

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ –
МСХА имени К.А. ТИМИРЯЗЕВА

УДК 631.589:634.8
ББК 41.318.5:42.36
Р17

Рецензент
канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией
культурных растений ГБС имени Н.В. Цицина РАН,
доцент кафедры декоративного садоводства и газооноведения
РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева
В.А. Крючкова

Авторы: **Акимова С.В., Раджабов А.К.,
Бухтин Д.А., Киркач В.В.**

Р17 Разработка элементов технологии ускоренного клонального микроразмножения сортов винограда межвидового происхождения для зон рискованного виноградарства: учебно-методическое пособие. – М., 2018. – 80 с.
ISBN 978-5-600-02308-6

В издании обобщены и изложены сведения об организации работы в лаборатории клонального микроразмножения, создании коллекции асептических культур *in vitro* сортов винограда межвидового происхождения. Экспериментальные данные о применении биологически активных препаратов кремнийорганической природы в технологии клонального микроразмножения винограда межвидового происхождения с целью повышения укореняемости на этапе индукции ризогенеза, приживаемости на этапе адаптации к нестерильным условиям, развитию на этапе доращивания в условиях защищенного грунта для получения стандартного посадочного материала, отвечающего требованиям ГОСТ в кратчайшие сроки.

Учебно-методическое пособие выполнено в соответствии с образовательным стандартом ФГОС ВО и предназначено для подготовки бакалавров по направлению 35.03.05 «Садоводство», магистров 35.04.05 «Садоводство» и аспирантов по научной специальности 06.01.08 – Плодоводство, виноградарство факультета Садоводства и ландшафтной архитектуры очной формы обучения. А также для внедрения в производство производителями посадочного материала и специализированными виноградарскими хозяйствами РФ.

Утверждено на заседании учебно-методической комиссии факультета садоводства и ландшафтной архитектуры, протокол № 3 от 12.11.2018.

ISBN 978-5-600-02308-6

УДК 631.589:634.8
ББК 41.318.5:42.36

**РАЗРАБОТКА ЭЛЕМЕНТОВ ТЕХНОЛОГИИ
УСКОРЕННОГО КЛОНАЛЬНОГО
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ СОРТОВ ВИНОГРАДА
МЕЖВИДОВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ
ДЛЯ ЗОН РИСКОВАННОГО ВИНОГРАДАРСТВА**

Учебно-методическое пособие

Москва – 2018

© Акимова С.В., Раджабов А.К., Бухтин Д.А., Киркач В.В., 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Глава 1. Организация работы в лаборатории клонального микроразмножения	8
1.1. Организация работы и оборудование	8
1.2. Приготовление питательных сред.....	11
1.3. Техника асептической работы в ламинарном боксе.....	17
1.4. Меры предосторожности при работе с химическими веществами в лаборатории.....	18
Глава 2. Создание коллекции асептических культур <i>in vitro</i> сортов винограда межвидового происхождения.....	20
2.1. Этап введения в культуру <i>in vitro</i>	20
2.2. Этап мультипликации микропобегов	22
2.3. Этап ризогенеза микрорастений.....	26
2.4. Этап адаптации	27
Глава 3. Применение биологически активных препаратов кремнийорганической природы в технологии клонального микроразмножения винограда межвидового происхождения	32
3.1. Применение биологически активных препаратов кремнийорганической природы на этапе ризогенеза в качестве стимуляторов корнеобразования	32
3.2. Последствие введения в состав питательной среды на этапе ризогенеза кремнийорганических соединений на приживаемость микрорастений винограда межвидового происхождения на этапах адаптации и доращивания	45
Библиографический список.....	74
Приложение	78

ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология, как интегральная отрасль, может стать базой успешного выполнения приоритетных национальных проектов. Развитие сельского хозяйства в современных условиях немислимо без агробиотехнологии. Это имеет непосредственное отношение и к виноградарству.

Технология клонального микроразмножения позволяет работать практически круглый год и за короткий срок получать большое количество однородного посадочного материала растений. Коэффициент размножения при этом позволяет получить более тысячи растений в год из одной введенной в культуру меристемы, что в сотни раз больше, чем при использовании традиционных методов вегетативного размножения.

Данная технология привлекает внимание физиологов, вирусологов, селекционеров, а также практиков и, в первую очередь, питомниководов (Дорошенко Н.П., 2016).

Клональным микроразмножением называют массовое бесполое размножение растений в культуре тканей и клеток, при котором дочерние экземпляры генетически идентичны маточному растению (Катаева Н.В., 1983). В основе микроразмножения лежит способность растительной клетки реализовывать присущую ей тотипотентность (Акимова С.В., 2006; Аладина О.Н., 2009). Именно микроразмножение позволяет полнее всего реализовать потенциал растительного организма к размножению (Дорошенко Н.П., 2016).

Успех микроразмножения во многом зависит от процесса реювенилизации при культивировании *in vitro* растительного материала, взятого со стадийно более зрелого растения (Деменко В.И., 2007).

Важным преимуществом клонального микроразмножения является ускорение селекционного процесса и сокращение сроков получения товарной продукции новых сортов до 2–3 лет вместо 10–12 (Катаева Н.В., 1983).

При клональном микроразмножении происходит освобождение растений от патогенных микроорганизмов и даже от вирусов, исключая риск повторного заражения в ходе размножения, экономятся площади теплиц, занятые под маточные растения, появляется возможность размножать растения, которые размножаются с трудом или совсем не размножаются вегетативным способом.

Вирусы, использующие для своей репродукции растительные клетки, вызывают нарушения в обмене веществ хозяина. В результате заражения вирусами, а также по причине нарушения водного режима, в листьях больного растения винограда подавляется процесс синтеза

такого необходимого пигмента, как хлорофилл. В результате наступают изменения в составе протоплазменных биоколлоидов, что является важным фактором процесса ассимиляции (Рубин Б., 1968).

Также установлено, что в результате заражения растений винограда вирусами происходят изменения в белковом обмене и минеральном питании (Милкус Б., Еремеева Н., 1975; Милкус Б., Стыцько С., 1972).

С помощью клонального микроразмножения можно также добиться ускоренного перехода от ювенильной к репродуктивной фазе развития, что особенно важно для растений с длительной ювенильной фазой. В культуре *in vitro* поддерживается рост и развитие растений круглый год (Браткова Л.Г., Малыгина А.Н., Цаценко Н.Н., 2015).

Растения, полученные методом культуры тканей, можно успешно черенковать. Как правило, процент укоренения таких черенков близок к 100 % (Шипунова А.А., 2009).

Объектом культуры *in vitro* могут быть различные ткани, взятые из различных частей растения. Наиболее часто выращивают в изолированной культуре ткани, содержащие первичную и вторичную меристему. Значительно реже используют лепестки, пыльцевые трубки. Начало роста эксплантов на питательной среде, развитие побегов, зависит от типа экспланта. У эксплантов, не имеющих апикальной меристемы, вначале должна произойти дедифференциация существующих специализированных тканей, их меристемизация, а затем развитие побегов (Деменко В.И., 2007).

Выделяют два принципиально различных типа клонального микроразмножения растений (Кошкин Е.И., 2012):

1. Активация развития уже существующих в растении меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки стебля).

2. Индукция возникновения почек или эмбрионов *de novo*:

- возникновение микропобегов непосредственно из специализированных тканей экспланта (тканей репродуктивных органов, эпидермиса, субапикальных тканей, мезофилла чешуй листа и т.д.);

- из первичного каллуса, образованного клетками эксплантанта;

- из пересадочной каллусной ткани или клеток, растущих в суспензионной культуре (Высоцкий В.А., 2008; Катаева Н.В., 1983).

Получение единичного побега достаточной длины из первичного эксплантата и последующее его деление на однопочковые черенки и получение вновь длинного побега для повторного черенкования – способ микроразмножения, обеспечивающий наибольшую генетическую стабильность культуры. Таким способом чаще всего и размножают виноградные растения (Деменко В.И., 2007).

Индукция развития пазушных меристем – это метод микроразмножения, основанный на активации пазушных меристем и снятии апикального доминирования путем удаления главного побега и микрочеренкования в пробирке, или введением в питательную среду цитокининов, стимулируя развитие пазушных побегов или сочетанием этих двух приемов (Высоцкий В.А., 1986; Куклина А.Г., 2007).

В промышленных лабораториях клонального микроразмножения чаще всего используется именно этот метод. Пролиферация пазушных меристем в настоящее время является более надёжной в отношении виноградных растений, так как имеет минимальную степень риска получения неоднородного потомства, а частота появления мутантных растений не превышает частоту появления таковых при обычном размножении (Высоцкий В.А., 1986).

Процесс клонального микроразмножения состоит из нескольких этапов:

- введение в культуру – вычленение апикальных меристем или микрочеренков в стерильных условиях и посадка их на искусственную питательную среду;

- этап мультипликации – микроразмножение, состоящее из одного или нескольких пассажей для получения необходимого количества меристематических клонов;

- этап индукции ризогенеза – укоренение размноженных побегов *in vitro*;

- этап адаптации – перевод растений – регенерантов из *in vitro* в нестерильные условия *ex vitro*.

В средней полосе России виноград стал культивироваться сравнительно недавно. Долгие годы эта теплолюбивая культура считалась неперспективной, но распространению способствовало появление новых сортов, плоды которых успевают созреть за сравнительно короткое лето. 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 (Азарова А.Б., 2010; Акимова С.В., 2006).

Клональное микроразмножение – современный интенсивный способ массового бесполого размножения растений в культуре тканей и клеток, при котором полученные растения генетически идентичны исходному экземпляру (Катаева Н.В., 1983). При его использовании происходит освобождение тканей микропобегов от возбудителей многих заболеваний, снижающих урожайность до 30–80 % (Hedtrich T., 1983), а реовенилизация организма после культуры *in*

in vitro усиливает способность к вегетативному размножению (Pliego-Alfare F.J., 1988).

Совершенствование технологии применения биостимуляторов роста растений, при производстве виноградных саженцев с учетом сортовых и агротехнических особенностей – одно из перспективных направлений повышения эффективности виноградного питомниководства.

Корнеобразовательная способность сортов винограда межвидового происхождения невысока и в среднем составляет не более 50 %. Поэтому актуально разрабатывать приемы, повышающие эффективность технологии клонального микроразмножения, что будет иметь большое значение для расширения ареала данной культуры в условиях зоны рискованного земледелия.

Глава 1. ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ

1.1. Организация работы и оборудование

Комплекс оборудования лаборатории клонального микроразмножения садовых растений УНПК «Тимирязевский» представляет собой систему помещений, изолированных от окружающей среды, что необходимо для реализации работ со стерильными культурами растений и включает:

1. **Операционную комнату:** представляющую собой отдельное помещение с легко моющимися поверхностями стен и пола, оснащенную ультрафиолетовой лампой, ламинарным боксом с бинокулярной лупой и гласперленовым стерилизатором, шкафами для стерильного хранения питательных сред, материалов и столом (рис. 1).



Рис. 1. Общий вид операционной комнаты

2. **Комнату для приготовления питательных сред:** оснащенную дистиллятором, лабораторной плиткой, СВЧ-печью, магнитной и механической мешалками, рН-метром, аналитическими весами, ручным диспенсером, сушижаровыми шкафами для стерилизации культуральных сосудов и инструментов, шкафами для хранения реактивов и лабораторной посуды, вытяжным шкафом, холодильником, местом для мытья лабораторной посуды (рис. 2, 3).



Рис. 2. Аналитические весы для навесок химических реактивов



Рис. 3. Место для мытья лабораторной посуды

3. Стерилизационную комнату, оснащенную двумя автоклавами (рис. 4).



Рис. 4. Общий вид автоклава и процесс разгрузки стерилизационной камеры

4. Культуральную комнату, оборудованную светостеллажами (освещенность в диапазоне 400–10000 люкс), минимум двумя кондиционерами с зимними комплектами для поддержания температуры в пределах +20–28 °С и программным реле времени для поддержания 16-часового фотопериода (рис. 5).



Рис. 5. Культуральная комната с контролируемыми условиями

5. **Адаптационную теплицу** для перевода растений-регенерантов из *in vitro* в нестерильные условия *ex vitro*.

Работы обеспечиваются следующим оборудованием с примерными марками:

- ламинарный бокс Purifier Logic ClassII (Labconco);
- весы аналитические Ohaus Discovery OH-DV214C;
- автоклав вертикальный Sanyo MLS3020U;
- стационарный pH-метр S20-K Seven Easy;
- люксметр ТКА-Люкс;
- дистиллятор 2004 GFL;
- холодильник Helkama C10 G;
- холодильная камера «Атлант» МХМ2808-00;
- морозильная камера «Атлант» ММ184-80;
- ручной диспенсер РМ05;
- сушижаровой шкаф Biender ЕД115;
- термостат с охлаждением ТСО-1/80;
- плитка лабораторная Heidolph HG3001;
- прибор комбинированный для определения параметров среды ТКА-ПКМ, модель 62;
- кондиционер Dantex RK12SDM2;
- стол лабораторный с мойкой МЛ-С12М/1;
- стол лабораторный для дистиллятора с мойкой МЛ-С16дм;
- стол лабораторный весовой МЛ-С08-СВ;
- шкаф для хранения посуды МЛ-ШХП;
- шкаф для хранения реактивов МЛ-ШХХ;
- стол лабораторный МЛ-С12/бсх;
- шкаф для хранения посуды навесной МЛ-ШПХН;
- стеллажи для культивирования стерильных культур.

1.2. Приготовление питательных сред

Питательная среда заменяет экспланту стебель, взрослые листья и корни. Физический и химический состав среды должен обеспечить поступление воды и ионов в эксплант.

Компоненты питательной среды для выращивания микрорастений можно разделить на 6 основных групп, что обычно отражает порядок приготовления концентрированных маточных растворов: макроэлементы, микроэлементы, источник железа, витамины, источник углерода, регуляторы роста.

Основой всех питательных сред для культивирования микрорастений являются растворы минеральных солей по прописям Murashige and Skoog, WPM, DKW, Quogina-Lepouvre, Кноп и др., которые в свою очередь были созданы на основе вегетационных опытов, изучающих питание в водных и песчаных культурах для выращивания различных растений.

Это соединения азота в виде нитратов, нитритов, солей аммония; фосфора – в виде фосфатов; серы – в виде сульфатов; а также растворимые соли K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} . Железо используется в виде хелатов (например, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ + этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) или её натриевая соль Na ЭДТА или трилон Б) – наиболее доступной форме для усвоения растительными тканями (Дитченко Т.И., 2007).

В наших исследованиях для введения в культуру *in vitro*, дальнейшей мультипликации и ризогенеза использовалась питательная среда Murashige and Skoog (MS) редуцированная до 1/2 по содержанию макросолей (Murashige T.A., 1962).

Использовались следующие маточные растворы:

- раствор макроэлементов;
- раствор микроэлементов;
- раствор хелатного железа;
- раствор хлористого кальция;
- растворы синтетических гормонов, кремнийорганических веществ, витаминов.

Для искусственных питательных сред растворы макро- и микросолей готовят заранее и используют многократно. Это маточные (концентрированные) растворы их хранят в специальных условиях в холодильнике в сосудах с притертыми пробками при температуре 0...+4 °С.

Маточные растворы макросолей обычно превосходят рабочие по концентрации в 20 или 100 раз, микросолей – в 200 или 1000 раз.

Для приготовления маточного раствора макро- и микросолей каждую соль растворяют в отдельном стаканчике при нагревании, затем смешивают и доводят до нужного объема. В охлажденную смесь микросолей последним добавляют раствор солей молибдена ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$), а в макросоли – раствор солей магния ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) для предотвращения выпадения осадка (табл. 1).

Маточные растворы хелата железа и хлористого кальция готовят и хранят отдельно от других солей. Неправильное приготовление хелатного железа может привести к выпадению в осадок после автоклавирования фосфатов кальция и магния.

Методика расчета концентрации минеральных компонентов по прописи Murashige и Skoog для приготовления маточных растворов объемом 500 или 1000 мл различной концентрации

Минеральные соли	По прописи MS, мг/л	Маточный раствор, увеличенный в 200 раз		Маточный раствор, увеличенный в 1000 раз	
		Мг/л	г/1000мл	Мг/л	г/1000мл
МИКРОЭЛЕМЕНТЫ					
		для приготовления 1 л питательной среды берем 5 мл		для приготовления 1 л питательной среды берем 1 мл	
H ₃ BO ₃	6,2	1,24	0,62	6200	6,2
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3	4,46	2,23	22300	22,3
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	5	0,0025	25	0,025
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	5	0,0025	25	0,025
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6	1,72	0,86	8600	8,6
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O*	0,25	50	0,025	250	0,25
KJ	0,83	166	0,083	830	0,83

МАКРОЭЛЕМЕНТЫ

		Маточный раствор, увеличенный в 20 раз		Маточный раствор, увеличенный в 100 раз	
		для приготовления 1 л питательной среды берем 50 мл		для приготовления 1 л питательной среды берем 10 мл	
NH ₄ NO ₃	1650	33000	33	165000	165
KNO ₃	1900	38000	38	190000	190
MgSO ₄ · 7H ₂ O*	370	7400	7,4	37000	37
KN ₂ PO ₄	170	3400	3,4	17000	17

13

Продолжение табл. 1

Минеральные соли	По прописи MS, мг/л	Маточный раствор, увеличенный в 200 раз		Маточный раствор, увеличенный в 1000 раз	
		Мг/л	г/1000мл	Мг/л	г/1000мл
КАЛЬЦИЙ					
		Маточный раствор, увеличенный в 20 раз для приготовления 1 л питательной среды берем 50 мл		Маточный раствор, увеличенный в 100 раз для приготовления 1 л питательной среды берем 1 мл	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	8800	8,8	44000	44
ЖЕЛЕЗО					
		Маточный раствор, увеличенный в 200 раз для приготовления 1 л питательной среды берем 5 мл		Маточный раствор, увеличенный в 1000 раз для приготовления 1 л питательной среды берем 1 мл	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8	5560	5,56	27800	27,8
EDTA трилон Б	37,3	7460	7,46	37300	37,3

*Добавлять в маточный раствор только после полного остывания растворов.

14

Витамины и фитогормоны хранят в холодильнике или лучше в морозилке при температуре -20°C в небольших по 1–5 мл сосудах с пробками.

Для стимуляции биохимических реакций в культивируемых клетках используют витамины группы В (В1, В6, В12), С (аскорбиновая кислота), РР (никотиновая кислота), мезоинозитол. Концентрированные растворы витаминов готовят каждый отдельно путем растворения соответствующих навесок в дистиллированной воде (1 мл содержит 1 мг витамина).

В качестве ауксинов в питательных средах используют индолмасляную кислоту (ИМК) и индолилуксусную кислоту (ИУК) – в концентрациях 0,1–1 мг/л.

В качестве цитокининов искусственные питательные среды могут содержать кинетин, 6-бензиламинопурин (6-БАП), зеатин, 6-диметилаллиламинопурин (2-ипа) в концентрациях 0,001–5 мг/л.

Отдельные питательные среды включают гибберелловую кислоту (ГК). Присутствие ГК в среде не является обязательным, но в некоторых случаях она стимулирует рост изолированной ткани.

Фитогормоны, как правило, плохо растворяются в воде. Поэтому предварительно 10 мг вещества растворяют в небольших количествах (0,5–1 мл) спирта (ауксины, гиббереллины), 0,5–1 н HCl или KOH (цитокнины), затем доводят до 10 мл объема (1 мл содержит 1 мг гормона). В холодильнике их можно хранить при температуре 4°C не более 1 мес. (рис. 6).



