16}$ (0,2 и 0,4 г/л) и $N_{15}P_{15}K_{15}(S_{10})$ (0,2 г/л).

На 56-й день культивирования во всех вариантах эксперимента с применением различных концентраций удобрений, независимо от источника освещения (за исключением $N_{16}P_{16}K_{16}$ в дозе 0,4 г/л при LED) выявлены достоверные различия с контролем по индексам относительного содержания хлорофилла. В вариантах со светодиодным фитоосвещением лучшие достоверные результаты были получены при применении $N_{16}P_{16}K_{16}$ (0,2 г/л), $N_{15}P_{15}K_{15}(S_{10})$ (0,4 г/л), где индексы относительного содержания хлорофилла составили $414,3 \pm 38,31$ - $452,7 \pm 27,93$ по сравнению с $333,7 \pm 12,68$ в контроле; в вариантах с естественным освещением при использовании удобрения $N_{15}P_{15}K_{15}(S_{10})$ (0,2 г/л) индексы относительного содержания хлорофилла составили $426,0 \pm 25,96$ по сравнению с $273,3 \pm 10,14$ в контроле.

1.5. Введение в культуру in vitro винограда межвидового происхождения (С.В.Акимова, В.В.Киркач, А.К.Раджабов, М.Б.Панова, Г.Э.Тер-Петросянц)

В средней полосе России виноград культивируется сравнительно недавно, так как довольно долгое время эта культура считалась неперспективной для погодных условий Нечерноземной зоны. Распространению культуры 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 (Акимова, 2018; Федоров, 2019).

В 2020 году 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. Сортимент современных сортов винограда для Нечерноземной полосы в основном представляет собой межвидовые гибриды, зачастую на основе *V. amurensis*, *V. riparia*, *V. labrusca*, что влечет за собой проблемы, связанные с их вегетативным размножением (Батукаев, 1998; Деменко, 2005; Акимова, 2018).

Поэтому в настоящее время наблюдается недостаток качественного посадочного материала винограда межвидового происхождения, поэтому одним из перспективных направлений исследований в области вегетативного размножения данной культуры является оптимизация этапов технологии клонального микроразмножения (Шорников, 2008).

Клональное микроразмножение - современный интенсивный способ массового бесполого размножения растений в культуре тканей и клеток, при котором полученные растения генетически идентичны исходному экземпляру (Акимова, 2018; Деменко, 2019; Катаева, 1983). При его использовании происходит освобождение тканей микропобегов от возбудителей многих заболеваний, снижающих урожайность до 30-80 % (Hedtrich, 1983), а реювенилизация организма после культуры *in vitro* усиливает способность к вегетативному размножению (Pliego-Alfare, 1988). Технология клонального микроразмножения позволяет за короткий срок получать большое количество посадочного материала, более тысячи растений в год из одной введенной в культуру меристемы, что в сотни раз больше, чем при использовании традиционных методов вегетативного размножения (Акимова, 2019).

При введении в культуру *in vitro* меристематических верхушек от начала роста до развития меристематического апекса в полноценный конгломерат микропобегов, пригодный для микрочеренкования, проходит достаточно длительный период времени. Иногда при микроразмножении растений в качестве эксплантов можно использовать уже организованные структуры (пазушные почки или микрочеренки). Известно, что при использовании крупных эксплантов наблюдается высокая скорость нарастания тканей микрорастений и пробуждения почек, активная пролиферация в последующих

пассажах и простота работы (Кухарчик, 2012; Anderson-Cook, 2014), однако может наблюдаться сдержанный рост растений-регенерантов или проявляться латентная грибная и бактериальная инфекция. Стоит отметить, что коэффициент мультипликации у микрорастений полученных из крупных эксплантов как правило ниже, чем у микрорастений полученных из меристематических апексов.

