

Усовершенствование технологии клонального микроразмножения винограда

Дорошенко Н.П.¹, Пузырнова В.Г.^{1✉}, Трошин Л.П.²

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия имени Я.И. Потапенко – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Федеральный Ростовский аграрный научный центр", 346421, Россия, Ростовская область, г. Новочеркасск, пр. Баклановский, 166;

² Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина, 350044, Россия, г. Краснодар, ул. Калинина, 13

✉ ruswinebooks@yandex.ru

Аннотация. Статья обобщает научные достижения лаборатории биотехнологии Всероссийского научно-исследовательского института виноградарства и виноделия имени Я.И. Потапенко в области клонального микроразмножения винограда. Клональное микроразмножение растений обеспечивает получение генетически однородного, оздоровленного безвирусного посадочного материала. На процесс клонального микроразмножения оказывает влияние комплекс генетических, физиологических, гормональных и физических факторов, степень влияния которых зависит от генотипа. Для полной реализации морфогенетического потенциала растений необходима оптимизация приемов клонального микроразмножения. С учетом этого разработана технология клонального микроразмножения винограда при помощи культуры апикальных меристем размером 0,1–0,2 мм, усовершенствована схема регенерации растений, разработаны новые биотехнологические приемы для всех этапов размножения, начиная от формирования меристематических зон до высадки оздоровленных растений в открытый грунт. Разработаны: способ комбинированной обработки меристем электромагнитным полем (ЭМП) сверхвысокой частоты (СВЧ) в комплексе с узкополосным лазером; способ повышения эффективности оздоровления от вирусной и бактериальной инфекции при помощи регулятора роста Эмистим, салициловой кислоты, антибиотиков гентамицин и цефотаксим; способ применения растительной добавки из тонкоразмолотых семян винограда. Разработан метод водной терапии с последующей культурой апикальных меристем. Оптимизированы этапы собственно микроразмножения и микрочеренкования. Установлены оптимальные параметры интенсивности и длительности освещения. Разработан способ адаптации оздоровленных растений к нестерильным условиям среды. Усовершенствованы способы тестирования на наличие вирусной инфекции. Разработаны способы посадки оздоровленных вегетирующих саженцев в пленочных, стационарных теплицах и открытом грунте. Логичным завершением проделанной работы явилась закладка уникального базисного маточника в условиях песчаной почвы Усть-Донецкого опорного пункта.

Ключевые слова: виноград; *in vitro*; меристема; регенерация; Эмистим; салициловая кислота; адаптация; маточник.

Для цитирования: Дорошенко Н.П., Пузырнова В.Г., Трошин Л.П. Усовершенствование технологии клонального микроразмножения винограда // «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2022; 24(2):102-111. DOI 10.35547/IM.2022.46.55.001

METHODS AND PROTOCOLS

Improvements in the technology of grapevine clonal micropropagation

Doroshenko N.P.¹, Puzirnova V.G.^{1✉}, Troshin L.P.²

¹ All-Russian Scientific Research Institute of Viticulture and Winemaking named after Ya.I. Potapenko – branch of the FSBSI Federal Rostov Agrarian Research Center, 166 Baklanovsky Ave., 346421 Novocherkassk, Rostov Region, Russia

² Kuban State Agrarian University named after I.T. Trubilin, 13 Kalinina str., 350044 Krasnodar, Russia