Рис. 6. Маточные растворы минеральных солей, витаминов и гормонов для приготовления питательной среды

В качестве источника углерода в питательные среды добавляют углеводы в концентрации 15–30 г/л. Обычно это дисахариды (сахароза) либо моносахариды (глюкоза, фруктоза, ксилоза и др.).

Для культивирования микрорастений применяют жидкие и агаризованные (твердые) среды. Агаризованные среды готовят на основе агар-агара – полисахарида, входящего в состав морских водорослей, который образует с водой гель при pH 5,6–6,0. Обычно к среде добавляют 0,6–0,8 % агара. В качестве уплотнителя и заменителя агар-агара используют полиакриламидные гели (биогели). Также возможно использование крахмала – пшеничного, картофельного, кукурузного – в концентрации 70 г/л (Зеленянская Н.Н., 2010).

Протокол приготовления питательной среды:

1. Для приготовления 1 л питательной среды сначала делают навески сахарозы, агар-агара и мезоинозита.

2. Параллельно на лабораторной плитке или в СВЧ печи в огнеупорном мерном стакане разогревают дистиллированную воду объемом около 800 мл, доводя ее практически до кипения.

3. В мерный цилиндр или мерную колбу объемом 1 л наливают дистиллированной водой примерно 200 мл и добавляют необходимые количества маточных растворов макросолей, микросолей, глицина, витаминов и гормонов.

4. В подготовленной заранее горячей дистиллированной воде растворяют сахарозу и добавляют ее в мерный цилиндр с растворами солей.

5. Далее в огнеупорный мерный стакан высыпают агар-агар и заливают его небольшим количеством холодной дистиллированной воды и перемешивают. Затем добавляют заранее приготовленную горячую дистиллированную воду и растворяют агар-агар на лабораторной плитке или в СВЧ-печи, доводя до кипения. При этом важно следить, что в момент кипения агар-агар не переливался через стенки мерного стакана.

6. Далее расплавленный агар-агар добавляют в мерный цилиндр или мерную колбу, с предварительно добавленными растворами макросолей, микросолей, глицина, витаминов, гормонов и сахарозы. И горячей дистиллированной водой доводят объем до 1000 мл.

7. Измеряют pH раствора и с помощью 0,1н KOH или HCl доводят его до уровня 5,7–5,8.

8. Разливают среду по культуральным сосудам объемом 200 мл порциями по 30 мл. И подвергают стерилизации в автоклаве при температуре 120°C и давлении 0,1 МПа и в течение 20 мин.

1.3. Техника асептической работы в ламинарном боксе

Одним из условий успешного культивирования микрорастений является соблюдение строгой стерильности, поэтому все работы проводят в ламинарных боксах. Так как на искусственных питательных средах хорошо развиваются микроорганизмы, что представляет тройную опасность. Во-первых, в результате жизнедеятельности микроорганизмов может существенно измениться состав питательных сред, во-вторых, микрорастения легко повреждаются микроорганизмами, а в-третьих, возникает опасность инфицирования всей коллекции. Стерилизации подвергается ламинарный бокс, инструменты, посуда и питательные среды.

Ламинарные боксы располагают в отдельных изолированных помещениях – операционных комнатах, оборудованных ультрафиолетовыми лампами (УФ), стерилизаторами воздуха и вентиляцией. Стерильность в ламинарном боксе достигается благодаря продуву воздуха через систему фильтров, и подаче в рабочую зону равномерного однонаправленного ниспадающего потока стерильного воздуха, что обеспечивает отсутствие перекрестной контаминации.

Предварительная стерилизация инструментов (скальпелей, пинцетов, игл и т.д.) заключается в нагревании сухим горячим жаром в сушильном шкафу в течение 2 ч при температуре 140–180 °С. Металлические предметы нельзя автоклавировать, так как под действием пара они ржавеют и тупятся. Непосредственно перед работой и в ее процессе инструменты (пинцеты, скальпели, иглы) еще раз стерилизуют уже в ламинарном боксе, помещая их в мерный стакан с 96 % этиловым спиртом и обжигая в стерилизаторе. Стерильный инструмент используют только для одноразовой манипуляции. Перед повторным применением его следует снова простерилизовать спиртом и обжечь.

При использовании для стерилизации инструментов спиртовых горелок следует особенно тщательно соблюдать правила техники безопасности и всегда держать при себе колбу с дистиллированной водой и чистое хлопчатобумажное полотенце, так как нередко случаи пожаров и производственных травм в результате возгорания разлитого в ламинарном боксе спирта.

При выборе стерилизатора для ламинарного бокса следует отдавать предпочтение гласперленовым стерилизаторам с автоматическим поддержанием рабочей температуры в стерилизационной камере в течение всего дня и информированием о готовности прибора с помощью светового индикатора.

За 20 мин до начала работы операционную комнату, и внутренний объем ламинарного бокса облучают УФ-лампами. Предваритель-

но в ламинарном боксе размещают инструменты, мерный стакан с 96%-м спиртом объемом до 50 мл, включают стерилизатор (гласперленовый, инфракрасный).

Через 20 мин выключают УФ, включают биофильтры ламинарного бокса и в течение минимум 30 мин обязательно проветривают помещение. Для работы в ламинарном боксе надевают одноразовый стерильный халат, который предназначен только для работы в операционной комнате, руки обрабатывают 70%-м спиртом.

Перед началом работы необходимо протереть рабочую поверхность ламинарного бокса 70%-м раствором спирта. Далее внутрь бокса помещают банки, колбы либо пробирки с питательной средой, и культуральные сосуды с микрорастениями которые также предварительно обрабатывают 70%-м спиртом из пульверизатора.

При работе со стерильными культурами и посудой необходимо помнить о том, что нельзя проносить руки над открытой стерильной поверхностью. Также не допускается сильно заполнять материалами рабочее пространство ламинарного бокса, во избежание появления турбулентных эффектов в рабочей камере и последующей перекрестной контаминации.

1.4. Меры предосторожности при работе с химическими веществами в лаборатории

1. На работу в химико-аналитические лаборатории принимаются лица не моложе 18 лет, прошедшие медицинское освидетельствование для решения вопроса о возможности работы в лаборатории.

2. Вновь поступающие на работу допускаются к исполнению своих обязанностей только после прохождения *вводного инструктажа* о соблюдении мер безопасности, инструктажа на рабочем месте и после собеседования по вопросам техники безопасности.

3. Прохождение инструктажа обязательно для всех принимаемых на работу независимо от их образования, стажа работы и должности, а также для проходящих практику или производственное обучение.

4. *Периодический инструктаж* должен проводиться на рабочем месте дважды в год.

5. При переводе сотрудника на новые виды работ, незнакомые операции, перед работой с новыми веществами, а также в случае нарушения работником правил техники безопасности проводится *внеплановый инструктаж*.

6. При работе с сушильными шкафами запрещается их открывать, касаться раскалённых частей и погружённых в него предметов во избежание получения ожогов.

Глава 2. СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ АСЕПТИЧЕСКИХ КУЛЬТУР *IN VITRO* СОРТОВ ВИНОГРАДА МЕЖВИДОВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Для создания коллекции *in vitro* были выбраны 3 сорта винограда межвидового происхождения: Хасанский, Агат Донской, Московский белый.

Для выбранных сортов при создании асептических культур и их депонировании в банке *in vitro* лаборатории клонального микроразмножения осуществлялся выбор маточных растений, стерилизация исходного растительного материала, введение меристематических апексов в культуру *in vitro* и подбор оптимальных условий для мультипликации, ризогенеза и адаптации к нестерильным условиям.

2.1. Этап введения в культуру *in vitro*

Для введения в культуру *in vitro*, дальнейшей мультипликации и ризогенеза использовалась питательная среда Murashige и Skoog (MS) редуцированная до 1/2 по содержанию макроэлементов. (Murashige Т.А. 1962). Использовались исходные маточные растворы макроэлементов, микроэлементов, хелатного железа, витаминов, аминокислот и регуляторов роста, рН среды доводилась до 5,8. Питательная среда, предварительно разлитая по культуральным сосудам, подвергалась стерилизации в автоклаве при температуре 120 °С и давлении 0,1 МПа и в течение 20 мин.

Для введения в культуру *in vitro* использовались культуральные пробирки объёмом 15 мл (22×150 мм) с колпачками из фольги.

На этапах мультипликации и ризогенеза в качестве культуральных сосудов использовали стеклянные банки с прозрачными крышками объёмом 200 мл.

В качестве маточных растений использовались активно растущие апикальные побеги длиной в 3–5 см в количестве не менее 20 на сорт. Они были помещены в новые полиэтиленовые пакеты и оперативно переданы в лабораторию. Черенки промывали в течение 30 мин под проточной водой с последующим непрерывным перемешиванием в течение 15 мин в растворе фунгицида Фундазол 1г/л.

Стерилизацию проводили в асептических условиях ламинарного бокса сначала спиртом (70 %) в течение 1–2 с, затем раствором гипохлорита натрия (содержание активного хлора 3 %) с анионными ПАВ 5 % в разведении 11 мл на 100 мл раствора в течение 10–15 мин. Удаление стерилизующего агента проводили трехкратно, промывая экспланты в стерильной воде (рис. 7).

7. При работе в химической лаборатории необходимо надевать халат из хлопчатобумажной ткани.

8. При выполнении работ, связанных с выделением ядовитых газов и пыли, для защиты органов дыхания следует применять респираторы или противогазы и другие средства защиты.

9. При работе с едкими и ядовитыми веществами дополнительно применяют фартуки, средства индивидуальной защиты глаз и рук.

10. Для защиты рук от действия кислот, щелочей, солей, растворителей применяют резиновые перчатки. На перчатках не должно быть порезов, проколов и других повреждений. Надевая перчатки, следует посыпать их изнутри тальком. Для защиты глаз применяют очки различных типов, щитки, маски.

Работа с автоклавом требует осторожности и точного соблюдения всех требований техники безопасности. Работать можно только с проверенными автоклавами и не создавать давление выше указанного в паспорте, приложенном к аппарату. Работающий с автоклавами должен пройти специальный инструктаж.

Для работы с автоклавами должны быть отведены специальные комнаты – автоклавные. По требованиям техники безопасности стены, потолки, двери таких комнат изготавливают из котельного железа соответствующей толщины. На уровне глаз в стене или в двери делают окошко небольшого диаметра – «глазок», для наблюдения за работой автоклава.

Все помещения лаборатории должны соответствовать требованиям электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019–79.

1. Все электрооборудование с напряжением свыше 36 В, а также оборудование и механизмы, которые могут оказаться под напряжением, должны быть надежно заземлены.

2. Для отключения электросетей на вводах должны быть рубильники или другие доступные устройства. Отключение всей сети, за исключением дежурного освещения, производится общим рубильником.

3. В целях предотвращения электротравматизма запрещается:

- работать на неисправных электрических приборах и установках;
- перегружать электросеть;
- переносить и оставлять без надзора включенные электроприборы;
- работать вблизи открытых частей электроустановок, прикасаться к ним;
- загромождать подходы к электрическим устройствам.

4. Обо всех дефектах в изоляции проводов, неисправности рубильников, штепсельных вилок, розеток, а также заземления и ограждений – немедленно сообщить электрику.



Рис. 7. Ламинарный бокс, оборудованный бинокулярной лупой для выделения апикальных меристем

Далее под бинокулярной лупой вычленили меристематические апексы и помещали их в пробирки на питательную среду.

Перед выделением меристематических верхушек под микроскопом, верхушки побегов располагают на стерильной фильтровальной бумаге, лежащей на предметном столике микроскопа основанием отрезанного побега к оператору. Удаление зачаточных листьев делают с помощью глазного скальпеля и анатомической иглы в начале при увеличении 1 – 0,6. Иглой оператор придерживает основание отрезка побега, скальпелем отсекает зачаточные листочки. Чтобы точно определять основание отрезаемого листа, необходимо иглой зафиксировать основание побега, а скальпелем отодвинуть верхушку листьев немного вправо. Такая операция позволяет точно определить основание отделяемого листа, удалить его без повреждения конуса нарастания. После удаления листа, отрезок побега иглой поворачивается немного влево. Удаляется следующий зачаточный лист. В зависимости от культуры и количества удаленных листьев в нестерильных условиях, такую операцию приходится повторить 5–7 раз. По мере удаления зачаточных листьев можно обнаружить не поврежденные боковые меристемы. Их можно использовать для культивирования. Следует отметить, что боковые меристемы начинают расти несколько позже, по сравнению с апикальными меристематическими верхушками. Удаление последних 2–3 кроющих листочков необходимо проводить под 2-кратным увеличением (Деменко В.И., 2007).

После удаления последнего кроющего листа, под микроскопом можно увидеть хорошо различимый меристематический купол. Его величина зависит от времени года и колеблется от 50 до 150 мк. Его отличие от других частей меристематической верхушки – светло-зеленая окраска, зеркальный блеск. Отделенная меристематическая верхушка должна состоять из меристематического купола высотой 100–150 мк, одного-двух зачаточных листьев, один из которых как бы окутывает меристематический купол и субапикальной меристемы. Высота субапикальной меристемы не должна превышать 10–20 мк. Ее наличие необходимо, т.к. только меристематический купол не способен регенерировать побег.

После отделения меристематической верхушки ее скальпелем помещают на кончик иглы таким образом, чтобы не нарушить полярность при посадке на питательную среду. Всю операцию необходимо проводить быстро, с тем, чтобы меристематическая верхушка не потеряла тургор, но при этом скальпелем необходимо делать срезы, а не разламывать ткани, что усиливает окислительные процессы и может быть причиной плохой регенерации.

После посадки меристематической верхушки, предметный столик покрывается новой стерильной фильтровальной бумагой, иглу и скальпель стерилизуют в спирте и обжигают на спиртовке, выдерживают некоторое время, чтобы инструмент остыл и операцию повторяют. Оптимальным считается выделение и посадка на питательную среду 30–50 меристематических верхушек в час (Деменко В.И., 2007).

2.2. Этап мультипликации микропобегов

Основной задачей этого этапа является получение максимального количества микрорастений, идентичных исходному маточному растению.

Существуют различные способы увеличения числа побегов на данном этапе. Наиболее простой заключается в росте побега в длину в результате развития апикальной меристемы с последующим делением побега на микрочеренки, несущие пазушные почки (рис. 8, 9).

Другой путь – развитие побегов из пазушных почек в результате снятия эффекта апикального доминирования под действием цитокининов. В этом случае из экспланта за 4–8 недель развивается пучок (кластер) побегов. После разделения пучка миниатюрных побегов и посадки их на свежую среду процесс образования нового пучка побегов повторяется. В обоих описанных вариантах побеги образуются из существующих меристем (Медведева Н.И., Поливара Н.В., Трошин Л.П., 2010).



Рис. 8. Микрорастения – регенеранты винограда сорта Агат Донской, полученные путем введения в культуру *in vitro* апикальных меристем



Рис. 9. Микрорастения-регенеранты, готовые к микрочеренкованию, после 5 недель субкультивирования *in vitro*

На этапе мультипликации иногда возникает явление стекловидности или «витрификации», т.е. избыточной оводненности побегов. В таких растениях нарушается процесс образования хлорофилла, протеинов, снижается приживаемость при пересадке. Один из возможных путей уменьшения гипероводненности – снижение концентрации цитокининов в среде. Однако в наших экспериментах данный способ показал свою нецелесообразность, так как при введении в питательную среду синтетических цитокининов (6-БАП 0,1–0,6 мг/л) у регенерантов винограда наблюдался усиленный каллусогенез, витрификация, фасциация микропобегов и обильное выделение фенолов в питательную среду.

Питательная среда на этапе пролиферации содержала – 1/2 макро-, микросолей по Murashige и Skoog (MS), витамины В₁, В₆, РР по 0,5 мг/л, глицин 1 мг/л, сахарозу – 15000 мг/л, агар-агар – 7000 мг/л, без добавления цитокининов.

Во время пассажа регенеранты скальпелем разделяли на микрочеренки по 1–2 междоузлия, и переносили на свежую питательную среду, где они субкультивировались в течение еще 40–60 дней (рис. 10–12).



Рис. 10. Подготовленные для микрочеренкования микрорастения винограда сорта Хасанский



Рис. 11. Микрочеренкование винограда сорта Хасанский *in vitro*



Рис. 12. Работа оператора в ламинарном боксе

Мультипликация осуществлялась в стеклянных банках объёмом 200 мл, в которые помещали по 5 микропобегов для дальнейшей мультипликации (рис. 13).

Культуры инкубировали при интенсивности освещения 2500 люкс, 16-часовом фотопериоде, температуре 20–22 °С. Длительность субкультивирования 40–60 дней.



Рис. 13. Помещенные на свежую питательную среду микрочеренки винограда сорта Хасанский

2.3. Этап ризогенеза микрорастений

Способность побегов к укоренению *in vitro* может во многом определять эффективность технологии клонального микроразмножения. Было показано, что 75 % труда сотрудников лаборатории приходится на этап укоренения.

Однако, он не только наиболее трудозатратен, но и требует больших объемов питательной среды, более интенсивного освещения. Укоренение микропобегов *in vitro* существенно отличается от укоренения зелеными или одревесневшими черенками, возрастом растительного материала, условиями укоренения, качеством полученной корневой системы.

Но вместе с тем, схема ризогенеза *in vitro* и *in vivo* одинакова и подразделяется на следующие этапы: индукция, при которой цитологические события еще не начались, но происходит увеличение содержания фенолов и уменьшение пероксидаз; инициация, при которой можно зафиксировать цитологические события, а также уменьшение содержания фенолов и увеличение активности ИУК – оксидазы; организация, при которой гистологические изменения достаточно видны и наблюдается упадок общей пероксидазной активности; рост – на этом этапе происходит организация радиальных меристем и появление корней (Деменко В.И., 2007).

Успешное прохождение всех этапов ризогенеза зависит от культуры, сорта, условий проведения этапа пролиферации и этапа укоренения, солевого и гормонального состава среды, количества пассажей.

Очень часто укоренение сопровождается формированием каллуса у основания побега. Сокращение в среде макроэлементов или азота на половину увеличивает укоренение, а корнеобразование происходит при более низких концентрациях ауксина. На полной среде MS, в присутствии ауксина, развиваются толстые, короткие корни, на бедных средах – нитевидные. Наличие каллуса нежелательно, так как при пересадке растений в нестерильные условия они погибают от ботритиса и фузариоза (Деменко В.И., 2007).

Рост и развитие корней *in vitro* зависит от аэрации питательной среды, которая в свою очередь зависит от концентрации агар-агара. Укоренение побегов в плотной среде затруднено, развитие корней второго порядка не происходит. Уменьшение концентрации агар-агара существенно увеличивает укоренение побегов и развитие корней второго порядка. Однако при длительном развитии растений на средах с малым содержанием агар-агара (1,5–2,5 г/л) у них появляются признаки стекловидности (Деменко В.И., 2007).

Помимо добавления в состав питательной среды регулятора корнеобразования возможно применение ауксинсодержащей тальковой пудры (Мулюкина Н.А., Зеленинская Н.Н., Джабурия Л.В., 2013).

Питательная среда на этапе индукции ризогенеза содержала – 1/2 макро-, микросолей по Мурасига и Скуга (МС), витамины В₁, В₆, РР по 0,5 мг/л, сахарозу – 15000 мг/л, агар-агар – 7000 мг/л. Культуры инкубировали при интенсивности освещения 2500 люкс, 16-часовом фотопериоде, температуре 20–22 °С. Формирование корневой системы происходило в течение 20–50 дней с момента переноса растений в условия укоренения (рис. 14).