По методикам общепринятым в технологии клонального микроразмножения винограда инициальные экспланты высаживают на питательную среду по прописи Мурасига и Скуга без добавления синтетических цитокининов (Абдулалишоева, 2016; Акимова, 2018). Однако многие исследователи, работавшие с культурой *in vitro*, указывают на значительные видовые и даже сортовые различия растений по потребностям к минеральному и гормональному составу питательной среды и требуют индивидуального подбора компонентов для эффективного роста и развития микрорастений (Бунцевич, 2014; Деменко, 2005). Поэтому было принято решение выявить целесообразность использования для введения опытных эксплантов в культуру *in vitro* питательной среды по прописи Кворина Лепуавра с добавлением 6-БАП в концентрации 0,1 мг/л.

Цель исследований - выявить оптимальный тип эксплантов и питательную среду обеспечивающий рост введенных в культуру *in vitro* микрорастений на этапе мультипликации.

Опыты проводили в 2019-2020 годах в отделах биотехнологии и виноградарства лаборатории плодоводства РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева.

Объектом исследований служил сорт винограда межвидового происхождения Алёшенькин. При введении в культуру *in vitro* сначала нарезают верхушки побегов длиной 2-3 см, затем очищают их с помощью щётки и моющего средства, далее промывают их в течение 30 минут под проточной водой с последующим непрерывным перемешиванием в течение 15 минут в растворе фунгицида Фундазол в концентрации 1 г/л. Стерилизацию эксплантов проводят в асептических условиях ламинарного бокса сначала спиртом (70%)

в течение 1-2 секунд, затем раствором гипохлорита натрия (содержание активного хлора 3%) с анионными ПАВ 5 % в разведении 11 мл на 100 мл раствора в течении 10-15 минут. Удаление стерилизующего агента проводили трехкратно, промывая экспланты в стерильной воде. Далее под бинокулярной лупой вычленили инициальные экспланты и помещали их в пробирки на питательную среду. В качестве эксплантов были взяты боковые (латеральные) почки, меристематические апексы высотой 100-150 мкм с листовыми примордиями и микрочеренки размером 0,5-1,0 см.

Для введения эксплантов в культуру *in vitro* использовали питательную среду по прописи Кворина Лепуавра (QL) (Quoirin & Lepoivre, 1977) обогащенную следующими веществами (мг/л): тиамин (В1), пиридоксин (В6), никотиновая кислота (РР) - по 0,5; 6-БАП- 0,1; инозитол - 100; сахароза - 30000, агар-агар - 7000. В качестве контроля использовали питательную среду без синтетических гормонов (б/г) по прописи Мурасига и Скуга (MS) (Murashige, 1962) обогащенную следующими веществами (мг/л): тиамин (В1), пиридоксин (В6), никотиновая кислота (РР) - по 0,5; инозитол - 100; сахароза - 30000, агар-агар - 7000. Далее культуры в течение 70 дней инкубировали в световой комнате при интенсивности освещения 2500 люкс, 16-и часовом фотопериоде и температуре 20-22°C. Повторность опытов на данном этапе исследований трехкратная по 10 пробирок в одной повторности.

Далее через 70 дней после введения в культуру *in vitro* на этапе мультипликации были произведены два последовательных пассажа на питательную среду по прописи Мурасига и Скуга (MS) (Murashige, 1962) обогащенную следующими веществами (мг/л): тиамин (В1), пиридоксин (В6), никотиновая кислота (РР) – по 0,5; 6-БАП - 0,1, инозитол - 100; сахароза - 30000, агар-агар - 7000. Длительность периода субкультивирования составила 40 дней, на 20 и 40 день проводили учеты морфометрических показателей развития и коэффициента мультипликации растений-регенерантов. В ламинарном боксе в каждый сосуд помещали по 10 микрочеренков длиной в 2-

3 узла. Далее культуры инкубировали в световой комнате при интенсивности освещения 2500 люкс, 16-и часовом фотопериоде и температуре 20-22 °С.

Повторность опытов – трехкратная по 5 растений в одной повторности. Статистическую обработку результатов проводили по А.В. Исачкину с использованием программы Microsoft Office Excel 2007 (4552020). Их применение подтвердило достоверность полученных результатов.