✉ ruswinebooks@yandex.ru

Abstract. The article summarizes scientific achievements of the Biotechnology Laboratory of All-Russian Scientific Research Institute of Viticulture and Winemaking named after Ya.I. Potapenko in the field of grapevine clonal micropropagation. Clonal micropropagation of plants ensures the production of genetically homogeneous, healthy virus-free planting material. The process of clonal micropropagation is influenced by a complex of genetic, physiological, hormonal and physical factors, efficiency of which depends on the genotype. In order to fully realize the morphogenetic potential of plants, it is necessary to optimize the methods of clonal micropropagation. With this purpose, the technology of clonal micropropagation of grapes using a culture of apical meristems with a size of 0.1–0.2 mm was upgraded. The scheme of plant regeneration was improved, new biotechnological techniques were developed for all stages of propagation, starting from the formation of meristematic zones to the planting of healthy plants in open ground. Following methods were developed: a method of combined processing of meristems by electromagnetic field (EMF) of very high frequency (VHF) in combination with a narrow-band laser; a method for improving the effectiveness of recovery from viral and bacterial infection using growth regulator Emistim, salicylic acid, gentamicin and cefotaxime antibiotics; a method of using herbal supplement from fine-grained grape seeds. A method of water therapy with subsequent culture of apical meristems was developed. Optimization of stages of factual micropropagation and micrografting was carried out. Optimal parameters of intensity and duration of lighting were established. A method of adaptation healthy plants to non-sterile environmental conditions was developed. Methods of testing for the presence of viral infection were improved. Methods of planting healthy vegetating seedlings in film, stationary greenhouses and open ground were developed. Logical conclusion of the studies was the establishment of unique basic nursery in the conditions of sandy soils of Ust-Donetsk control station.

Key words: grapes; *in vitro*; meristem; regeneration; Emistim; salicylic acid; adaptation; nursery.

For citation: Doroshenko N.P., Puzirnova V.G., Troshin L.P. Improvements in the technology of grapevine clonal micropropagation. Magarach. Viticulture and Winemaking. 2022; 24(2):102-111 (*in Russian*). DOI 10.35547/IM.2022.46.55.001

Введение

Клональное микроразмножение – современный метод вегетативного размножения растений. По сравнению с традиционными методами размножения, используемыми в сельскохозяйственной практике, клональное микроразмножение в культуре *in vitro* обладает рядом преимуществ. Главное преимущество – это получение генетически однородного, безвирусного посадочного материала, так как вирусные и микоплазменные заболевания, в силу хронического характера, наносят виноградарству постоянный экономический ущерб.

Основным методом получения безвирусных растений является культура апикальных меристем. Использование метода культуры апикальных меристем основано на принципе отсутствия вирусных частиц в точке роста растений. Предположение о возможности отсутствия вируса в меристематических тканях больных растений впервые было высказано Чунгом [1] и Уайтом [2]. Вскоре, начиная с 50-х годов XX века, были предприняты первые успешные опыты по получению свободных от вирусов растений из точки роста [3–4]. С тех пор техника оздоровления растений, основанная на выделении апикальных меристем, стала интенсивно совершенствоваться. Во многих странах в XX веке микроклональное размножение растений получило широкое распространение [5–14]. В настоящее время технология клонального микроразмножения является инновационной технологией в питомниководстве многих сельскохозяйственных культур и, в том числе, винограда.

Метод микроразмножения с применением культуры апикальных меристем используется для элиминации вирусов, которые могут присутствовать в тканях без каких-либо симптомов и передаваться при массовом тиражировании. Технологии базируются на неравномерном распределении вирусов в молодых тканях апексов побегов, причем их концентрация значительно снижается в апикальной меристеме верхушки стебля, где клетки находятся в состоянии постоянного деления. Поскольку, по мнению Граут [15], только конус нарастания побега и первый листовый примордий обычно свободны от вирусов, размеры изолируемой меристемы имеют решающее значение.

В настоящее время применение электронной микроскопии часто обнаруживает наличие вирусов в меристеме пораженных ими растений. Особенность строения апикальной меристемы исключает проникновение в нее вируса путем быстрого транспортирования по проводящей системе, но допускает возможность медленного распространения через плазмодесмы, соединяющие меристематические клетки. Таким образом, возможно присутствие вирусов в точке роста зараженного растения и репродукция их в меристематических тканях. Исходя из этого, значительный интерес в освобождении растений от вирусов представляет использование культуры апикальных меристем в сочетании с хемотерапией. Сочетая культуру верхушечных меристем с хемотерапией, можно повысить эффект оздоровления от вирусов и коэффи-

циент размножения оздоровленных растений.

В последние годы салициловая кислота рассматривается как фитогормон растений и один из факторов защиты их от воздействия патогенов микробной и грибной природы. Во время атаки патогенов она резко накапливается в клетках, индуцируя программируемую клеточную смерть вокруг пораженного участка. В связи с этим она включена в программу исследований.