Рис. 14. Корневая система микрорастений винограда сорта Агат Донской *in vitro*

2.4. Этап адаптации

При переводе микрорастений винограда в нестерильные условия завершается цикл производственного процесса, который заканчивается получением готовой продукции. Адаптированными считаются растения, укоренённые в кассетах, в торфяном субстрате, достигшие определённых параметров (высота, количество листьев, развитие корней), Процесс адаптации и доращивания проходит на территории помещений защищённого грунта (теплиц). Требования к конструкциям теплиц формируются на основе СНиП 2.10.04–85.

Эта часть технологического процесса заключается в высадке укоренённых микрорастений в торфяной субстрат и адаптации к условиям влажности защищённого грунта. Адаптация осуществляется путём постепенного снижения влажности воздуха вокруг растений.

Доращивание – процесс, при котором растения достигают необходимого размера и параметров, за счёт создания для их роста оптимальных условий (температуры, увлажнения, освещённости, длины светового дня и минерального питания).

Для этого необходимы следующие материалы: торфяной субстрат, агроперлит, комплексные минеральные удобрения, почвенные фунгициды, пластиковые кассеты для посадки растений.

Промышленное размножение *in vitro* зависит от способности полученных растений адаптироваться к нестерильным условиям. Адаптация – критическая фаза технологии клонального микроразмножения. Условия *in vitro* отличаются коренным образом от условий *in vivo*: более высокой влажностью воздуха, другим содержанием солей по сравнению с почвенным раствором, необходимостью введения в питательную среду регуляторов роста и сахаров, накоплением этилена.

Длительное нахождение растительного материала при таких условиях вызывает самые разнообразные анатомические, физиологические аномалии. У растений *in vitro* развиваются нефункциональные устьица, появляются признаки стекловидности, листья теряют способность к активному фотосинтезу, корневая система также не позволяет им достаточно питаться почвенным раствором (Lindsey N.C., 1984; Деменко В.И., 2007). Перенос таких растений в нестерильные условия создает стрессовую ситуацию, которая часто приводит к их гибели. Ослабить стресс можно при условии контроля над потерей и поглощением воды.

Таким образом, адаптация включает в себя, как минимум, 4 составных элемента: адаптация надземной части к пониженной влажности воздуха и одновременно к инфекционной нагрузке, адаптация корневой системы к новому субстрату и новому составу микрофлоры (Корнацкий С.А., 1996). Поэтому необходим ступенчатый подход к адаптации растений к нестерильным условиям среды.

В первую очередь, необходимо при поддержании влажности близкой к 100 % и относительной стерильности субстрата, заставить работать корневую систему. Выявлено, что у микрорастений функционирующая корневая система формируется за 2–4 недели, в зависимости от породы. Устьица также начинают функционировать через 10–14 дней после пересадки. Резкое снижение влажности воздуха губительно для растений в этот момент.

Вторая ступень адаптации заключается в постепенном снижении влажности воздуха в зоне надземной части растений (Корнацкий С.А., 2003). Пяти дней, в течение которых адаптация должна проходить постепенно, как правило, достаточно для того, чтобы обеспечить полную сохранность растений (Гиголашвили Т.С., 1997; Корнацкий С.А., 1999). В этот период необходимо создать такие условия для растений, чтобы условия культивирования были наиболее близкими к естественным и способствовали наиболее активной вегетации (рис. 15).



Рис. 15. Камеры для перевода микрорастений-регенерантов в нестерильные условия

В течение периода адаптации в теплицах поддерживается высокая относительная влажность 75–90 % и температура воздуха 22–28 °С, а также освещенность 2–5 тыс. люкс при фотопериоде 15–18 ч (Аладина О.Н., 2009; Муратова С.А., 2008; Панькова О.А., 2008).

Во многом результативность этапа адаптации определяется биологическими особенностями культуры и сроками переноса растений в субстрат. В целом, размноженные через культуру тканей растения винограда, отличаются высокой адаптационной способностью к нестерильным условиям, достигающей 75–100 % (Янковская М.Б., 2011).

Оптимальным временем для высадки растений винограда на адаптацию является конец марта – начало июня (Муратова С.А., 2008; Шорников Д.Г., 2010). Перед переносом укорененных растений винограда из стерильных условий в условия автотрофного питания – этап адаптации, их обрабатывают 1 % раствором перманганата калия и пересаживают в стерильный субстрат: смесь торфа с перлитом в соотношении 3:1 (Деменко В.И., 2011; Куклина А.Г., 2007).

Для стерилизации субстрата его проливают горячей водой, обрабатывают растворами фунгицидов (максим, бенлат, превикур, эупарен), противомикробным раствором с добавлением тетразола или горячим паром (Михальчик Л.С., 1988).

Для обеспечения приживаемости растений в течение первых 2-х недель необходима высокая влажность (75–80 %), что достигается в условиях «влажной камеры». Условия асептики соблюдаются в течение 4–5 недель. Через 2–3 недели растения, как правило, дают верху-

шечный прирост. Затем, растения, достигшие высоты 15–25 см, с развитой корневой системой, пересаживают в горшки с субстратом, состоящим из смеси торфа, листовой земли и песка в соотношении 1:1:1 (Куклина А.Г., 2009).

Растения винограда, высаженные на адаптацию после укоренения в стерильных условиях, имеют более развитую корневую систему, интенсивнее растут и имеют осенью более вызревшие побеги, по сравнению с растениями, укорененными непосредственно в субстрате (Муратова С.А., 2008) (рис. 16).



Рис. 16. Адаптированные к нестерильным условиям растения винограда сорта Агат Донской

Наименование оборудования для адаптационной теплицы:

1. Компьютерная система контроля и управления микроклиматом в трех независимых зонах с учетом погодных условий (рис. 17).
2. Оборудование автоматического верхнего полива с управлением от компьютера в двух зонах, системой подкормки минеральными удобрениями.
3. Система верхнего увлажнения для двух зон, позволяющая получить 100 % влажность.
4. Система освещения во 2-й зоне (6000 люкс) с управлением от климатического компьютера, светильники PLG-602 (электронное ПРА), с лампой PHILIPS SON-T GREEN.
5. Система приточно-вытяжной вентиляции в 1-й зоне, воздухонагреватель Volkano VR1).
6. Система стеллажей в 1-й зоне, включает стеллажи размером 4600×1800×60 мм с капиллярными матами, многоярусные.

7. Система стеллажей во 2-й зоне, включает стеллажи размером 4600×1800×60 мм с системой дренажа.

8. Система стеллажей в 3-й зоне, включает 16 четырехъярусных стеллажей размером 0,4×1,2×2 м, с индивидуальной установкой досвечивания растений (степень защиты светильника IP 65).



Рис. 17. Блок управления параметрами теплицы для адаптации микрорастений

Глава 3. ПРИМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ КРЕМНИЙОРГАНИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ В ТЕХНОЛОГИИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ВИНОГРАДА МЕЖВИДОВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

3.1. Применение биологически активных препаратов кремнийорганической природы на этапе ризогенеза в качестве стимуляторов корнеобразования

Совершенствование технологии применения биостимуляторов роста растений, при производстве виноградных саженцев с учетом сортовых и агротехнических особенностей – одно из перспективных направлений повышения эффективности виноградного питомниководства.

Для индукции ризогенеза традиционно используют ауксины – индолилмасляную (ИМК), индолилуксусную (ИУК) и реже нафтилуксусную (НУК) кислоты (Упадышев М.Т., 1991; Nicholas I.R., 1986).

Но некоторые исследователи отмечали их положительное влияние только на первых этапах ризогенеза, а в дальнейшем их присутствие в среде для развития корневой системы не только бесполезно, но и нежелательно и должно быть ограничено во времени (Шипунова А.А., 2003; Трушечкин В.Г., Высоцкий В.А., 1985).

В зависимости от генотипа растений ризогенез может длиться от 30 до 70 дней. Длительное воздействие ауксина при этом стимулирует формирование корневых зачатков, но впоследствии ингибирует рост корней и способствует развитию каллуса (Деменко В.И., Лебедев В.Г., Шестибратов К.А., 2010; Gresshoff P., 1977). Отсутствие корневых волосков при культивировании *in vitro* также связано с недостатком кислорода, что ухудшает поглощение воды и минеральных солей и впоследствии негативно сказывается на адаптации микрорастений к нестерильным условиям (Азарова, А.Б., 2010). Поэтому сейчас большое внимание при совершенствовании технологии клонального микроразмножения уделяют изучению влияния новых биологически активных веществ на ризогенез *in vitro* в том числе биологически активных препаратов кремнийорганической природы.

Крезацин (трис – (2 – оксиэтил) аммоний – о – крезоксиацетат или триэтанолааминовая соль крезоксиуксусной кислоты) характеризуется широким спектром биологической активности. Выявлено, что антистрессовое, мембрано-стабилизирующее действие крезацина осуществляется через торможение перекисного окисления липидов мембран (Акимова, С.В., 2015).

Черказ (этилсилатран) – это препарат, не содержащий хлора, является эффективным стимулятором роста на первых этапах развития растений; препарат способствует повышению энергии прорастания и всхожести семян (Аладина, О.Н., 2009; Высоцкий, В.А., 2008). Свойство черказа повышать устойчивость растений к неблагоприятным воздействиям внешней среды может быть обусловлено стабилизацией клеточных мембран. Поэтому он рекомендован как криопротектор на винограде (Высоцкий, В.А., 1986).

Корнеобразовательная способность сортов межвидового происхождения невысока и в среднем составляет не более 50 %. Поэтому актуально разрабатывать приемы, повышающие эффективность технологии клонального микроразмножения, что будет иметь большое значение для расширения ареала данной культуры в условиях зоны рискованного земледелия.

Цель исследований: совершенствование элементов технологии клонального микроразмножения сортов винограда межвидового происхождения, направленных на повышение укореняемости микрорастений на этапе индукции ризогенеза.

Задачи исследований: выявить эффективность введения в состав питательной среды на основе минеральных солей 1/2 Мурасига и Скуга в качестве стимуляторов корнеобразования кремнийорганических соединений крезацин и черказ, в том числе на фоне ИМК.

Методика исследований

Опыты проводили в лаборатории клонального микроразмножения РГАУ МСХА в 2017–2018 гг.

Объекты исследований – сорта винограда межвидовых гибридов раннего срока созревания: Хасанский, Агат Донской, Московский белый.

Питательная среда для ризогенеза на этапе укоренения содержала – 1/2 макро-, микросолей по Мурасига и Скуга (МС), витамины В₁, В₆, РР по 0,5 мг/л, сахара – 15000 мг/л, агар-агар – 6000 мг/л. В опытных вариантах в питательную среду добавляли препараты крезацин и черказ, а также производили совмещение данных препаратов с ИМК (табл. 2). Повторность трехкратная по 10 растений.

Культуры инкубировали при интенсивности освещения 2500 люкс, 16-часовом фотопериоде, температуре 20–22 °С.

Учет данных по укореняемости производили на 3 и 7 неделях субкультивирования. При этом измерялось количество корней I порядка, их длину, в дальнейшем изучалась динамика роста корневой системы по каждому варианту. Длительность субкультивирования составила 45 дней.

Схема опыта

Крезацин, мг/л	Черказ, мг/л	Крезацин + ИМК, мг/л	Черказ + ИМК, мг/л
0,1	0,1	0,1	0,5
0,2	0,2	0,2	0,5
0,3	0,3	0,3	0,5
0,4	0,4	0,4	0,5
0,5	0,5	0,5	0,5
1,0	1,0	1,0	0,5
1,5	1,5	1,5	0,5
2,0	2,0	2,0	0,5

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили методом дисперсионного анализа по Доспехову Б.А. (1985).

Результаты исследований и их обсуждение

Динамика укореняемости микрорастений винограда сорта Хасанский на 3-й неделе субкультивирования выявила преимущество вариантов с добавлением в питательную среду препарата крезацин в концентрациях 0,4 и 1,5 мг/л, где укореняемость микрочеренков составила 93,3–100 % против 86,6 % в контроле. Однако на 7-й неделе субкультивирования было выявлено преимущество вариантов – 0,2 и 1,5 мг/л, где укореняемость соответствовала контролю и составила 100 % (табл. 2, рис. 18).

При совместном внесении в состав питательной среды препаратов крезацин и ИМК на 3-й неделе субкультивирования укореняемость во всех опытных вариантах, уступала показателям контроля (40–80 % против 86,7 %). Исключение составил вариант, где добавляли препарат крезацин в концентрации 0,3 мг/л в котором укореняемость микрочеренков была равна контролю и составила 86,7 %. На 7 неделе субкультивирования в только варианте с добавлением препарата крезацин в концентрации 1,5 мг/л в сочетании с ИМК 0,5 мг/л укореняемость микрочеренков составила 100 % (табл. 3, рис. 18).

При сравнении показателей развития, укорененных микрочеренков было выявлено преимущество варианта с добавлением препарата крезацин в концентрации 1,5 мг/л.

При добавлении в состав питательной среды для ризогенеза микрочеренков винограда сорта Хасанский препарата черказ все опытные варианты на 3-й и 7-й неделях субкультивирования уступали показателям контроля: на 3-й неделе – 6,6–73,3 % против 86,6 % в контроле; на 7-й неделе – 46,7–86,7 % против 100 % в контроле (табл. 3, рис. 19).

При совместном введении в состав питательной среды препаратов черказ и ИМК 0,5 мг/л, на 3-й неделе субкультивирования все опытные образцы уступали показателю контроля (26,7–80 % против 86,7 % в контроле). Только на 7-й неделе субкультивирования в вариантах с концентрациями 0,4; 1,5; 2 мг/л укореняемость микрочеренков составила 100 % (табл. 4, рис. 19).

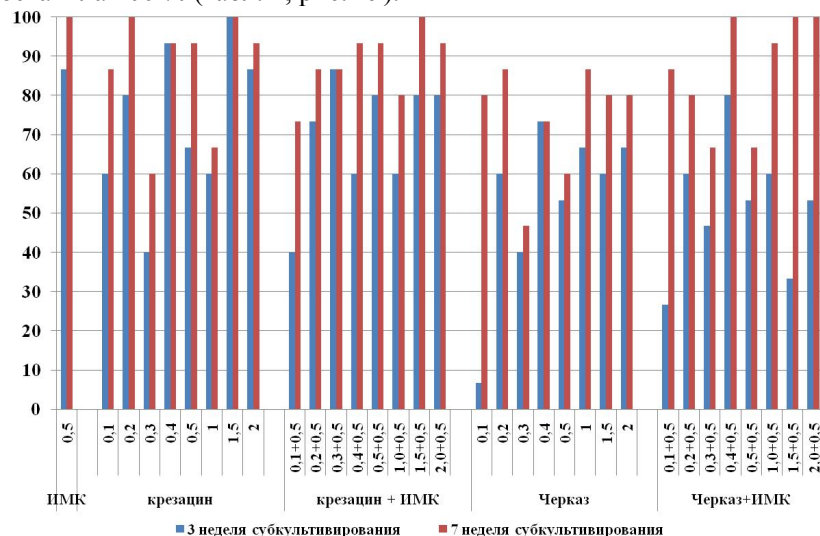


Рис. 18. Динамика укореняемости *in vitro* микрочеренков винограда (сорт Хасанский) при добавлении в состав питательной среды препаратов крезацин и черказ, в том числе в сочетании с ИМК

Таким образом, при клональном микроразмножении винограда сорта Хасанский для стимулирования корнеобразования микрочеренков в состав питательной среды на основе минеральных солей 1/2 Мурасига и Скуга в качестве стимулятора корнеобразования эффективно добавлять препараты кремнийорганической природы (мг/л): крезацин 0,2; крезацин 1,5; крезацин 1,5 + ИМК 0,5; черказ 0,4 + ИМК 0,5; черказ 1,5 + ИМК 0,5; черказ 2,0 + ИМК 0,5.

При изучении динамики ризогенеза винограда сорта Агат Донской нами была выявлено явное преимущество комбинирования кремнийорганических препаратов в сочетании с ИМК.

Так при введении в состав питательной среды препарата крезацин без ИМК на 3-й неделе укореняемость во всех опытных вариантах уступала показателям контроля (26,7–66,7 % против 73,3 % в контроле), кроме варианта с концентрацией препарата крезацин 1,5 мг/л, где укореняемость микрочеренков была равна показателям в контроле. На

7-й неделе субкультивирования все опытные образцы уступали показателям контроля (55,3–80,0 % против 93,3 %) (табл. 5, рис. 19).

Совместное введение в состав питательной среды препаратов крезацин и ИМК значительно увеличило укореняемость микрочеренков и на 3-й неделе субкультивирования в вариантах с концентрацией препарата крезацин 0,2; 0,3; 0,5; 1; 1,5 и 2 мг/л она составила 86,7–93,3 % против 73,3 % в контроле. Однако на 7 неделе субкультивирования было выявлено преимущество только одного варианта с концентрацией препарата крезацин 0,2 мг/л, где укореняемость составила 100 % по отношению к контролю 93,3 % (табл. 5, рис. 19).

При введении в состав питательной среды для ризогенеза микрочеренков винограда сорта Агат Донской препарата черказ на 3-й неделе укореняемость во всех опытных вариантах уступала показателям контроля (6,7–53,3 % против 73,3 % в контроле). На 7-й неделе субкультивирования вариант с концентрацией 1,0 мг/л был равен контролю (93,3 %), все остальные образцы уступали контролю (табл. 6, рис. 19).

В вариантах с совместным введением в состав питательной среды препаратов черказ и ИМК уже на третьей неделе субкультивирования укореняемость микрочеренков в вариантах 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 мг/л составила 80–100 % против 73,3 % в контроле.

На седьмой неделе субкультивирования в вариантах с добавлением совместно с ИМК препарата черказ в концентрациях 0,1; 0,2; 0,4; 0,5 мг/л укореняемость микрочеренков составила 100 % против 93,3 % в контроле (табл. 6, рис. 19).