Введение в культуру является самым сложным и затратным этапом в технологии клонального микроразмножения, продуктивность его, как правило, не высока, а затраты труда весьма существенны (Акимова, 2018; Акимова, 2019).

Помимо этого, так как маточные растения повсеместно заражены большим набором микроорганизмов, эффективная стерилизация растительных эксплантов и соблюдение правил асептики не исключают последующей бактериальной и грибной контаминации. Особенно ощутимы потери эксплантов от латентной бактериальной инфекции. По мере увеличения числа пассажей доля микрорастений со скрытой бактериальной инфекцией возрастает, что способно угнетать регенерацию и вызывать гибель культивируемых *in vitro* растительных объектов. Микробиологические исследования показали, что это в основном виды *Brevibacillus sp.*, *Moraxella sp.*, *Alcaligenes*, *Bacillus spp.*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Brevundimonas*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Kocuri*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Oceanobacillus*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Staphylococcus*, *Tetrasphaer spp* (Дунаева, 2015; Error! Reference source not found., 2020).

Помимо этого, в задачу этапа инициации стерильной культуры входит не только получение стерильных микрорастений, но и растений-регенератов способных к дальнейшему росту. Поэтому на данном этапе исследований было важно выявить оптимальный тип эксплантов и питательную среду для инициации стерильной культуры.

В результате проведенных экспериментов через 70 дней после введения в асептическую культуру установлено что, максимальное количество жизнеспособных инициальных эксплантов у обоих исследуемых сортов винограда получено при вычленении меристематических апексов и высадке их на питательную среду по прописи Кворина Лепуавра с добавлением 6-БАП в концентрации 0,1 мг/л.

При этом приживаемость как меристематических апексов, так и пазушных почек на питательной среде по прописи Кворина Лепуавра составила 50% против 16,6 % у эксплантов высаженных на питательную среду по прописи Мурасига и Скуга (Таблица 1.15).

Таблица 1.15

Динамика приживаемости сортов винограда межвидового происхождения сорта Алешенькин на этапе введения в культуру *in vitro* (%)

Вариант	Длительность субкультивирования на этапе введения в культуру		
	7 дней	14 дней	70 дней
	Меристематические апексы		
MS (б/г) (контроль)	66,6	16,6	16,6
QL (6-БАП 0,1 мг/л)	83,3	50,0	50,0
	Пазушные почки		
MS (б/г) (контроль)	66,6	33,3	16,6
QL (6-БАП 0,1 мг/л)	66,6	66,6	50,0
	Микрочеренки		
MS (б/г) (контроль)	100,0	66,6	16,6
QL (6-БАП 0,1 мг/л)	83,3	83,3	16,6
HCP ₀₅ a	0,61	0,99	1,32
HCP ₀₅ b	0,91	1,49	1,98
HCP ₀₅ ab	1,63	2,66	3,55

Основной задачей этапа мультипликации в технологии клонального микроразмножения является получение максимального количества растений-регенерантов не имеющих физиологических отклонений и идентичных исходному маточному растению, пригодных для дальнейшего микрочеренкования и ризогенеза.

На этом этапе решающую роль играют видовые и сортовые особенности культуры, способ введения в культуру *in vitro*, тип экспланта, его строение, происхождение, ориентация на питательной среде, её состав и условия субкультивирования (Деменко, 2019). Традиционно при клональном микроразмножении винограда происходит элонгация микропобегов в длину и последующее их деление на микрочеренки, несущие пазушные почки.

На данном этапе исследований было важно оценить последствие типа эксплантов используемых при введении в культуру *in vitro* на дальнейшее тиражирование исследуемых сортов винограда межвидового происхождения. Для этого были произведены два последовательных пассажа растений-регенерантов на питательную среду по прописи Мурасига и Скуга (MS) с добавлением 6-БАП в концентрации 0,1 мг/л и были произведены учеты морфометрических показателей развития на 20 и 40 день субкультивирования.