Установлено, что на процесс клонального микроразмножения оказывают влияние комплекс генетических, физиологических, гормональных и физических факторов. При этом степень влияния каждого из них зависит от генотипа. Анализ факторных данных показал, что необходимо их учитывать при разработке и оптимизации приемов и для полной реализации морфогенетического потенциала эксплантов при микроразмножении растений.

Цель исследования: разработать новые и усовершенствовать существующие методы оздоровления и тестирования растений винограда на наличие вирусной инфекции, объединить их в систему производства сертифицированного посадочного материала.

Материалы и методы исследования

Исследования проводили по общепризнанным в биотехнологии методикам на классических, донских аборигенных, подвойных сортах и сортах винограда селекции института в стационарных лабораторных условиях и на созданном базисном маточнике.

За основу был взят способ оздоровления растений при помощи культуры апикальных меристем при относительном размере эксплантов 0,1–0,2 мм. В 1952 г. Морель и Мартен установили, что эффективные результаты дает культивирование меристематических верхушек в асептических условиях на искусственных средах [16]. Авторы установили, что вирус не может существовать в клетках меристемы. Это объясняется их физиологическими особенностями, в частности, высокой концентрацией ауксинов, отсутствием необходимых для размножения вирусов субстратов, высокой способностью клеток меристемы к размножению. Перечисленные факторы стимулируют синтез нормальных нуклеотидов, что способствует успешной конкуренции с вирусными болезнями и даже подавлению репродукции вируса.

Для ввода в культуру *in vitro* в качестве исходного материала были взяты почки побегов виноградных кустов в период активного роста. Из почек после стерилизации выделяли меристемы без листовых примордиев.

На первом этапе, чтобы добиться хорошо растущей стерильной культуры, осуществляли стерилизацию растительных тканей 0,8%-ным раствором $AgNO_3$. После этого выделенные меристемы переносили на твердую питательную стерильную среду Мурасиге и Скуга, разлитую в стерильные пробирки.

Этап ввода для повышения приживаемости меристем разделяли на два подэтапа. Культивирование осуществляли сначала на твердой питательной среде. Затем, через 3–4 недели, когда меристемы увеличатся

Таблица 1. Динамика роста меристем при различной продолжительности комплексного облучения
Table 1. Dynamics of meristem growth at different duration of complex irradiation

Дней культивирования	Размеры меристем, мм, при продолжительности облучения, мин.					
	60	65	75	80	120	контроль
30	3,2	3,6	3,2	3,0	3,0	3,2
35	3,5	3,6	4,0	2,8	3,6	3,0
60	3,2	4,1	5,2	4,2	3,0	2,7
80	5,0	8,5	12,5	7,2	15,0	5,0

до 2–3 мм, пересаживали их на жидкую питательную среду на косые мостики из фильтровальной бумаги, а пробирки помещали на вращающийся аппарат роллерного типа с тем, чтобы экспланты все время омывались питательной средой.

Второй этап – собственно микроразмножение. Культивирование проводили на жидкой питательной среде Мурасиге и Скуга в колбах Эрленмейера. Тонкий слой питательной среды (2–4 мм) обеспечивает достаточную аэрацию. Добавление в питательную среду цитокинина 6-БАП в первом пассаже – 1,0 мг/л, со второго пассажа – 2,0 мг/л индуцирует развитие многочисленных пазушных побегов. Пересадки осуществляли через 14 дней каждый раз, разделяя эксплант на 5–7 частей и снова повторно высаживая на свежую питательную среду того же состава для повторения.

Дополнительно, к культуре апикальных меристем, исследовали введение в питательную среду антивирусного препарата рибавирин (5,0–40,0 мг/л), салициловой кислоты (0,14; 0,77; 1,4 мг/л), антибиотика Цефотаксим (50,0–450,0 мг/л), регуляторов роста Эмистим и Мелафен.

Учитываемые показатели на этапе ввода: число меристем размером менее 1 мм, 1–3 мм, более 3-х мм; гибель меристем от инфекции и из-за отсутствия развития; число развившихся меристем.

При регенерации растений учитывали следующие показатели: приживаемость микрочеренков, гибель от инфекции, гибель из-за отсутствия развития, число корней, длина корней, длина ризогенной зоны, высота, количество листьев всего и на 1 см побега, скорость роста, коэффициент полярности.