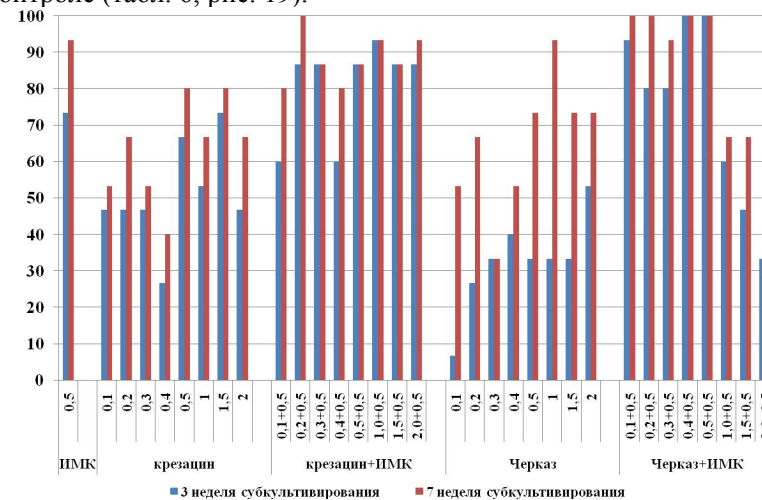


Рис. 19. Динамика укореняемости *in vitro* микрочеренков винограда (сорт Агат Донской) при добавлении в состав питательной среды препаратов крезацин и черказ, в том числе в сочетании с ИМК

Влияние препаратов крезацин и ИМК на ризогенез *in vitro* растений винограда сорта Хасанский

Вариант, мг/л	Укореняемость, %	Среднее количество корней, шт.	Средняя длина корней, см	Укореняемость, %	Среднее количество корней, шт.	Средняя длина корней, см
	3-я неделя	субкультивирования	корней, см	7-я неделя	субкультивирования	корней, см
Контроль ИМК 0,5	86,7	1,9	1,9	100,0	5,3	1,4
Крезацин 0,1	60,0	1,2	0,3	86,7	3,3	2,3
Крезацин 0,2	80,0	1,6	0,4	100,0	3,6	1,9
Крезацин 0,3	40,0	0,7	0,4	60,0	1,7	2,2
Крезацин 0,4	93,3	1,9	0,7	93,3	3,3	2,4
Крезацин 0,5	66,7	1,3	0,3	93,3	2,4	1,1
Крезацин 1,0	60,0	1,5	0,2	66,7	2,6	1,6
Крезацин 1,5	100,0	2,5	0,2	100,0	4,1	1,3
Крезацин 2,0	86,7	1,8	0,1	93,3	4,4	1,5
НСР ₀₅	11,22	0,24	0,08	13,22	0,51	0,26
	3-я неделя		7-я неделя		субкультивирования	
Контроль ИМК 0,5	86,7	1,9	1,9	100,0	5,3	1,4
Крезацин 0,1 + ИМК 0,5	40,0	0,6	0,1	73,3	1,9	0,5
Крезацин 0,2 + ИМК 0,5	73,3	1,3	0,1	86,7	2,6	1,2
Крезацин 0,3 + ИМК 0,5	86,7	1,7	0,1	86,7	3,3	0,7
Крезацин 0,4 + ИМК 0,5	60,0	1,5	0,1	93,3	2,7	0,7
Крезацин 0,5 + ИМК 0,5	80,0	2,0	0,1	93,3	3,7	0,9
Крезацин 1,0 + ИМК 0,5	60,0	1,1	0,1	80,0	3,1	0,5
Крезацин 1,5 + ИМК 0,5	80,0	2,3	0,1	100,0	4,5	1,2
Крезацин 2,0 + ИМК 0,5	80,0	1,7	0,1	93,3	3,5	0,5
НСР ₀₅	10,78	0,24	0,05	13,44	0,51	0,13

37

Влияние препаратов черказ и ИМК на ризогенез *in vitro* растений винограда сорта Хасанский

Вариант, мг/л	Укореняемость, %	Среднее количество корней, шт.	Средняя длина корней, см	Укореняемость, %	Среднее количество корней, шт.	Средняя длина корней, см
	3-я неделя	субкультивирования	на корней, см	7-я неделя	субкультивирования	на корней, см
Контроль ИМК 0,5	86,7	1,9	1,9	100,0	5,3	1,4
Черказ 0,1	6,7	0,1	0,3	80,0	2,2	1,7
Черказ 0,2	60,0	1,3	0,7	86,7	3,1	2,5
Черказ 0,3	40,0	0,6	0,7	46,7	1,3	1,8
Черказ 0,4	73,3	1,1	0,7	73,3	1,9	2,2
Черказ 0,5	53,3	1,1	0,6	60,0	1,7	1,9
Черказ 1,0	66,7	1,1	0,6	86,7	2,8	2,3
Черказ 1,5	60,0	1,0	0,6	80,0	1,9	2,6
Черказ 2,0	66,7	1,1	0,8	80,0	2,9	2,8
НСР ₀₅	8,56	0,16	0,12	11,56	0,39	0,32
	3-я неделя		7-я неделя		субкультивирования	
Контроль ИМК 0,5	86,7	1,9	1,9	100,0	5,3	1,4
Черказ 0,1 + ИМК 0,5	26,7	0,3	0,1	86,7	3,3	1,8
Черказ 0,2 + ИМК 0,5	60,0	1,4	0,2	80,0	4,0	2,4
Черказ 0,3 + ИМК 0,5	46,7	0,6	0,1	66,7	2,5	1,2
Черказ 0,4 + ИМК 0,5	80,0	1,8	0,1	100,0	4,9	2,5
Черказ 0,5 + ИМК 0,5	53,3	1,3	0,2	66,7	2,6	1,9
Черказ 1,0 + ИМК 0,5	60,0	1,0	0,1	93,3	4,2	1,6
Черказ 1,5 + ИМК 0,5	33,3	0,5	0,1	100,0	3,7	1,8
Черказ 2,0 + ИМК 0,5	53,3	1,0	0,1	100,0	4,4	1,6
НСР ₀₅	8,33	0,16	0,05	13,22	0,58	0,27

38

Влияние препаратов крезацин на ризогенез *in vitro* растений винограда сорта Агат Донской

Вариант, мг/л	Укореняемость, %		Среднее количество корней, шт.		Средняя длина корней, см		Укореняемость, %		Среднее количество корней, шт.		Средняя длина корней, см	
	3-я неделя субкультивирования		3-я неделя субкультивирования		3-я неделя субкультивирования		7-я неделя субкультивирования		7-я неделя субкультивирования		7-я неделя субкультивирования	
Контроль ИМК 0,5	73,3	1,7	0,2	0,2	93,3	3,3	2,6	93,3	3,3	0,29	0,12	0,12
Крезацин 0,1	46,7	0,6	0,2	0,2	53,3	1,2	0,9	53,3	1,2	1,8	0,5	0,5
Крезацин 0,2	46,7	0,8	0,3	0,3	66,7	1,9	1,6	66,7	1,9	2,4	0,5	0,5
Крезацин 0,3	46,7	0,7	0,3	0,3	53,3	1,1	1,3	53,3	1,1	2,3	0,5	0,5
Крезацин 0,4	26,7	0,6	0,1	0,1	40,0	1,1	0,1	40,0	1,1	2,3	0,5	0,5
Крезацин 0,5	66,7	1,2	0,1	0,1	80,0	2,5	0,2	80,0	2,5	2,3	0,5	0,5
Крезацин 1,0	53,3	1,1	0,1	0,1	66,7	1,9	0,2	66,7	1,9	2,3	0,5	0,5
Крезацин 1,5	73,3	1,6	0,1	0,1	80,0	2,3	0,2	80,0	2,3	2,3	0,5	0,5
Крезацин 2,0	46,7	0,8	0,2	0,2	66,7	1,8	0,3	66,7	1,8	2,3	0,5	0,5
НСР ₀₅	8,00	0,15	0,03	0,03	10,00	0,29	0,12	10,00	0,29	0,60	0,17	0,17
3-я неделя субкультивирования												
Контроль ИМК 0,5	73,3	1,7	0,2	0,2	93,3	3,3	2,6	93,3	3,3	2,6	0,12	0,12
Крезацин 0,1 + ИМК 0,5	60,0	1,8	0,2	0,2	80,0	4,0	1,2	80,0	4,0	2,3	0,5	0,5
Крезацин 0,2 + ИМК 0,5	86,7	2,7	0,2	0,2	100,0	4,5	1,7	100,0	4,5	2,3	0,5	0,5
Крезацин 0,3 + ИМК 0,5	86,7	3,9	0,2	0,2	86,7	5,3	1,2	86,7	5,3	2,3	0,5	0,5
Крезацин 0,4 + ИМК 0,5	60,0	2,3	0,3	0,3	80,0	3,7	0,9	80,0	3,7	2,3	0,5	0,5
Крезацин 0,5 + ИМК 0,5	86,7	2,9	0,2	0,2	86,7	3,7	1,6	86,7	3,7	2,3	0,5	0,5
Крезацин 1,0 + ИМК 0,5	93,3	3,2	0,1	0,1	93,3	4,7	0,5	93,3	4,7	2,3	0,5	0,5
Крезацин 1,5 + ИМК 0,5	86,7	2,4	0,1	0,1	86,7	3,9	0,3	86,7	3,9	2,3	0,5	0,5
Крезацин 2,0 + ИМК 0,5	86,7	2,3	0,3	0,3	93,3	3,1	0,2	93,3	3,1	2,3	0,5	0,5
НСР ₀₅	12,00	0,39	0,03	0,03	13,33	0,60	0,17	13,33	0,60	0,60	0,17	0,17

39

Влияние препаратов черказ на ризогенез *in vitro* растений винограда сорта Агат Донской

Вариант, мг/л	Укореняемость, %		Среднее количество корней, шт.		Средняя длина корней, см		Укореняемость, %		Среднее количество корней, шт.		Средняя длина корней, см	
	3-я неделя субкультивирования		3-я неделя субкультивирования		3-я неделя субкультивирования		7-я неделя субкультивирования		7-я неделя субкультивирования		7-я неделя субкультивирования	
Контроль ИМК 0,5	73,3	1,7	0,2	0,2	93,3	3,3	2,6	93,3	3,3	0,29	0,12	0,12
Черказ 0,1	6,7	0,1	0,3	0,3	53,3	2,2	1,7	53,3	2,2	1,8	0,5	0,5
Черказ 0,2	26,7	1,3	0,7	0,7	66,7	3,1	2,5	66,7	3,1	2,3	0,5	0,5
Черказ 0,3	33,3	0,6	0,7	0,7	33,3	1,3	1,8	33,3	1,3	2,3	0,5	0,5
Черказ 0,4	40,0	1,1	0,7	0,7	53,3	1,9	2,2	53,3	1,9	2,3	0,5	0,5
Черказ 0,5	33,3	1,1	0,6	0,6	73,3	1,7	1,9	73,3	1,7	2,3	0,5	0,5
Черказ 1,0	33,3	1,1	0,6	0,6	93,3	2,8	2,3	93,3	2,8	2,3	0,5	0,5
Черказ 1,5	33,3	1,0	0,6	0,6	73,3	1,9	2,6	73,3	1,9	2,3	0,5	0,5
Черказ 2,0	53,3	1,1	0,8	0,8	73,3	2,9	2,8	73,3	2,9	2,3	0,5	0,5
НСР ₀₅	25,55	0,15	0,09	0,09	10,22	0,35	0,34	10,22	0,35	0,60	0,17	0,17
3-я неделя субкультивирования												
Контроль ИМК 0,5	73,3	1,7	0,2	0,2	93,3	3,3	2,6	93,3	3,3	2,6	0,12	0,12
Черказ 0,1 + ИМК 0,5	93,3	0,1	0,1	0,1	100	1,1	0,6	100	1,1	2,3	0,5	0,5
Черказ 0,2 + ИМК 0,5	80,0	0,7	0,7	0,7	100	2,1	1,1	100	2,1	2,3	0,5	0,5
Черказ 0,3 + ИМК 0,5	80,0	0,5	0,9	0,9	93,3	0,7	1,5	93,3	0,7	2,3	0,5	0,5
Черказ 0,4 + ИМК 0,5	100	0,5	0,5	0,5	100	1,7	0,7	100	1,7	2,3	0,5	0,5
Черказ 0,5 + ИМК 0,5	100	0,6	1,5	1,5	100	2,0	1,7	100	2,0	2,3	0,5	0,5
Черказ 1,0 + ИМК 0,5	60,0	0,5	0,8	0,8	66,7	2,1	1,1	66,7	2,1	2,3	0,5	0,5
Черказ 1,5 + ИМК 0,5	46,7	0,4	0,5	0,5	66,7	2,1	1,1	66,7	2,1	2,3	0,5	0,5
Черказ 2,0 + ИМК 0,5	33,3	0,9	0,6	0,6	73,3	1,9	1,8	73,3	1,9	2,3	0,5	0,5
НСР ₀₅	11,18	0,10	0,10	0,10	13,22	0,28	0,20	13,22	0,28	0,60	0,17	0,17

40

Таким образом, было выявлено, что при клональном микроразмножении винограда сорта Агат Донской на этапе ризогенеза в состав питательной среды на основе минеральных солей 1/2 Мурасига и Скуга в качестве стимулятора корнеобразования эффективно добавлять препараты кремнийорганической природы только в сочетании с ИМК (мг/л): крезацин 0,2 + ИМК 0,5; черказ 0,1 + ИМК 0,5; черказ 0,2 + ИМК 0,5; черказ 0,4 + ИМК 0,5; черказ 0,5 + ИМК 0,5.

При изучении динамики ризогенеза винограда сорта Московский белый была выявлена положительная реакция на введение в состав питательной среды препаратов кремнийорганической природы в сочетании их с ИМК.

Препарат крезацин, введенный в состав питательной среды, позволил повысить укореняемость микрочеренков после 3-х недель субкультивирования во всех вариантах опыта (53,3–80 % против 40 %), кроме варианта 0,3 мг/л (40 %). К 7-й неделе субкультивирования почти все варианты (кроме вариантов 0,2 и 2,0 мг/л) были наравне или превышали показатели контроля.

Что касается совместного действия препаратов крезацин и ИМК, то здесь необходимо отметить значительный разброс показателей укореняемости (33,3–73,3 % против 40 % в контроле). Последний учет данных (после 7 недель субкультивирования) дает более выровненные результаты, причем наблюдается почти полное преимущество опытных вариантов над контролем (табл. 7, рис. 20).

При использовании препарата черказ на этапе укоренения винограда *in vitro* сорта Московский белый после 3-й недели субкультивирования было выявлено превышение показателей укореняемости практически по всем вариантам (60–90 % по сравнению с 40 % в контроле), кроме вариантов 0,2 и 0,5 мг/л. Лучшими показателями после 7 недель обладает вариант с концентрацией препарата черказ 1,5 мг/л.

При совместном использовании препаратов ИМК и черказ на этапе укоренения винограда *in vitro* сорта Московский белый наблюдалась довольно равная укореняемость микропобегов (80,0–93,3 %), исключение составил вариант с концентрацией препарата черказ 1,5 мг/л (66,7 % укорененных микропобегов) и вариант с препаратом черказ 0,3 мг/л – 100 %. (табл. 8, рис. 20).

Выводы

1. При клональном микроразмножении винограда сорта Хасанский для стимулирования корнеобразования микрочеренков в состав питательной среды на основе минеральных солей 1/2 Мурасига и

Скуга в качестве стимуляторов корнеобразования эффективно добавлять препараты кремнийорганической природы, как отдельно, так и в сочетании с ИМК (мг/л): крезацин 0,2; крезацин 1,5; крезацин 1,5 + ИМК 0,5; черказ 0,4 + ИМК 0,5; черказ 1,5 + ИМК 0,5; черказ 2,0 + ИМК 0,5.

2. При клональном микроразмножении винограда сорта Агат Донской на этапе ризогенеза в состав питательной среды на основе минеральных солей 1/2 Мурасига и Скуга в качестве стимуляторов корнеобразования эффективно добавлять препараты кремнийорганической природы в сочетании с ИМК (мг/л): крезацин 0,2 + ИМК 0,5; черказ 0,1 + ИМК 0,5; черказ 0,2 + ИМК 0,5; черказ 0,4 + ИМК 0,5; черказ 0,5 + ИМК 0,5.

3. При клональном микроразмножении винограда сорта Московский белый для стимулирования корнеобразования микрочеренков в состав питательной среды на основе минеральных солей 1/2 Мурасига и Скуга в качестве стимуляторов корнеобразования эффективно добавлять препараты кремнийорганической природы, как отдельно, так и в сочетании с ИМК (мг/л): крезацин 0,1; крезацин 1,5; крезацин 0,3+ИМК 0,5; крезацин 0,4 + ИМК 0,5; крезацин 2,0 + ИМК 0,5; черказ 1,5; черказ 0,3 + ИМК 0,5.

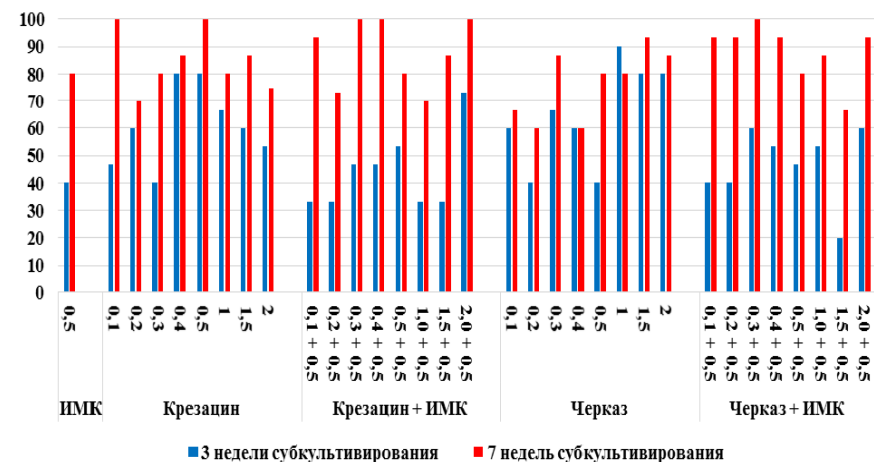


Рис. 20. Динамика укореняемости *in-vitro* микрочеренков винограда (сорт Московский белый) при добавлении в состав питательной среды препаратов крезацин и черказ, в том числе в сочетании с ИМК

Влияние препаратов крезацин на ризогенез *in vitro* растений винограда сорта Московский белый

Вариант, мг/л	Укореняемость, %		Среднее количество корней, шт.		Средняя длина корней, см		Укореняемость, %		Среднее количество корней, шт.		Средняя длина корней, см	
	3-я неделя субкультивирования		7-я неделя субкультивирования		3-я неделя субкультивирования		7-я неделя субкультивирования		3-я неделя субкультивирования		7-я неделя субкультивирования	
Контроль ИМК 0,5	40,0	0,93	0,19	80,0	2,87	0,19	80,0	2,87	0,46	0,19	80,0	2,87
Крезацин 0,1	46,7	0,73	0,31	100,0	2,00	0,31	100,0	2,00	1,39	0,31	100,0	2,00
Крезацин 0,2	60,0	1,33	0,57	70,0	1,50	0,57	70,0	1,50	2,70	0,57	70,0	1,50
Крезацин 0,3	40,0	0,53	0,52	80,0	1,00	0,52	80,0	1,00	2,12	0,52	80,0	1,00
Крезацин 0,4	80,0	1,40	0,56	86,7	2,00	0,56	86,7	2,00	2,87	0,56	86,7	2,00
Крезацин 0,5	80,0	1,73	0,41	100,0	2,93	0,41	100,0	2,93	2,51	0,41	100,0	2,93
Крезацин 1,0	66,7	1,27	0,31	80,0	2,13	0,31	80,0	2,13	1,71	0,31	80,0	2,13
Крезацин 1,5	60,0	1,07	0,24	86,7	2,33	0,24	86,7	2,33	0,71	0,24	86,7	2,33
Крезацин 2,0	53,3	0,93	0,20	75,0	2,50	0,20	75,0	2,50	0,69	0,20	75,0	2,50
НСР ₀₅	8,78	0,17	0,06	12,64	0,32	0,06	12,64	0,32	0,25	0,17	12,64	0,32
Контроль ИМК 0,5	40,0	0,93	0,19	80,0	2,87	0,19	80,0	2,87	0,46	0,19	80,0	2,87
Крезацин 0,1 + ИМК 0,5	33,3	1,07	0,10	93,3	3,13	0,10	93,3	3,13	0,69	0,10	93,3	3,13
Крезацин 0,2 + ИМК 0,5	33,3	0,73	0,21	73,3	2,47	0,21	73,3	2,47	0,81	0,21	73,3	2,47
Крезацин 0,3 + ИМК 0,5	46,7	1,80	0,21	100,0	3,27	0,21	100,0	3,27	0,78	0,21	100,0	3,27
Крезацин 0,4 + ИМК 0,5	46,7	0,87	0,23	100,0	3,60	0,23	100,0	3,60	0,77	0,23	100,0	3,60
Крезацин 0,5 + ИМК 0,5	53,3	1,07	0,22	80,0	3,10	0,22	80,0	3,10	1,35	0,22	80,0	3,10
Крезацин 1,0 + ИМК 0,5	33,3	0,67	0,07	70,0	1,90	0,07	70,0	1,90	0,66	0,07	70,0	1,90
Крезацин 1,5 + ИМК 0,5	33,3	1,13	0,15	86,7	2,33	0,15	86,7	2,33	0,99	0,15	86,7	2,33
Крезацин 2,0 + ИМК 0,5	73,3	2,07	0,14	100,0	4,33	0,14	100,0	4,33	1,24	0,14	100,0	4,33
НСР ₀₅	6,55	0,17	0,03	13,06	0,45	0,03	13,06	0,45	0,13	0,17	13,06	0,45