Как и следовало ожидать, с каждым пассажем увеличивался коэффициент мультипликации микрорастений, а также сохранилось преимущество мериклонов введенных в культуру меристематическими апексами.

На 40 день субкультивирования после *первого пассажа* у сорта Алешенькин средняя длина побегов у микрорастений, введенных в культуру меристематическими апексами, составила 10,2 см против 2,4-4,5 см у микрорастений, введенных в культуру пазушными почками и микрочеренками, средняя площадь листовой поверхности - 5,6 см² против 0,6-1,8 см², коэффициент размножения - 8,5 ед. против 2,0-3,7 ед.

На *втором пассаже* у опытных растений наблюдался эффект спонтанного ризогенеза на фоне элонгации микропобегов, особенно у микрорастений введенных в культуру микрочеренками.

Микрорастения введенные в культуру пазушными почками были потеряны из-за проявившейся латентной бактериальной инфекции. Что является одним из противопоказаний использования такого типа эксплантов, так как бактериальная инфекция, находящаяся в проводящей системе микрорастений, находится в латентном состоянии и зараженные экземпляры

внешне никак не отличаются, и часто отмечается факт появления бактериальной инфекции из проводящей системы микрорастений при пересадке на свежие питательные среды (3951988; Дунаева, 2015).

На 40 день субкультивирования также выявлено преимущество микрорастений введенных в культуру меристематическими апексами у которых средняя длина побегов составила 11,3 см против 5,3 см у микрорастений введенных в культуру микрочеренками, средняя площадь листовой поверхности - 4,5 см² против 1,9 см², коэффициент мультипликации - 9,6 ед. против 7,0 ед. (Таблица 1.16).

Таблица 1.16

Динамика изменения морфометрических показателей развития микрорастений винограда сорта Алешенькин межвидового происхождения при двух пассажах на этапе мультипликации

Тип экспланта при введении в культуру in vitro	Средняя длина побегов, см	Среднее количество побегов, шт.	Средняя суммарная площадь листовой поверхности, см ²	Спонтанный ризогенез, %	Коэффициент мультипликации ед.
<i>1 пассаж</i>					
20 день субкультивирования					
меристематические апексы	1,3	1,0	0,7	-	1,0
пазушные почки	0,8	1,0	0,2	-	1,0
микрочеренки	1,5	1,0	0,6	-	1,0
40 день субкультивирования					
меристематические апексы	10,2	1,0	5,6	-	8,5
пазушные почки	2,4	1,0	0,6	-	2,0
микрочеренки	4,5	1,0	1,8	-	3,7
НСР _{0,5}	0,50	-	0,19	-	0,25
<i>2 пассаж</i>					
20 день субкультивирования					
меристематические апексы	2,4	1,0	0,6	11,1	3,2
пазушные почки	2,3	1,0	1,8	0,0	2,0
микрочеренки	2,4	1,3	0,7	50,0	2,2
40 день субкультивирования					
меристематические апексы	11,3	1,4	4,5	33,3	9,6
пазушные почки	-	-	-	-	-

микрочеренки	5,3	1,3	1,9	87,5	7,0
НСР _{0,5}	0,41	-	0,14	0,81	0,22

При клональном микроразмножении винограда межвидового происхождения сорта Алешенькин оптимальным типом эксплантов для инициации стерильной культуры являются меристематические апексы высотой 100-150 мкм, которые целесообразно помещать на питательную среду по прописи Кворина Лепуавра (QL) с добавлением 6-БАП в концентрации 0,1 мг/л.

На этапе мультипликации по коэффициенту размножения растения-регенеранты введенные в культуру *in vitro* меристематическими апексами после *первого пассажа* в 2,3 раза и после *второго пассажа* в 1,4 раза превосходили микрорастения введенные в культуру микрочеренками. У микрорастений введенных в культуру пазушными почками на втором пассаже была выявлена латентной бактериальная инфекция.