43

Влияние препаратов черказ на ризогенез *in vitro* растений винограда сорта Московский белый

Вариант, мг/л	Укореняемость, %		Среднее количество корней, шт.		Средняя длина корней, см		Укореняемость, %		Среднее количество корней, шт.		Средняя длина корней, см	
	3-я неделя субкультивирования		7-я неделя субкультивирования		3-я неделя субкультивирования		7-я неделя субкультивирования		3-я неделя субкультивирования		7-я неделя субкультивирования	
Контроль ИМК 0,5	40,0	0,93	0,19	80,0	2,87	0,19	80,0	2,87	0,46	0,19	80,0	2,87
Черказ 0,1	60,0	0,87	1,26	66,7	1,33	1,26	66,7	1,33	2,84	1,26	66,7	1,33
Черказ 0,2	40,0	0,67	0,81	60,0	1,13	0,81	60,0	1,13	1,79	0,81	60,0	1,13
Черказ 0,3	66,7	1,33	1,21	86,7	2,00	1,21	86,7	2,00	1,56	1,21	86,7	2,00
Черказ 0,4	60,0	1,13	1,13	60,0	1,00	1,13	60,0	1,00	1,50	1,13	60,0	1,00
Черказ 0,5	40,0	0,73	1,36	80,0	1,47	1,36	80,0	1,47	1,93	1,36	80,0	1,47
Черказ 1,0	90,0	1,70	1,18	80,0	3,00	1,18	80,0	3,00	2,11	1,18	80,0	3,00
Черказ 1,5	80,0	1,53	1,10	93,3	2,07	1,10	93,3	2,07	2,22	1,10	93,3	2,07
Черказ 2,0	80,0	1,73	1,20	86,7	2,27	1,20	86,7	2,27	1,76	1,20	86,7	2,27
НСР ₀₅	9,3	0,2	0,2	11,6	0,3	0,2	11,6	0,3	0,3	0,2	11,6	0,3
Контроль ИМК 0,5	40,0	0,93	0,19	80,0	2,87	0,19	80,0	2,87	0,46	0,19	80,0	2,87
Черказ 0,1 + ИМК 0,5	40,0	1,00	0,13	93,3	3,40	0,13	93,3	3,40	0,64	0,13	93,3	3,40
Черказ 0,2 + ИМК 0,5	40,0	0,60	0,25	93,3	2,73	0,25	93,3	2,73	0,64	0,25	93,3	2,73
Черказ 0,3 + ИМК 0,5	60,0	1,47	0,39	100,0	3,80	0,39	100,0	3,80	1,32	0,39	100,0	3,80
Черказ 0,4 + ИМК 0,5	53,3	1,33	0,20	93,3	3,13	0,20	93,3	3,13	1,68	0,20	93,3	3,13
Черказ 0,5 + ИМК 0,5	46,7	1,20	0,20	80,0	2,70	0,20	80,0	2,70	1,41	0,20	80,0	2,70
Черказ 1,0 + ИМК 0,5	53,3	1,73	0,26	86,7	2,80	0,26	86,7	2,80	1,81	0,26	86,7	2,80
Черказ 1,5 + ИМК 0,5	20,0	0,40	0,17	66,7	1,93	0,17	66,7	1,93	1,00	0,17	66,7	1,93
Черказ 2,0 + ИМК 0,5	60,0	2,20	0,23	93,3	3,33	0,23	93,3	3,33	1,50	0,23	93,3	3,33
НСР ₀₅	6,9	0,2	0,1	13,1	0,4	0,1	13,1	0,4	0,2	0,2	13,1	0,4

44

3.2. Последствие введения в состав питательной среды на этапе ризогенеза кремнийорганических соединений на приживаемость микрорастений винограда межвидового происхождения на этапах адаптации и доращивания

Заключительным и наиболее ответственным его этапом является адаптация микрорастений к нестерильным условиям так как потери при этом могут превышать более 90 % (Аладина О.Н., Акимова С.В., Ковалева И.С., Дубровская С.О., Батрак Е.Р., Аладин С.А., 2009; Деменко В.И., Шестибратов К.А., Лебедев В.Г., 2011). Термин адаптация (приспособление) означает способность физиологии организма приспособиться к условиям обитания. Во время роста *in vitro* растения развиваются при высокой влажности воздуха, низкой освещенности, с низким водным потенциалом среды, гетеротрофным питанием, строго контролируемым температурным режимом. Поэтому после переноса микрорастений в нестерильные условия они подвергаются различным физиологическим стрессам. Гетеротрофное питание приводит к полной или частичной потере способности листового аппарата к активному фотосинтезу. Также при пересадке на адаптацию возникают проблемы из-за недостаточно функционирования корневой системы микрорастений: она не в состоянии поглотить необходимое количество воды и элементов питания, чтобы компенсировать транспирацию и обеспечить интенсивный рост (Деменко В.И., Лебедев В.Г., Шестибратов К.А., 2010; Pliego-Alfare F.J., 1988).

Приживаемость растений регенератов при адаптации зависит от комплекса факторов: развития корневой системы эксплантов, типа субстрата, освещенности, температуры и влажности воздуха, инфекционной нагрузки, деятельности устьичного аппарата, транспирации, проявления дисбаланса между листовым аппаратом и корневой системой (Аладина О.Н., Акимова С.В., Ковалева И.С., Дубровская С.О., Батрак Е.Р., Аладин С.А., 2009; Деменко В.И., Лебедев В.Г., 2010; Деменко В.И., Шестибратов К.А., Лебедев В.Г., 2011; Корнацкий С.А., 2003).

Поэтому сейчас большое внимание при совершенствовании технологии клонального микроразмножения уделяют изучению влияния новых биологически активных веществ на ризогенез *in vitro* в том числе биологически активных препаратов кремнийорганической природы, но практически нет исследований по последствию данных приемов на этапе адаптации чему и посвящена данная работа.

Цель исследований: совершенствование элементов технологии клонального микроразмножения сортов винограда межвидового проис-

хождения, направленных на повышение приживаемости *ex vitro* растений на этапе адаптации к нестерильным условиям.

Задачи исследований: выявить последствие введения в состав питательной среды на этапе ризогенеза кремнийорганических соединений крезацин и черказ в качестве стимуляторов корнеобразования на приживаемость и развитие *ex vitro* растений винограда на этапе адаптации.

Методика исследований

Опыты проводили в лаборатории клонального микроразмножения РГАУ-МСХА в 2017–2018 гг.

Объекты исследований – сорта винограда межвидовых гибридов раннего срока созревания: Хасанский, Агат Донской, Московский белый.

Питательная среда для ризогенеза на этапе укоренения содержала – 1/2 макро-, микросолей по Мурасига и Скуга (МС), витамины В₁, В₆, РР по 0,5 мг/л, сахароза – 15000 мг/л, агар-агар – 7000 мг/л. В опытных вариантах в питательную среду добавляли препараты крезацин и черказ, а также производили совмещение данных препаратов с ИМК (табл. 9). Повторность трехкратная по 10 растений.

Таблица 9

Схема опыта

Крезацин, мг/л	Черказ, мг/л	Крезацин + ИМК, мг/л	Черказ + ИМК, мг/л
0,1	0,1	0,1	0,5
0,2	0,2	0,2	0,5
0,3	0,3	0,3	0,5
0,4	0,4	0,4	0,5
0,5	0,5	0,5	0,5
1,0	1,0	1,0	0,5
1,5	1,5	1,5	0,5
2,0	2,0	2,0	0,5

Культуры инкубировали при интенсивности освещения 2500 люкс, 16-часовом фотопериоде, температуре 20–22 °С.

Пересадку растений в нестерильные условия по вариантам опыта осуществляли через 45 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. В условиях теплицы для адаптации микрорастениям в течение 2 недель обеспечивали высокую влажность (80–90 %). При этом постепенно увеличивали продолжительность ежедневного кратковременного проветривания, температуру поддер-

живали в интервале 20–25 °С. Учеты динамики роста и развития растений на этапе адаптации производили через 30 дней после высадки каждого варианта.

После 30 дней адаптации к нестерильным условиям, опытные растения переваливали в контейнеры объемом 1,06 литра наполненные почвогрунтом, который состоял из верхового сфагнового торфа низкой степени разложения (до 20 %) с добавлением известковой муки, комплексного минерального удобрения с микроэлементами, а также магния сернокислого. Фракции 0–20 мм, рН (КСl) 5,6. Содержание питательных веществ: азот не менее 115 мг на 100 г, фосфор не менее 110 мг на 100 г, калий не менее 180 мг на 100 г.

Учеты динамики роста и развития растений производили на 60-й день после перевалки.

Повторность опытов на этапе адаптации – двукратная по 7 растений, на этапе доращивания – пятикратная по 1 растению в повторности. Математическая обработка данных проводилась по Доспехову В.А. с использованием программы Excel (2007).

Результаты исследований и их обсуждение

В предыдущих исследованиях было выявлено, что на этапе ризогенеза винограда сорта Хасанский в состав питательной среды на основе минеральных солей 1/2 Мурасига и Скуга в качестве стимуляторов корнеобразования микрочеренков винограда эффективно добавлять препараты кремнийорганической природы, как отдельно, так и в сочетании с ИМК (мг/л): крезацин 0,2; крезацин 1,5; крезацин 1,5 + ИМК 0,5; черказ 0,4 + ИМК 0,5; черказ 1,5 + ИМК 0,5; черказ 2,0 + ИМК 0,5. При пересадке микрорастений на этап адаптации к нестерильным условиям в целом по вариантам приживаемость колебалась в пределах 53–100 %.

Для лучшей наглядности результатов опыта при учетах приживаемости и развития растений винограда *in vivo* мы ввели группировку по долям (%) с различным развитием: сильным, средним и слабым (табл. 10).

Таблица 10

Распределение показателей роста и развития растений винограда сорта Хасанский по условным группам

Вариант группировки	Суммарная длина побегов, см	Площадь листовой поверхности, см ²	Суммарная длина корней, см
Сильные	20,0–23,8	6,1–16,5	5,1–8,3
Средние	10,0–19,9	2,6–6,0	3,8–5,0
Слабые	2,0–9,9	1,0–2,5	1,8–3,7

При учетах через 60 дней после высадки микрорастений на адаптацию и изучения последствий добавления в питательную среду препарата крезацин, сохранилось преимущество вариантов крезацин 0,2 мг/л; крезацин 1,5 мг/л, где приживаемость микрорастений составила 93,3 %, а доля адаптированных растений с сильным и средним развитием – 70–71,4 %.

Следует особо отметить варианты: крезацин 2,0 мг/л; крезацин 0,5 мг/л + ИМК 0,5 мг/л, приживаемость в которых также составила 93,3 %, а доля адаптированных растений с сильным и средним развитием – 92,9 %.

В контрольном варианте с ИМК 0,5 мг/л приживаемость микрорастений также составляла 93,3 %, но доля адаптированных растений с сильным и средним развитием составила всего 42,9 % (табл. 11, рис. 21, приложение).

После 30 дней адаптации к нестерильным условиям *ex vitro* растения винограда были пересажены в контейнеры объемом 1,06 л и перенесены в отсек для доращивания. Учеты показателей роста и развития на 60 день доращивания показали преимущество вариантов (мг/л): крезацин 2,0; крезацин 0,5 + ИМК 0,5, так как в данных вариантах приживаемость растений на этапе адаптации составила 93,3 %, а доля саженцев с закрытой корневой системой, соответствующих требованиям ГОСТ 31783–2012 – 100 % (табл. 12, рис. 21, приложение).

При изучении последствий добавления в питательную среду препарата черказ, сохранилось преимущество ранее выделенных на этапе ризогенеза вариантов (мг/л): черказ 0,4 + ИМК 0,5; черказ 1,5 + ИМК 0,5; черказ 2,0 + ИМК 0,5, где приживаемость микрорастений составила 93,3 %, а доля адаптированных растений с сильным и средним развитием – 78,6–100 %.

Также выделился вариант с концентрацией препарата черказ 1 мг/л, где приживаемость составила 100 %, а доля растений с сильным и средним развитием – 80 % (табл. 13, рис. 21, приложение).

Учеты показателей роста и развития на этапе доращивания показали преимущество варианта (мг/л) черказ 0,4 + ИМК 0,5, так как в данном случае приживаемость на этапе адаптации составила 93,3 %, а доля саженцев с закрытой корневой системой, соответствующих требованиям ГОСТ 31783–2012 – 100 % (табл. 14, рис. 21, приложение).

Так как в опытных вариантах были отмечены резкие колебания по укореняемости на этапе ризогенеза, приживаемости на этапе адаптации и доле саженцев, соответствующих техническим требованиям, мы решили по каждому варианту сделать перерасчет и определить итоговое количество саженцев с закрытой корневой системой соответствующих требованиям ГОСТ 31783–2012 от числа 100 микрорастений, взятых для укоренения на этапе ризогенеза (табл. 15, рис. 22, приложение).

Таблица 11

Приживаемость в нестерильных условиях микрорастений винограда (сорт Хасанский) после введения в состав питательной среды на этапе ризогенеза препарата крезацин в качестве стимулятора корнеобразования (30-й день адаптации)

Вариант, мг/л	Приживаемость, %	Доля адаптированных растений с сильным и средним развитием, %	Средняя длина побегов, см	Средняя длина корней, см	Средняя суммарная площадь листовой поверхности, см ²
Контроль ИМК 0,5	93,3	42,9	22,6	20,4	18,1
Крезацин 0,1	73,3	72,7	14,3	19,5	25,0
Крезацин 0,2	93,3	71,4	17,9	28,4	43,4
Крезацин 0,3	66,7	70,0	15,4	18,9	26,4
Крезацин 0,4	86,7	84,6	18,5	28,6	47,3
Крезацин 0,5	80,0	50,0	11,9	19,9	23,4
Крезацин 1,0	73,3	90,9	20,0	25,6	44,5
Крезацин 1,5	93,3	71,4	15,9	26,3	36,6
Крезацин 2,0	93,3	92,9	20,9	31,8	53,9
НСР ₀₅	12,55	10,78	2,62	3,66	5,31
Крезацин 0,1 + ИМК 0,5	53,3	75,0	15,3	13,8	16,8
Крезацин 0,2 + ИМК 0,5	80,0	83,3	18,1	24,8	38,4
Крезацин 0,3 + ИМК 0,5	80,0	66,7	14,2	21,8	29,2
Крезацин 0,4 + ИМК 0,5	53,3	75,0	15,9	14,8	20,3
Крезацин 0,5 + ИМК 0,5	93,3	92,9	20,1	60,7	50,4
Крезацин 1,0 + ИМК 0,5	66,7	80,0	18,9	21,4	34,5
Крезацин 1,5 + ИМК 0,5	73,3	90,9	23,6	26,7	48,0
Крезацин 2,0 + ИМК 0,5	80,0	83,3	18,8	25,9	41,9
НСР ₀₅	11,22	11,50	2,79	3,34	4,96

49

Таблица 12

Последствие введения в состав питательной среды на этапе ризогенеза препарата крезацин в качестве стимулятора корнеобразования на развитие ex vitro растений винограда при доращивании (сорт Хасанский) (60-й день доращивания)

Вариант, мг/л	Доля саженцев с з.к.с., соответствующих требованиям ГОСТ, %	Средняя длина побегов, см	Средняя суммарная площадь листовой поверхности, см ²	Средняя длина корней, см	Среднее число корней, шт.
Контроль ИМК 0,5	52,9	52,6	54,3	30,4	13,3
Крезацин 0,1	83,2	44,6	77,5	30,4	13,0
Крезацин 0,2	82,0	48,7	147,6	38,6	17,0
Крезацин 0,3	80,3	46,3	73,9	29,6	11,8
Крезацин 0,4	95,4	50,0	137,2	39,0	17,2
Крезацин 0,5	60,9	42,4	77,2	30,4	12,3
Крезацин 1,0	100,0	50,7	115,7	36,2	15,2
Крезацин 1,5	82,1	46,9	98,8	36,6	16,7
Крезацин 2,0	100,0	52,1	172,5	42,6	19,3
НСР ₀₅	12,28	7,24	15,91	5,23	2,23
Крезацин 0,1 + ИМК 0,5	85,9	45,8	55,4	24,3	9,5
Крезацин 0,2 + ИМК 0,5	93,5	48,8	99,8	35,4	15,5
Крезацин 0,3 + ИМК 0,5	77,4	45,2	78,8	32,1	13,8
Крезацин 0,4 + ИМК 0,5	85,4	47,1	65,0	25,6	9,7
Крезацин 0,5 + ИМК 0,5	100	50,4	156,2	71,6	19,2
Крезацин 1,0 + ИМК 0,5	90,6	49,7	117,3	31,6	12,8
Крезацин 1,5 + ИМК 0,5	100	54,5	134,4	37,4	15,3
Крезацин 2,0 + ИМК 0,5	94,1	50,3	121,5	36,3	15,7
НСР ₀₅	13,63	7,35	15,53	5,52	2,06

50

Приживаемость в нестерильных условиях микрорастений винограда (сорт Хасанский) после введения в состав питательной среды на этапе ризогенеза препарата черказ в качестве стимулятора корнеобразования (30-й день адаптации)

Вариант, мг/л	Приживаемость, %	Доля адаптированных растений с сильным и средним развитием, %	Средняя длина побегов, см	Средняя длина корней, см	Средняя суммарная площадь листовой поверхности, см ²
Контроль ИМК 0,5	93,3	42,9	22,6	20,4	18,1
Черказ 0,1	86,7	61,5	13,7	25,2	36,8
Черказ 0,2	86,7	84,6	17,6	27,5	43,8
Черказ 0,3	60,0	66,7	16,6	17,2	24,5
Черказ 0,4	73,3	54,5	14,1	20,8	29,4
Черказ 0,5	60,0	55,6	14,9	17,8	26,7
Черказ 1,0	100,0	80,0	18,7	31,6	50,0
Черказ 1,5	80,0	75,0	12,0	20,1	23,5
Черказ 2,0	86,7	53,8	12,3	21,6	25,3
НСР ₀₅	12,11	9,58	2,37	3,37	4,64
Черказ 0,1 + ИМК 0,5	40,0	100,0	20,8	12,3	18,7
Черказ 0,2 + ИМК 0,5	80,0	75,0	19,8	24,4	37,2
Черказ 0,3 + ИМК 0,5	53,3	75,0	17,6	17,0	27,1
Черказ 0,4 + ИМК 0,5	93,3	100,0	26,7	35,4	65,4
Черказ 0,5 + ИМК 0,5	53,3	100,0	26,6	21,0	39,8
Черказ 1,0 + ИМК 0,5	60,0	77,8	16,3	16,5	22,2
Черказ 1,5 + ИМК 0,5	93,3	78,6	19,1	29,9	48,0
Черказ 2,0 + ИМК 0,5	93,3	85,7	20,3	31,4	52,7
НСР ₀₅	11,00	12,25	3,16	3,47	5,49

51

Последствие введения в состав питательной среды на этапе ризогенеза препарата черказ в качестве стимулятора корнеобразования на развитии ex vitro растений винограда при доращивании (сорт Хасанский) (60-й день доращивания)

Вариант, мг/л	Доля саженцев с з.к.с., соответствующих требованиям ГОСТ, %	Средняя длина побегов, см	Средняя суммарная площадь листовой поверхности, см ²	Средняя длина корней, см	Среднее число корней, шт.
Контроль ИМК 0,5	52,9	52,6	54,3	30,4	13,3
Черказ 0,1	72,4	44,2	121,4	35,7	14,8
Черказ 0,2	94,8	48,3	113,9	38,1	17,0
Черказ 0,3	77,4	47,6	66,2	27,5	10,5
Черказ 0,4	64,9	45,3	94,1	31,6	12,0
Черказ 0,5	66,1	45,2	82,8	28,7	10,0
Черказ 1,0	90,6	49,5	170,0	41,8	19,2
Черказ 1,5	85,3	42,9	65,8	30,8	14,2
Черказ 2,0	64,6	43,8	73,4	32,0	13,7
НСР ₀₅	11,15	6,99	14,03	4,94	2,07
Черказ 0,1 + ИМК 0,5	100,0	51,1	58,0	23,2	8,3
Черказ 0,2 + ИМК 0,5	85,6	50,6	126,5	34,6	14,8
Черказ 0,3 + ИМК 0,5	85,3	48,5	75,9	27,7	10,0
Черказ 0,4 + ИМК 0,5	100,0	58,2	189,7	45,8	20,5
Черказ 0,5 + ИМК 0,5	100,0	57,1	131,3	31,5	11,8
Черказ 1,0 + ИМК 0,5	88,0	47,0	57,7	27,1	11,0
Черказ 1,5 + ИМК 0,5	89,3	50,1	129,6	40,2	17,8
Черказ 2,0 + ИМК 0,5	96,1	51,5	168,6	42,2	18,7
НСР ₀₅	13,96	7,76	17,57	5,11	2,06

52

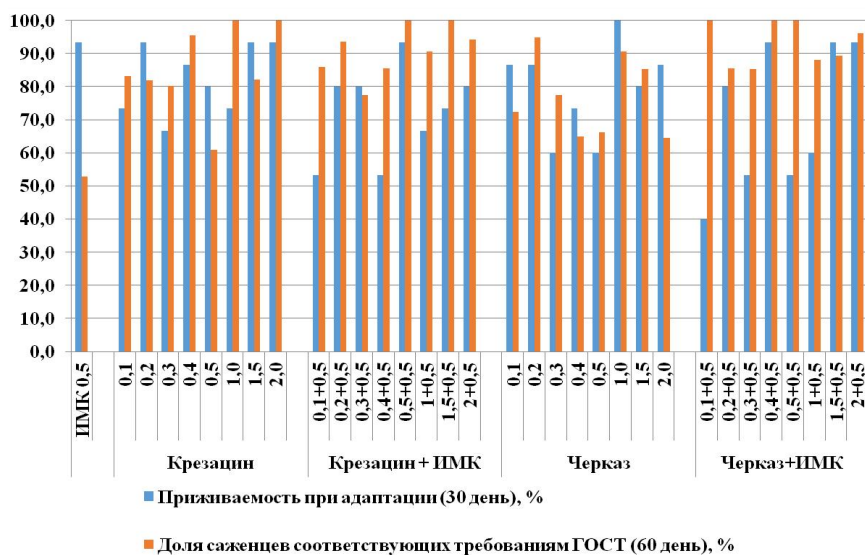


Рис. 21. Влияние введения в состав питательной среды на этапе ризогенеза кремнийорганических соединений на приживаемость в нестерильных условиях и долю *ex vitro* растений винограда, соответствующих требованиям ГОСТ (сорт Хасанский)

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при клональном микроразмножении винограда сорта Хасанский наиболее эффективно на этапе ризогенеза в состав питательной среды в качестве стимуляторов корнеобразования добавлять (мг/л): крезацин 2,0; крезацин 0,5 + ИМК 0,5; черказ 0,4 + ИМК 0,5; черказ 2,0 + ИМК 0,5. Так как через 60 дней доращивания в данных вариантах количество растений соответствующих требованиям ГОСТ составило 87–93 шт. против 49 шт. в контроле от числа 100 микрорастений, взятых для укоренения на этапе ризогенеза (табл. 15, рис. 22, приложение).

В предыдущих исследованиях было выявлено, что на этапе ризогенеза винограда сорта Агат Донской в состав питательной среды на основе минеральных солей ½ Мурасига и Скуга в качестве стимуляторов корнеобразования эффективно добавлять препараты кремнийорганической природы в сочетании с ИМК (мг/л): крезацин 0,2 + ИМК 0,5; черказ 0,1 + ИМК 0,5; черказ 0,2 + ИМК 0,5; черказ 0,4 + ИМК 0,5; черказ 0,5 + ИМК 0,5.

Для лучшей наглядности результатов опыта при учетах приживаемости и развития растений винограда *in vivo* мы ввели группировку по долям (%) с различным развитием: сильным, средним и слабым (табл. 16).

Таблица 15

Итоговое количество растений винограда (сорт Хасанский) соответствующих требованиям ГОСТ из расчета 100 микрорастений, взятых для укоренения на этапе ризогенеза

Вариант, мг/л	Укореняемость <i>in vitro</i> на 7-й неделе субкультивирования, %	Укореняемость <i>in vitro</i> на 7-й неделе субкультивирования, шт.	Приживаемость на 30-й день адаптации, %	Приживаемость на 30-й день адаптации, шт.	Доля саженцев, соответствующих требованиям ГОСТ на 60-й день доращивания, %	Количество саженцев, соответствующих требованиям ГОСТ на 60-й день доращивания, шт.
ИМК 0,5	100,0	100	93,3	93	52,9	49
0,1	86,7	87	73,3	64	83,2	53
0,2	100,0	100	93,3	93	82,0	76
0,3	60,0	60	66,7	40	80,3	32
0,4	93,3	93	86,7	81	95,4	77
0,5	93,3	93	80,0	74	60,9	45
1,0	66,7	67	73,3	49	100,0	49
1,5	100,0	100	93,3	93	82,1	76
2,0	93,3	93	93,3	87	100	87
0,1 + 0,5	73,3	73	53,3	39	85,9	34
0,2 + 0,5	86,7	87	80,0	72	93,5	67
0,3 + 0,5	86,7	87	80,0	58	77,4	45
0,4 + 0,5	93,3	93	53,3	70	85,4	60
0,5 + 0,5	93,3	93	93,3	87	100,0	87
1,0 + 0,5	80,0	80	66,7	64	90,6	58
1,5 + 0,5	100,0	100	73,3	91	100,0	91
2,0 + 0,5	93,3	93	80,0	78	94,1	73

Вариант, мг/л	Укореняемость <i>in vitro</i> на 7-й неделе субкультивирования, %	Укореняемость <i>in vitro</i> на 7-й неделе субкультивирования, шт.	Приживаемость на 30-й день адаптации, %	Приживаемость на 30-й день адаптации, шт.	Доля саженцев, соответствующих требованиям ГОСТ на 60-й день доращивания, %	Количество саженцев, соответствующих требованиям ГОСТ на 60-й день доращивания, шт.
Черказ						
0,1	80,0	80	86,7	69	72,4	50
0,2	86,7	87	86,7	75	94,8	71
0,3	46,7	47	60,0	28	77,4	22
0,4	73,3	73	73,3	54	64,9	35
0,5	60,0	60	60,0	36	66,1	24
1,0	86,7	87	100,0	87	90,6	79
1,5	80,0	80	80,0	64	85,3	55
2,0	80,0	80	86,7	69	64,6	45
Черказ + ИМК						
0,1 + 0,5	86,7	87	40,0	35	100,0	35
0,2 + 0,5	80,0	80	80,0	64	85,6	55
0,3 + 0,5	66,7	67	53,3	36	85,3	31
0,4 + 0,5	100,0	100	93,3	93	100,0	93
0,5 + 0,5	66,7	67	53,3	36	100,0	36
1,0 + 0,5	93,3	93	60,0	56	88,0	49
1,5 + 0,5	100,0	100	93,3	93	89,3	83
2,0 + 0,5	100,0	100	93,3	93	96,1	89

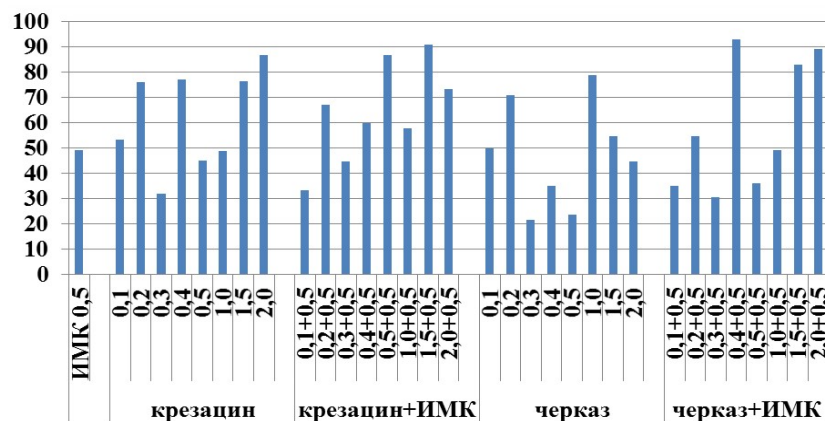


Рис. 22. Итоговое количество растений винограда (сорт Хасанский) соответствующих требованиям ГОСТ из расчета 100 микрорастений, взятых для укоренения на этапе ризогенеза (60-й день доращивания)

Таблица 16

Распределение показателей роста и развития растений винограда сорта Агат Донской по условным группам

Вариант группировки	Суммарная длина побегов, см	Площадь листовой поверхности, см ²	Суммарная длина корней, см
Сильные	17,0–21,5	9,0–23,0	7,0–8,5
Средние	9,0–16,9	2,5–8,9	4,5–6,9
Слабые	2,0–8,9	0,5–2,4	1,5–4,4

При учетах через 30 дней после высадки микрорастений сорта Агат Донской на адаптацию и изучении последствий добавления в питательную среду препарата кресацин, сохранилось преимущество варианта кресацин 0,2 мг/л + ИМК 0,5 мг/л и выделился также вариант кресацин 0,5 мг/л + ИМК 0,5 мг/л, где приживаемость микрорастений составила 73,3 % против 53,3 % в контроле, а доля адаптированных растений с сильным и средним развитием – 72,7 % против 62,5 % в контроле (табл. 17, рис. 23).

Учеты показателей роста и развития на этапе доращивания показали преимущество вариантов (мг/л): кресацин 0,2 + ИМК 0,5 и кресацин 0,5 + ИМК 0,5, так как в данном случае приживаемость на этапе адаптации составила 73,3 %, а доля саженцев с закрытой корневой системой, соответствующих требованиям ГОСТ 31783–2012 – 82,9–83,2 % (табл. 18, рис. 23, приложение).

Приживаемость в нестерильных условиях микрорастений винограда (сорт Агат Донской) после введения в состав питательной среды на этапе ризогенеза препарата крезацин в качестве стимулятора корнеобразования (30-й день адаптации)

Вариант, мг/л	Приживаемость, %	Доля адаптированных растений с сильным и средним развитием, %	Средняя длина побегов, см	Средняя длина корней, см	Средняя суммарная площадь листовой поверхности, см ²
Контроль ИМК 0,5	53,3	62,5	15,3	16,7	16,7
Крезацин 0,1	40,0	50,0	11,6	11,8	10,9
Крезацин 0,2	46,7	42,9	8,3	13,3	11,6
Крезацин 0,3	53,3	50,0	10,0	16,3	23,8
Крезацин 0,4	26,7	75,0	13,5	8,8	9,4
Крезацин 0,5	40,0	50,0	10,7	11,8	10,9
Крезацин 1,0	66,7	60,0	11,9	20,9	25,0
Крезацин 1,5	53,3	75,0	13,4	17,7	18,8
Крезацин 2,0	26,7	75,0	14,7	8,8	9,4
НСР ₀₅	6,78	9,01	1,82	2,10	2,28
Крезацин 0,1 + ИМК 0,5	33,3	60,0	12,4	10,3	10,1
Крезацин 0,2 + ИМК 0,5	73,3	72,7	14,4	24,6	34,7
Крезацин 0,3 + ИМК 0,5	53,3	37,5	11,1	14,8	12,3
Крезацин 0,4 + ИМК 0,5	66,7	60,0	11,6	20,9	25,0
Крезацин 0,5 + ИМК 0,5	73,3	72,7	14,5	24,6	34,7
Крезацин 1,0 + ИМК 0,5	73,3	45,5	11,9	21,5	23,5
Крезацин 1,5 + ИМК 0,5	60,0	66,7	12,6	19,4	24,2
Крезацин 2,0 + ИМК 0,5	40,0	83,3	16,0	13,7	15,2
НСР ₀₅	8,78	9,35	2,00	2,78	3,27

57

Последствие введения в состав питательной среды на этапе ризогенеза препарата крезацин в качестве стимулятора корнеобразования на развитие *ex vitro* растений винограда при доращивании (сорт Агат Донской) (60-й день доращивания)

Вариант, мг/л	Доля саженцев с з.к.с., соответствующих требованиям ГОСТ, %	Средняя длина побегов, см	Средняя суммарная площадь листовой поверхности, см ²	Средняя длина корней, см	Среднее число корней, шт.
Контроль ИМК 0,5	72,5	45,3	50,1	26,7	8,0
Крезацин 0,1	60,5	41,9	33,8	22,7	5,3
Крезацин 0,2	53,5	39,1	39,4	23,5	5,7
Крезацин 0,3	60,3	40,9	66,6	27,0	7,3
Крезацин 0,4	85,8	45,0	27,3	19,2	4,4
Крезацин 0,5	60,9	41,2	36,0	22,3	5,3
Крезацин 1,0	70,2	42,6	65,0	31,5	9,8
Крезацин 1,5	85,7	44,4	50,8	28,0	8,9
Крезацин 2,0	85,4	45,9	30,1	19,6	4,4
НСР ₀₅	10,58	6,44	6,65	3,68	0,97
Крезацин 0,1 + ИМК 0,5	70,9	42,9	33,3	20,8	4,9
Крезацин 0,2 + ИМК 0,5	82,9	45,1	90,2	35,2	12,2
Крезацин 0,3 + ИМК 0,5	48,2	42,1	33,2	25,1	6,2
Крезацин 0,4 + ИМК 0,5	70,4	42,8	80,0	31,7	9,8
Крезацин 0,5 + ИМК 0,5	83,2	44,8	107,6	35,5	12,2
Крезацин 1,0 + ИМК 0,5	56,1	42,7	79,9	31,7	9,4
Крезацин 1,5 + ИМК 0,5	77,0	43,5	67,8	30,1	9,4
Крезацин 2,0 + ИМК 0,5	94,1	47,5	44,1	24,1	7,1
НСР ₀₅	10,93	6,59	10,05	4,39	1,31

58

При изучении последствий добавления в питательную среду препарата черказ, сохранилось преимущество ранее выделенных на этапе ризогенеза вариантов (мг/л): черказ 0,1 + ИМК 0,5 и черказ 0,4 + ИМК 0,5, где приживаемость микрорастений составила 73,3–80 %, а доля адаптированных растений с сильным и средним развитием – 66,7–81,8 %.

Также выделился вариант (мг/л): черказ 0,3 + ИМК 0,5, где приживаемость составила 80 %, а доля растений с сильным и средним развитием – 83,3 % (табл. 19, рис. 23).

На этапе доращивания было выявлено преимущество вариантов (мг/л): черказ 0,1 + ИМК 0,5; черказ 0,3 + ИМК 0,5 и черказ 0,4 + ИМК 0,5, где приживаемость микрорастений составила 73,3–80 %, а доля саженцев с закрытой корневой системой, соответствующих требованиям ГОСТ 31783–2012 – 77,5–93,6 % (табл. 20, рис. 23, приложение).

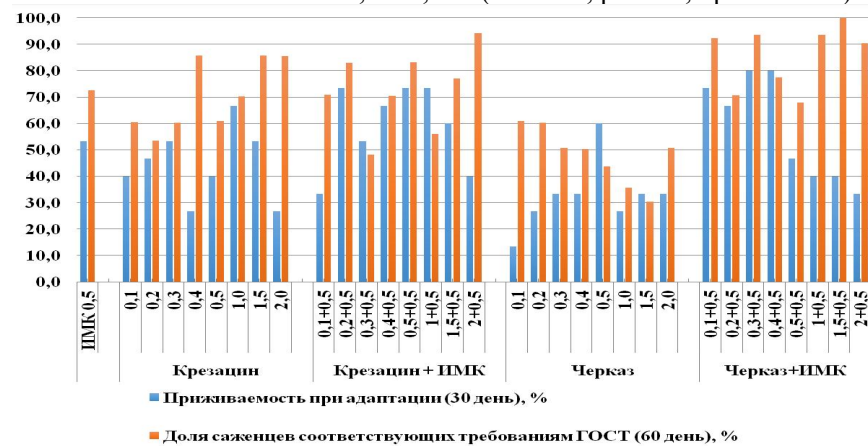


Рис. 23. Влияние введения в состав питательной среды на этапе ризогенеза кремнийорганических соединений на приживаемость в нестерильных условиях и долю *ex vitro* растений винограда, соответствующих требованиям ГОСТ (сорт Агат Донской)

Перерасчёт и определение итогового количества саженцев с закрытой корневой системой соответствующих требованиям ГОСТ 31783–2012 от числа 100 микрорастений, взятых для укоренения на этапе ризогенеза показал, что при клональном микроразмножении винограда сорта Агат Донской наиболее эффективно на этапе ризогенеза в состав питательной среды в качестве стимуляторов корнеобразования добавлять (мг/л): крезацин 0,2 + ИМК 0,5; черказ 0,1 + ИМК 0,5; черказ 0,3 + ИМК 0,5; черказ 0,4 + ИМК 0,5.

Так как через 60 дней после высадки на доращивание в данных вариантах количество растений, соответствующих требованиям ГОСТ составило 61–70 шт., против 36 шт. в контроле от числа 100 микрорастений, взятых для укоренения на этапе ризогенеза (табл. 21, рис. 24).

Таблица 19

Приживаемость в нестерильных условиях микрорастений винограда (сорт Агат Донской) после введения в состав питательной среды на этапе ризогенеза препарата черказ в качестве стимулятора корнеобразования (30-й день адаптации)

Вариант, мг/л	Приживаемость, %	Доля адаптированных растений с сильным и средним развитием, %	Средняя длина побегов, см	Средняя длина корней, см	Средняя суммарная площадь листовой поверхности, см ²
Контроль ИМК 0,5	53,3	62,5	15,3	16,7	16,7
Черказ 0,1	13,3	50,0	12,0	3,9	3,6
Черказ 0,2	26,7	50,0	10,5	7,9	7,2
Черказ 0,3	33,3	40,0	11,2	9,4	7,9
Черказ 0,4	33,3	40,0	9,7	9,4	7,9
Черказ 0,5	60,0	33,3	10,2	16,3	13,0
Черказ 1,0	26,7	25,0	8,2	6,9	5,0
Черказ 1,5	33,3	20,0	9,8	8,4	5,8
Черказ 2,0	33,3	40,0	8,3	9,4	7,9
НСР ₀₅	5,22	6,01	1,59	1,47	1,25
Черказ 0,1 + ИМК 0,5	73,3	81,8	16,3	25,5	36,9
Черказ 0,2 + ИМК 0,5	66,7	60,0	17,0	21,7	39,0
Черказ 0,3 + ИМК 0,5	80,0	83,3	16,3	28,0	39,8
Черказ 0,4 + ИМК 0,5	80,0	66,7	11,6	25,8	30,8
Черказ 0,5 + ИМК 0,5	46,7	57,1	16,0	14,5	18,4
Черказ 1,0 + ИМК 0,5	40,0	83,3	19,3	14,2	24,6
Черказ 1,5 + ИМК 0,5	40,0	100,0	22,8	15,7	36,2
Черказ 2,0 + ИМК 0,5	33,3	80,0	16,3	11,5	17,0
НСР ₀₅	8,56	11,25	2,52	2,89	4,32

Таблица 20

Последствие введения в состав питательной среды на этапе ризогенеза препарата черказ в качестве стимулятора корнеобразования на развитие *ex vitro* растений винограда при доращивании (сорт Агат Донской) (60-й день доращивания)

Вариант, мг/л	Доля саженцев с з.к.с., соответствующих требованиям ГОСТ, %	Средняя длина побегов, см	Средняя суммарная площадь листовой поверхности, см ²	Средняя длина корней, см	Среднее число корней, шт.
Контроль ИМК 0,5	72,5	45,3	50,1	26,7	8,0
Черказ 0,1	60,9	42,5	11,9	14,4	1,8
Черказ 0,2	60,2	41,2	18,7	18,5	3,5
Черказ 0,3	50,7	42,2	21,3	19,7	4,0
Черказ 0,4	50,4	40,9	25,3	20,2	4,0
Черказ 0,5	43,8	40,5	40,3	27,2	6,6
Черказ 1,0	35,6	39,0	17,0	17,1	2,6
Черказ 1,5	30,3	40,7	16,2	19,1	3,1
Черказ 2,0	50,8	39,8	22,9	19,8	4,0
НСР ₀₅	7,59	6,20	3,73	3,05	0,65
Черказ 0,1 + ИМК 0,5	92,3	46,6	114,4	36,4	13,1
Черказ 0,2 + ИМК 0,5	70,6	47,8	132,6	31,9	10,1
Черказ 0,3 + ИМК 0,5	93,6	47,2	111,4	38,7	14,4
Черказ 0,4 + ИМК 0,5	77,5	43,1	89,3	36,2	12,5
Черказ 0,5 + ИМК 0,5	68,0	46,5	60,7	25,0	6,7
Черказ 1,0 + ИМК 0,5	93,5	50,0	64,0	24,8	7,3
Черказ 1,5 + ИМК 0,5	100,0	53,8	97,7	26,0	8,4
Черказ 2,0 + ИМК 0,5	90,4	47,5	54,4	22,3	5,9
НСР ₀₅	12,86	7,17	13,59	4,52	1,46

61

Таблица 21

Итоговое количество растений винограда (сорт Агат Донской) соответствующих требованиям ГОСТ из расчета 100 микрорастений, взятых для укоренения на этапе ризогенеза

Вариант, мг/л	Укореняемость <i>in vitro</i> на 7-й неделе субкультивирования, %	Укореняемость <i>in vitro</i> на 7-й неделе субкультивирования, шт.	Приживаемость на 30-й день адаптации, %	Приживаемость на 30-й день адаптации, шт.	Доля саженцев, соответствующих требованиям ГОСТ на 60-й день доращивания, %	Количество саженцев, соответствующих требованиям ГОСТ на 60-й день доращивания, шт.
ИМК 0,5	93,3	93	53,3	50	72,5	36
Крезацин						
0,1	53,3	53	40,0	21	60,5	13
0,2	66,7	67	46,7	31	53,5	17
0,3	53,3	53	53,3	28	60,3	17
0,4	40,0	40	26,7	11	85,8	9
0,5	80,0	80	40,0	32	60,9	19
1,0	66,7	67	66,7	44	70,2	31
1,5	80,0	80	53,3	43	85,7	37
2,0	66,7	67	26,7	18	85,4	15
Крезацин + ИМК						
0,1 + 0,5	80,0	80	33,3	27	70,9	19
0,2 + 0,5	100,0	100	73,3	73	82,9	61
0,3 + 0,5	86,7	87	53,3	46	48,2	22
0,4 + 0,5	80,0	80	66,7	53	70,4	37
0,5 + 0,5	86,7	87	73,3	64	83,2	53
1,0 + 0,5	93,3	93	73,3	68	56,1	38
1,5 + 0,5	86,7	87	60,0	52	77,0	40
2,0 + 0,5	93,3	93	40,0	37	94,1	35

62

Вариант, мг/л	Укореняемость <i>in vitro</i> на 7-й неделе субкультивирования, %	Укореняемость <i>in vitro</i> на 7-й неделе субкультивирования, шт.	Приживаемость на 30-й день адаптации, %	Приживаемость на 30-й день адаптации, шт.	Доля саженцев, соответствующих требованиям ГОСТ на 60-й день доращивания, %	Количество саженцев, соответствующих требованиям ГОСТ на 60-й день доращивания, шт.
Черказ						
0,1	53,3	53	13,3	7	60,9	4
0,2	66,7	67	26,7	18	60,2	11
0,3	33,3	33	33,3	11	50,7	6
0,4	53,3	53	33,3	18	50,4	9
0,5	73,3	73	60,0	44	43,8	19
1,0	93,3	93	26,7	25	35,6	9
1,5	73,3	73	33,3	24	30,3	7
2,0	73,3	73	33,3	24	50,8	12
Черказ + ИМК						
0,1 + 0,5	100,0	100	73,3	73	92,3	67
0,2 + 0,5	100,0	100	66,7	67	70,6	47
0,3 + 0,5	93,3	93	80,0	75	93,6	70
0,4 + 0,5	100,0	100	80,0	80	77,5	62
0,5 + 0,5	100,0	100	46,7	47	68,0	32
1,0 + 0,5	66,7	67	40,0	27	93,5	25
1,5 + 0,5	66,7	67	40,0	27	100,0	27
2,0 + 0,5	73,3	73	33,3	24	90,4	22

63

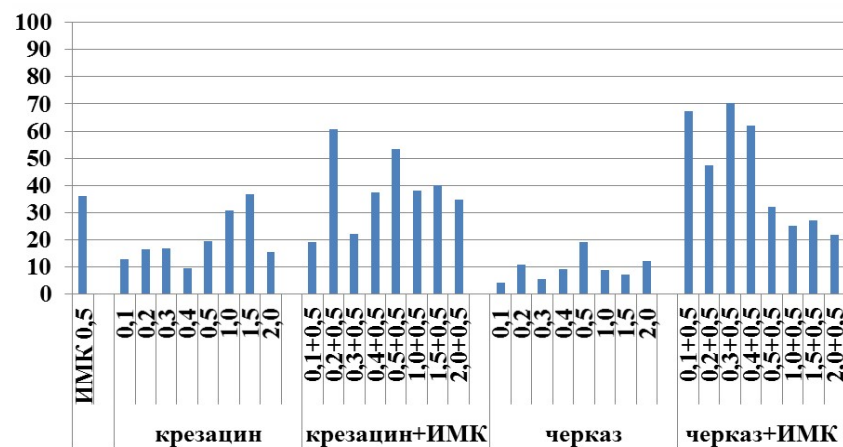


Рис. 24. Итоговое количество растений винограда (сорт Агат Донской) соответствующих требованиям ГОСТ из расчета 100 микрорастений, взятых для укоренения на этапе ризогенеза (60 день доращивания)

В предыдущих исследованиях было выявлено, что на этапе ризогенеза винограда сорта Московский белый для стимулирования корнеобразования микрочеренков в состав питательной среды на основе минеральных солей 1/2 Мурасига и Скуга в качестве стимуляторов корнеобразования эффективно добавлять препараты кремнийорганической природы, как отдельно, так и в сочетании с ИМК (мг/л): крезацин 0,1; крезацин 0,5; крезацин 0,3 + ИМК 0,5; крезацин 0,4 + ИМК 0,5; крезацин 2,0 + ИМК 0,5; черказ 1,5; черказ 0,3 + ИМК 0,5.

Для лучшей наглядности результатов опыта при учетах приживаемости и развития растений винограда *in vivo* мы ввели группировку по долям (%) с различным развитием: сильным, средним и слабым (табл. 22).

Таблица 22

Распределение показателей роста и развития растений винограда сорта Московский белый по условным группам

Вариант группировки	Суммарная длина побегов, см	Площадь листовой поверхности, см ²	Суммарная длина корней, см
Сильные	15,0–18,5	9,0–23,0	7,0–8,5
Средние	8,0–14,9	2,5–8,9	4,5–6,9
Слабые	2,0–7,9	0,5–2,4	1,5–4,4

При учетах через 30 дней после высадки микрорастений сорта Московский белый на адаптацию и изучения последствий добавления в питательную среду препарата крезацин, сохранилось преимущество вариантов (мг/л): крезацин 0,5; крезацин 2; крезацин 2,0 + ИМК 0,5, где приживаемость микрорастений составила 100 % против 92,3 % в контроле, а доля адаптированных растений с сильным и средним развитием – 62,5–92,3 % против 50 % в контроле. Также выделился вариант (мг/л): крезацин 0,4, где приживаемость составила 100 %, а доля растений с сильным и средним развитием – 57,2 % (табл. 23, рис. 25).

Учеты показателей роста и развития на этапе дорастивания показали преимущество варианта (мг/л): крезацин 2,0 + ИМК 0,5, так как в данном случае приживаемость на этапе адаптации и доля саженцев с закрытой корневой системой, соответствующих требованиям ГОСТ 31783–2012 составили 100 % (табл. 24, рис. 25, приложение).

При изучении последствий добавления в питательную среду препарата черказ, сохранилось преимущество в ранее выделенном на этапе ризогенеза варианте черказ 1,5 мг/л, где приживаемость микрорастений составила 100 %, а доля адаптированных растений с сильным и средним развитием – 86,6 %.

Помимо этого, выделились варианты (мг/л): черказ 0,3; черказ 0,4; черказ 1,0; черказ 0,5 + ИМК 0,5; черказ 1,0 + ИМК 0,5; черказ 1,5 + ИМК 0,5; черказ 2,0 + ИМК 0,5, где приживаемость микрорастений составила 100 %, а доля адаптированных растений с сильным и средним развитием – 71,5–92,4 % (табл. 25, рис. 25).

На этапе дорастивания было выявлено преимущество вариантов (мг/л): черказ 0,3; черказ 1,5; черказ 0,4 + ИМК 0,5; черказ 0,5 + ИМК 0,5 и черказ 1,0 + ИМК 0,5; черказ 2,0 + ИМК 0,5, где приживаемость микрорастений на этапе адаптации составила 93,3–100 %, а доля саженцев с закрытой корневой системой, соответствующих требованиям ГОСТ 31783–2012 – 96,6–100 % (табл. 26, рис. 25, приложение).

Перерасчёт и определение итогового количества саженцев с закрытой корневой системой соответствующих требованиям ГОСТ 31783–2012 от числа 100 микрорастений, взятых для укоренения на этапе ризогенеза показал, что при клональном микроразмножении винограда сорта Московский белый наиболее эффективно на этапе ризогенеза в состав питательной среды в качестве стимуляторов корнеобразования добавлять (мг/л): крезацин 0,5; крезацин 0,3 + ИМК 0,5; крезацин 2,0 + ИМК 0,5; черказ 0,3; черказ 1,5; черказ 0,4 + ИМК 0,5; черказ 1,0 + ИМК 0,5; черказ 2,0 + ИМК 0,5.

Таблица 23

Приживаемость в нестерильных условиях микрорастений винограда (сорт Московский белый) после введения в состав питательной среды на этапе ризогенеза препарата крезацин в качестве стимулятора корнеобразования (30-й день адаптации)

Вариант, мг/л	Приживаемость, %	Доля адаптированных растений с сильным и средним развитием, %	Средняя длина побегов, см	Средняя длина корней, см	Средняя суммарная площадь листовой поверхности, см ²
Контроль ИМК 0,5	92,3	50,0	12,9	14,8	10,4
Крезацин 0,1	77,8	57,2	10,4	16,7	10,0
Крезацин 0,2	100,0	37,5	16,5	9,4	10,3
Крезацин 0,3	83,3	20,0	9,3	1,5	16,6
Крезацин 0,4	100,0	57,2	15,2	20,4	15,2
Крезацин 0,5	100,0	71,5	23,4	28,0	17,7
Крезацин 1,0	100,0	50,0	20,6	6,9	12,9
Крезацин 1,5	100,0	28,6	17,9	18,9	17,7
Крезацин 2,0	100,0	62,5	21,9	14,2	23,3
НСР ₀₅	14,22	7,24	0,67	0,12	0,21
Крезацин 0,1 + ИМК0,5	73,3	63,7	15,3	3,9	8,2
Крезацин 0,2 + ИМК0,5	92,3	66,7	20,3	9,4	18,5
Крезацин 0,3 + ИМК0,5	86,7	84,6	20,6	25,5	11,3
Крезацин 0,4 + ИМК0,5	71,4	70,0	15,8	19,5	22,4
Крезацин 0,5 + ИМК0,5	70,0	42,9	9,7	25,8	9,5
Крезацин 1,0 + ИМК0,5	87,5	57,2	15,3	8,4	12,9
Крезацин 1,5 + ИМК0,5	92,9	61,6	19,9	28,6	22,4
Крезацин 2,0 + ИМК0,5	100,0	92,3	20,8	15,7	10,4
НСР ₀₅	12,77	9,82	0,79	0,16	0,24

Последствие введения в состав питательной среды на этапе ризогенеза препарата крезацин в качестве стимулятора корнеобразования на развитии *ex vitro* растений винограда при доращивании (сорт Московский белый) (60-й день доращивания)

Вариант, мг/л	Доля саженцев с з.к.с., соответствующих требованиям ГОСТ, %	Средняя длина на побегов, см	Средняя суммарная площадь листовой поверхности, см ²	Средняя длина корней, см	Среднее число корней, шт.
Контроль ИМК 0,5	60,0	42,9	31,2	24,8	11,4
Крезацин 0,1	67,7	40,7	31,0	27,6	6,4
Крезацин 0,2	48,1	47,3	35,0	19,6	7,0
Крезацин 0,3	30,3	40,2	46,5	12,2	4,0
Крезацин 0,4	68,0	46,7	44,1	30,8	12,7
Крезацин 0,5	82,4	53,9	58,4	38,5	14,9
Крезацин 1,0	60,2	51,3	33,5	17,5	10,5
Крезацин 1,5	39,3	48,9	47,8	29,2	11,3
Крезацин 2,0	72,9	53,1	74,6	25,0	7,7
НСР ⁰⁵	8,82	7,08	6,70	3,75	1,42
Крезацин 0,1 + ИМК 0,5	74,6	45,8	27,1	14,4	10,8
Крезацин 0,2 + ИМК 0,5	76,9	51,0	48,1	20,0	11,7
Крезацин 0,3 + ИМК 0,5	95,3	51,6	30,5	35,8	12,8
Крезацин 0,4 + ИМК 0,5	80,4	47,0	71,7	30,3	9,5
Крезацин 0,5 + ИМК 0,5	53,4	40,0	29,5	36,7	6,7
Крезацин 1,0 + ИМК 0,5	67,8	46,1	43,9	18,6	6,8
Крезацин 1,5 + ИМК 0,5	71,9	50,8	62,7	39,3	12,4
Крезацин 2,0 + ИМК 0,5	100,0	52,3	30,2	26,1	15,8
НСР ⁰⁵	11,63	7,21	6,44	4,15	1,62

67

Приживаемость в нестерильных условиях микрорастений винограда (сорт Московский белый) после введения в состав питательной среды на этапе ризогенеза препарата черказ в качестве стимулятора корнеобразования (30-й день адаптации)

Вариант, мг/л	Приживаемость, %	Доля адаптированных растений с сильным и средним развитием, %	Средняя длина побегов, см	Средняя длина корней, см	Средняя суммарная площадь листовой поверхности, см ²
Контроль ИМК 0,5	92,3	50,0	12,9	14,8	10,4
Черказ 0,1	84,6	63,7	15,2	25,6	17,7
Черказ 0,2	90,0	55,5	11,2	26,3	17,7
Черказ 0,3	100,0	92,4	24,6	3,7	22,4
Черказ 0,4	100,0	71,5	18,3	21,8	13,2
Черказ 0,5	80,0	75,0	15,2	13,8	13,5
Черказ 1,0	100,0	80,0	1,4	31,8	10,5
Черказ 1,5	100,0	86,6	18,3	14,8	17,7
Черказ 2,0	93,3	78,6	14,8	24,8	22,4
НСР ⁰⁵	14,00	10,89	0,84	0,17	0,25
Черказ 0,1 + ИМК 0,5	86,7	69,3	17,9	7,9	17,7
Черказ 0,2 + ИМК 0,5	93,3	71,5	18,6	16,3	17,7
Черказ 0,3 + ИМК 0,5	80,0	75,0	13,6	21,7	8,1
Черказ 0,4 + ИМК 0,5	93,3	92,8	21,8	28,4	22,4
Черказ 0,5 + ИМК 0,5	100,0	85,7	18,4	14,5	12,9
Черказ 1,0 + ИМК 0,5	100,0	92,3	17,8	9,4	11,8
Черказ 1,5 + ИМК 0,5	100,0	57,1	19,3	19,9	17,7
Черказ 2,0 + ИМК 0,5	100,0	92,3	20,8	11,5	22,4
НСР ⁰⁵	14,09	11,43	0,88	0,19	0,27

68

Последствие введения в состав питательной среды на этапе ризогенеза препарата черказ в качестве стимулятора корнеобразования на развитие *ex vitro* растений винограда при доращивании (сорт Московский белый) (60-й день доращивания)

Вариант, мг/л	Доля саженцев с з.к.с., соответствующих требованиям ГОСТ, %	Средняя длина побегов, см	Средняя суммарная площадь листово́й поверхности, см ²	Средняя длина корней, см	Среднее число корней, шт.
Контроль ИМК 0,5	60,0	42,9	31,2	24,8	11,4
Черказ 0,1	74,6	45,7	58,4	36,1	11,2
Черказ 0,2	65,7	41,9	46,0	36,9	9,0
Черказ 0,3	100,0	55,6	60,5	14,0	14,4
Черказ 0,4	81,9	49,5	42,2	32,6	7,0
Черказ 0,5	85,5	45,5	41,9	24,7	11,3
Черказ 1,0	90,6	32,2	35,7	42,0	5,8
Черказ 1,5	96,9	49,2	49,6	25,5	15,6
Черказ 2,0	89,4	46,3	65,0	35,2	14,5
НСР ₀₅	12,41	6,81	7,17	4,53	1,67
Черказ 0,1 + ИМК 0,5	79,8	48,2	54,9	18,8	13,0
Черказ 0,2 + ИМК 0,5	82,1	49,4	60,2	26,5	13,9
Черказ 0,3 + ИМК 0,5	85,3	44,5	22,7	32,4	11,8
Черказ 0,4 + ИМК 0,5	100,0	53,3	65,0	38,8	16,2
Черказ 0,5 + ИМК 0,5	96,6	48,9	42,6	25,0	8,0
Черказ 1,0 + ИМК 0,5	100,0	48,5	30,7	20,0	14,8
Черказ 1,5 + ИМК 0,5	67,8	50,3	47,8	30,2	14,1
Черказ 2,0 + ИМК 0,5	100,0	52,0	71,7	22,3	16,7
НСР ₀₅	13,34	7,41	7,41	4,01	2,03

69

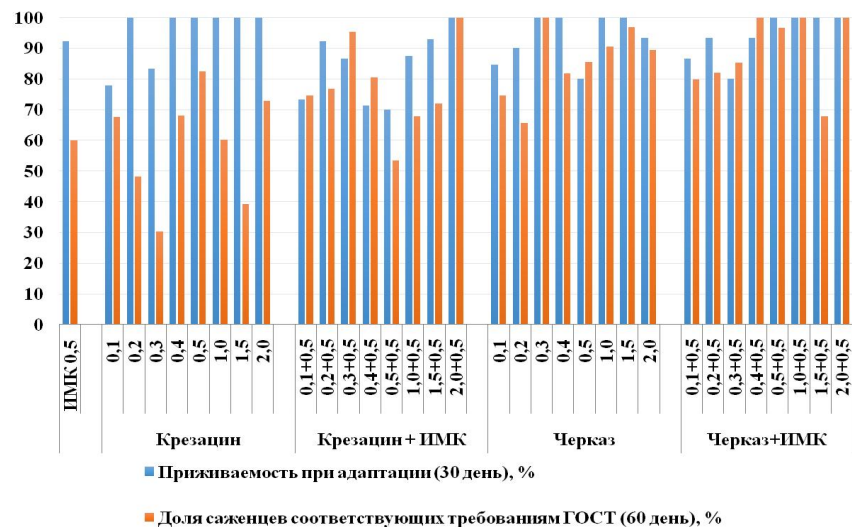


Рис. 25. Влияние введения в состав питательной среды на этапе ризогенеза кремнийорганических соединений на приживаемость в нестерильных условиях и долю *ex vitro* растений винограда, соответствующих требованиям ГОСТ (сорт Московский белый)

Так как через 60 дней после высадки на доращивание в данных вариантах количество растений соответствующих требованиям ГОСТ составило 82–100 шт., против 44 шт. в контроле от числа 100 микрорастений, взятых для укоренения на этапе ризогенеза (табл. 27, рис. 26, приложение).

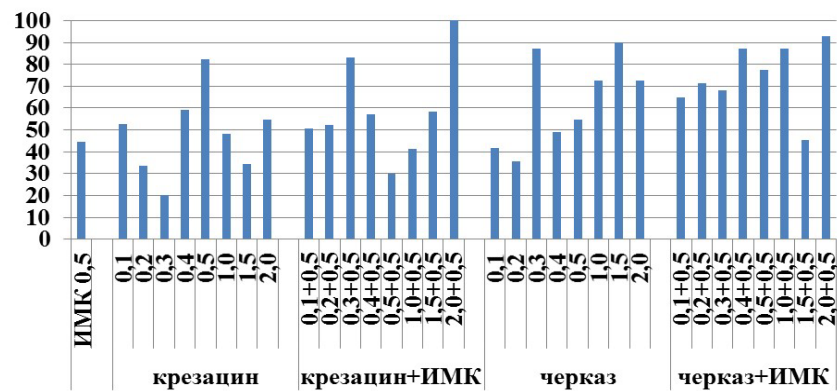


Рис. 26. Итоговое количество растений винограда (сорт Московский белый), соответствующих требованиям ГОСТ из расчета 100 микрорастений, взятых для укоренения на этапе ризогенеза (60-й день доращивания)

Итоговое количество растений винограда (сорт Московский белый), соответствующих требованиям ГОСТ из расчета 100 микрорастений, взятых для укоренения на этапе ризогенеза

Вариант, мг/л	Укореняемость <i>in vitro</i> на 7-й неделе субкультивирования, %	Укореняемость <i>in vitro</i> на 7-й неделе субкультивирования, шт.	Приживаемость на 30-й день адаптации, %	Приживаемость на 30-й день адаптации, шт.	Доля саженцев, соответствующих требованиям ГОСТ на 60-й день дорощивания, %	Количество саженцев, соответствующих требованиям ГОСТ на 60-й день дорощивания, шт.
ИМК 0,5	80,0	80	92,3	74	60	44
Крезацин						
0.1	100,0	100	77,8	78	67,7	53
0.2	70,0	70	100,0	70	48,1	34
0.3	80,0	80	83,3	67	30,3	20
0.4	86,7	87	100,0	87	68,0	59
0.5	100,0	100	100,0	100	82,4	82
1.0	80,0	80	100,0	80	60,2	48
1.5	86,7	87	100,0	87	39,3	34
2.0	75,0	75	100,0	75	72,9	55
Крезацин + ИМК						
0,1 + 0,5	93,3	93	73,3	68	74,6	51
0,2 + 0,5	73,3	73	92,3	68	76,9	52
0,3 + 0,5	100,0	100	86,7	87	95,3	83
0,4 + 0,5	100,0	100	71,4	71	80,4	57
0,5 + 0,5	80,0	80	70,0	56	53,4	30
1,0 + 0,5	70,0	70	87,5	61	67,8	41
1,5 + 0,5	86,7	87	92,9	81	71,9	58
2,0 + 0,5	100,0	100	100,0	100	100,0	100

71

Продолжение табл. 27

Вариант, мг/л	Укореняемость <i>in vitro</i> на 7-й неделе субкультивирования, %	Укореняемость <i>in vitro</i> на 7-й неделе субкультивирования, шт.	Приживаемость на 30-й день адаптации, %	Приживаемость на 30-й день адаптации, шт.	Доля саженцев, соответствующих требованиям ГОСТ на 60-й день дорощивания, %	Количество саженцев, соответствующих требованиям ГОСТ на 60-й день дорощивания, шт.
Черказ						
0.1	66,7	67	84,6	56	74,6	42
0.2	60,0	60	90,0	54	65,7	35
0.3	86,7	87	100,0	87	100,0	87
0.4	60,0	60	100,0	60	81,9	49
0.5	80,0	80	80,0	64	85,5	55
1.0	80,0	80	100,0	80	90,6	72
1.5	93,3	93	100,0	93	96,9	90
2.0	86,7	87	93,3	81	89,4	72
Черказ + ИМК						
0,1 + 0,5	93,3	93	86,7	81	79,8	65
0,2 + 0,5	93,3	93	93,3	87	82,1	71
0,3 + 0,5	100,0	100	80,0	80	85,3	68
0,4 + 0,5	93,3	93	93,3	87	100,0	87
0,5 + 0,5	80,0	80	100,0	80	96,6	77
1,0 + 0,5	86,7	87	100,0	87	100,0	87
1,5 + 0,5	66,7	67	100,0	67	67,8	45
2,0 + 0,5	93,3	93	100,0	93	100,0	93

72

Выводы

1. При клональном микроразмножении винограда сорта Хасанский на этапе ризогенеза наиболее эффективно в состав питательной среды в качестве стимуляторов корнеобразования добавлять (мг/л): крезацин 2,0; крезацин 0,5 + ИМК 0,5; черказ 0,4 + ИМК 0,5; черказ 2,0 + ИМК 0,5. Так как через 60 дней доращивания в данных вариантах количество растений, соответствующих требованиям ГОСТ 31783–2012 составило 87–93 шт. против 49 шт. в контроле от числа 100 микро-растений, взятых для укоренения на этапе ризогенеза.

2. При клональном микроразмножении винограда сорта Агат Донской наиболее эффективно на этапе ризогенеза в состав питательной среды в качестве стимуляторов корнеобразования добавлять (мг/л): крезацин 0,2 + ИМК 0,5; черказ 0,1 + ИМК 0,5; черказ 0,3 + ИМК 0,5; черказ 0,4 + ИМК 0,5. Так как через 60 дней после высадки на доращивание в данных вариантах количество растений соответствующих требованиям ГОСТ составило 61–70 шт., против 36 шт. в контроле от числа 100 микро-растений, взятых для укоренения на этапе ризогенеза.

3. При клональном микроразмножении винограда сорта Московский белый наиболее эффективно на этапе ризогенеза в состав питательной среды в качестве стимуляторов корнеобразования добавлять (мг/л): крезацин 0,5; крезацин 0,3 + ИМК 0,5; крезацин 2,0 + ИМК 0,5; черказ 0,3; черказ 1,5; черказ 0,4 + ИМК 0,5; черказ 1,0 + ИМК 0,5; черказ 2,0 + ИМК 0,5. Так как через 60 дней после высадки на доращивание в данных вариантах количество растений соответствующих требованиям ГОСТ составило 82–100 шт., против 44 шт. в контроле от числа 100 микро-растений, взятых для укоренения на этапе ризогенеза.

4. Для всех трех исследуемых сортов среди лучших вариантов выявился черказ 0,4 мг/л + ИМК 0,5 мг/л, и мы можем рекомендовать его для массового ускоренного размножения винограда межвидового происхождения *in vitro*.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Абрашева П. Краткие сведения о физиологическом воздействии вирусных болезней на рост и плодоношение виноградной лозы // Физиология винограда и основы его возделывания. – Т. 2. – София, 1983. – С. 227–236.

2. Азарова А.Б. Размножение алычи гибридной методом *in vitro*: выпускная квалификационная работа (магистерская диссертация): 111300 / Азарова А.Б. – М., 2010. – 68 с.

3. Влияние биологически активных веществ кремнийорганической природы на укореняемость и дальнейшее развитие одревесневших и зеленых черенков винограда межвидового происхождения / Акимова С.В. [и др.] // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2015. – Вып. 4. – С. 36–48.

4. Адаптация микро-растений малины (*Rubus L.*) и сирени (*Syringa L.*) к нестерильным условиям / Аладина О.Н. [и др.] // Известия ТСХА. – 2009. – Вып. 3. – С. 98–110.

5. Браткова Л.Г., Малыхина А.Н., Цаценко Н.Н. Приемы адаптации мериклонов винограда к условиям *in vivo* // Плодоводство и виноградарство юга России. – 2015. – № 34(04). – С. 14–29.

6. Высоцкий В.А. Биотехнологические приемы в размножении и сохранении ценных генотипов садовых культур // Научно-практические достижения и инновационные пути развития производства продукции садоводства для улучшения структуры питания и здоровья человека. – Мичуринск, 2008. – С. 23–25.

7. Высоцкий В.А. Морфогенез и клональное микроразмножение растений // Культура клеток растений и биотехнология. – М., 1986. – С. 91–102.

8. Гиголашвили Т.С., Родькин О.Н., Реуцкий В.Г. Условия микроразмножения формируют специфический культуральный фенотип // Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда: тез. докл. VII Междунар. конф., 25–28 ноября 1997 г. – М., 1997. – С. 413–414.

9. Деменко В.И. Микроразмножение садовых растений: учебное пособие. – М.: МСХА им. К. А. Тимирязева, 2007.

10. Деменко В.И., Лебедев В.Г., Шестибратов К.А. Адаптация растений, полученных *in vitro*, к нестерильным условиям // Известия ТСХА. – 2010. – Вып. 1. – С. 73–85.

11. Деменко В.И., Лебедев В.Г. Адаптация растений, полученных *in vitro*, к нестерильным условиям // Известия ТСХА. – 2011. – Вып. 1. – С. 60–69.

12. Деменко В.И. Микрклональное размножение садовых растений: учебное пособие для студентов по специальности 310300 «Плодоовощеводство и виноградарство». – М.: ФГОУ ВПО РГАУ-МСХА, 2007. – 55 с.

13. Дитченко Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений: метод. рекомендации к лабораторным занятиям, задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов. – Минск: БГУ, 2007. – 25 с.

14. Дорошенко Н.П. Биотехнология – наука и отрасль сельского хозяйства // Научный журнал КубГАУ. – 2016. – №116(02).

15. Зеленянская Н.Н., Джабурия Л.В., Теслюк Н.И. Эффективные желирующие компоненты для размножения винограда *in vitro*. – Одесса: Национальный научный центр «Институт виноградарства и виноделия им. В.Е. Таирова», 2010. – С. 53–57.

16. Катаева Н.В. Клональное микроразмножение растений. – М.: Наука, 1983. – 96 с.

17. Корнацкий С.А. Комплекс факторов, влияющих на жизнеспособность, рост и развитие микрорастений после культуры *in vitro* // Плодоводство и ягодоводство России: сборник научных работ РАСХН. – М., 1999. – Т. 6. – С. 64–68.

18. Корнацкий С.А. Культура тканей как модель для изучения адаптационных процессов в онтогенезе плодовых и ягодных растений // Плодоводство и ягодоводство России: сборник научных работ РАСХН. – М., 1996. – Т. 3. – С. 84–89.

19. Корнацкий С.А. Технологический аспект клонального микроразмножения // Роль сортов и новых технологий в интенсивном садоводстве: мат. межд. науч.-практич. конф. – Орел, 2003. – С. 169–171.

20. Физиологические основы качества продукции цветоводства / Кошкин Е.И. [и др.]. – М.: Изд-во РГАУ-МСХА, 2012. – С. 172–185.

21. Куклина А.Г., Семерикова Е.А. Возможности размножения перспективных сортов жимолости синей // Актуальные проблемы садоводства России и пути их решения. – 2007. – С. 163–164.

22. Куклина А.Г., Семерикова Е.А. Микрклональное размножение сортов жимолости синей // Плодоводство и ягодоводство России. – М., 2009. – Т. 22. – Ч. 2. – С. 140–142.

23. Медведева Н.И., Поливарова Н.В., Трошин Л.П. Методические рекомендации по микрклональному размножению винограда *in vitro* // Научный журнал КубГАУ. – 2010. – № 62(08).

24. Милкус Б., Еремеева Н. Влияние вируса инфекционного хлороза винограда на белковый обмен растений // Физиология и биохимия культурных растений. – 1975. – № 5.

25. Михальчик Л.С., Деменко В.И. Размножение яблони и вишни методом *in vitro* // Материалы научной конференции молодых ученых, 14–17 июня 1988 г. – М., 1988. – С. 649–657.

26. Мулюкина Н.А., Зеленянская Н.Н., Джабурия Л.В. Применение методов культуры тканей и органов *in vitro* для размножения исходного клонового материала винограда // Садоводство и виноградарство. – 2013. – № 2.

27. Муратова С.А., Шорников Д.Г., Янковская М.Б. Биотехнологические методы размножения ягодных культур // Научно-практические достижения и инновационные пути развития производства продукции садоводства для улучшения структуры питания и здоровья человека. – Мичуринск, 2008. – С. 63–69.

28. Панькова О.А., Несмелова Н.П. Совершенствование технологических приемов клонального микроразмножения ягодных кустарников // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – Киров, 2008. – № 11. – С. 72–76.

29. Трушечкин В.Г., Высоцкий В.А. Клональное микроразмножение плодовых и ягодных культур // Плодоовощное хозяйство. – 1985. – № 1. – С. 43–46.

30. Упадышев М.Т. Клональное микроразмножение некоторых нетрадиционных культур рода *Rubus* // Ягодоводство в Нечерноземье. – М.: ВСТИСП, 1993. – С. 10–18.

31. Упадышев М.Т., Высоцкий В.А. Размножение ежевики и малины чёрной методом культуры тканей // Садоводство и виноградарство. – 1991. – № 6. – С. 24–27.

32. Шипунова А.А. Клональное микроразмножение садовых культур: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. – М., 2003. – С. 24.

33. Шипунова А. А. Микрклональное размножение малины и жимолости // Плодоводство и ягодоводство России: сборник научных работ РАСХН. – М.: Издательский Дом МСП; ГНУ ВСТИСП, 2009. – Т. XXII. – Ч. 2. – С. 381–384.

34. Оптимизация условий культивирования *in vitro* ягодных и декоративных культур / Шорников Д.Г. [и др.] // Вестник ТГУ. – 2010. – Т. 15. – Вып. 2. – С. 640–645.

35. Сохранение и размножение ценных форм ягодных и декоративных растений методами биотехнологии / Янковская М.Б. [и др.] // Мат. всероссийской научно-практической конф. с международным участием «Проблемы озеленения городов Сибири и сопредельных территорий», 18–20 августа 2011 г. – Иркутск, 2011. – Ч. IV. – Вып. 44. – С.160–166.

36. Gresshoff P. Syndicate. Methods employed in planting aut Tissue culture. The horizons of tissue culture propagation // A seminar directed by Dr. R.A. de Fossard for the N.S.W. association of Nurserymen Ltd. At the University of Sydney. 3–4 December, University of Sydney (Australia), 1977. – P. 106–108.

37. Милкус Б. Стыцько С. Росподіл фото синтетичних асимілятив у винограду, ураженого вірусом інфекційного хлорозу // Виноградарство і виноробство. – 1972. – № 13.

38. Рубин Б. Физиология на растенията. – София Изд. Земиздат, 1968. – 542 с.

39. Hedtrich T. Gewebekulturs Reistrauchbeerenobst und Resultatein der Paxis an Wendung. // Rheinische Monatsachenrift. – 1983. – V. 71. – № 2. – P. 52–54.

40. Lindsey N.C., Antony J.C. Comparative water loss from leaves of *Solanum laciniatum* plants cultured *in vitro* and *in vivo* // Plant. Sci. – 1984. – V. 36. – № 3. – P. 241–246.

41. Murashige T. A. [et al.] Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum. – 1962. – V. 15. – № 13. – P. 473–497.

42. Nicholas I.R. The use of fluorescence microscopy to monitor root development in micropropagated explant // J. of Hort. Sci. – 1986. – V. 61. – № 4. – Pp. 417–421.

43. Pliego-Alfare F.J. Development of *in vitro* rooting bioassay using juvenile stem cuttings of *Persea americana* Mill // Hort Sci. – 1988. – V. 63. – № 2. – P. 295–301.

Приложение

Технические требования к саженцам винограда, согласно ГОСТ 31783–2012

Показатели	Характеристика и норма для саженцев			
	Однолетний и двулетний		Вегетирующий	
	Корнесобственный	Привитой	Корнесобственный	Привитой
Внешний вид	Хорошо развитые, ровные, здоровые, без повреждений вредными организмами и механических повреждений			
Состояние однолетних побегов	Вызревшие у основания с хорошо сформированными глазками		Зеленые, без подсыхания листьев	
Срастание привоя с подвоем	–	Полное, круговое, спайка привоя с подвоем прочная на изгиб	–	Полное, круговое, спайка привоя с подвоем прочная на изгиб
Наличие подвойной поросли и/или корней на привое	–	Не допускается	–	Не допускается
Диаметр саженцев в середине междоузлия, мм, не менее	5	5	5	5
Длина саженцев, см, не менее*	40	35	40	35
Длина вызревшей части однолетнего побега, см, не менее	20	20	–	–
Длина зеленого побега, см	–	–	8–25	8–25
Количество листьев на зеленом побеге, шт., не менее	–	–	4	4
Количество основных корней, шт., не менее	3	3	3	3
Длина основных корней, см, не менее	12	12	8	8

* В регионах при глубоком промерзании почвы свыше 30 см длина корнесобственных саженцев 50 см, привитых 45 см.

Примечание. Длина привитых виноградных саженцев не включает в себя привойную часть.

Учебное издание

Акимова Светлана Владимировна
Раджабов Агагомед Курбанович
Бухтин Дмитрий Александрович
Киркач Вадим Валерьевич

РАЗРАБОТКА ЭЛЕМЕНТОВ ТЕХНОЛОГИИ
УСКОРЕННОГО КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ
СОРТОВ ВИНОГРАДА МЕЖВИДОВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ
ДЛЯ ЗОН РИСКОВАННОГО ВИНОГРАДАРСТВА

Учебно-методическое пособие

Издается в авторской редакции
Техн. редактор *Т.Б. Самсонова*

Подписано в печать 15.11.2018. Формат 60×84/16.
Уч.-изд. л. 3,93. Печ. л. 5,0. Тираж 300 экз. Заказ № 435.

Отпечатано в АНО Редакция журнала «МЭСХ»
127412, Москва, ул. Б. Академическая, д. 44, корп. 2, e-mail: t_sams@mail.ru