В статье приводятся результаты многолетних исследований лаборатории биотехнологии ВНИИВиВ имени Я.И. Потапенко, начиная с 2000 г. по настоящее время.

Результаты

Разработана технология клонального микроразмножения винограда при помощи культуры апикальных меристем размером 0,1–0,2 мм, так как такие экспланты являются лучшими для элиминации вирусов. В связи с тем, что регенерационная способность этих эксплантов низкая, усовершенствована схема регенерации растений, разработаны новые биотехнологические приемы для всех этапов размножения, начиная от формирования меристематических зон до высадки оздоровленных растений в открытый грунт.

Разработан способ воздействия на меристемы электромагнитным облучением низкой интенсивности. Вычлененные меристематические экспланты обрабатывали электромагнитным СВЧ-полем с частотой 37,5 ГГц и напряженностью 20 мВт в течение 65–75 мин. в комплексе с узкополосным лазерным лучом. Такое выполнение способа позволяет ускорить прохождение фаз развития, увеличить размерные характеристики, снизить гибель из-за некроза тканей и в конечном итоге обеспечить повышение регенерационной способности. Мембранология объясняет это тем, что лучи СВЧ-поля, проникая в клетку, модифицируют мембраны, производят их перестройку и подвергают разрыву двойные связи в непредельных жирных кислотах липидов. Этот разрыв сопровождается образованием в липидах свободных радикалов. В зависимости от уровня радикалов в объектах наблюдается стимулирующее, угнетающее воздействие или стационарная фаза. Стимуляция происходит в тот момент, когда достигается определенный уровень свободных радикалов (в основном их начальных форм). При этом происходит изменение проницаемости клеточных мембран, усиливается приток питательных веществ, воды и кислорода и активируются ферментные системы обмена веществ. Использование лазера в комплексной обработке усиливает стимулирующий эффект и ускоряет прохождение фаз развития.

Наблюдение за выделенными и облученными эксплантами показали, что комплексное воздействие СВЧ-лучей и лазера повышает интенсивность их развития. Ускоряется прохождение фазы общего увеличения, переход к фазе вытянутой точки роста, к фазе развертывания листьев. Разница в скорости развития облученных меристем по сравнению с необлученными видна уже через 15–20 дней и сохраняется до 90 дней культивирования. В течение всего периода более интенсивное развитие наблюдается при продолжительности облучения 120, 75 и 65 мин. При 60 и 80 мин. интенсивность прохождения фаз развития несколько замедляется.

Облучение меристем оказало влияние и на их ростовые характеристики. Более интенсивное развитие сопровождалось изменением размерных характеристик меристем (табл. 1). Размерные характеристики облученных меристем во всех вариантах были выше контрольных. Выделились варианты с продолжительностью облучения 75, 65 и 120 мин. Последовательное

Таблица 2. Регенерационная способность меристем при различной продолжительности комплексного облучения на этапе пролиферации**Table 2.** Regenerative capacity of meristems at different duration of complex irradiation on the stage of proliferation

Показатели	Продолжительность облучения, мин.					
	60	65	75	80	120	контроль
Средний размер конгломератов, мм	20,0	22,0	32,7	25,0	55,0	30,0
Максимальный размер конгломератов, мм	30,0	50,0	65,0	35,0	55,0	30,0
Сохранилось конгломератов, полученных из меристем, %	10,0	42,9	80,0	80,0	14,2	20,0
Срезано микропобегов, всего, шт.	6,0	12,0	22,0	4,0	0	4,0
Срезано микропобегов в расчете на одну резвившуюся меристему, шт.	0,6	0,9	4,4	0,8	0	0,8

увеличение меристем в течение всего периода культивирования отмечено при продолжительности облучения 75 и 65 мин., через 80 дней культивирования резко вырос размер меристем в варианте с облучением в течение 120 мин.

В процессе культивирования из меристем (на этапе пролиферации) образовались конгломераты узлов и побегов. Их размеры как средние по варианту, так и максимальные также зависели от продолжительности облучения. Наиболее крупные конгломераты были при продолжительности облучения 120 и 75 мин. (табл. 2).

Комплексное облучение также оказало положительное влияние на сохранность меристем. Как на первом, так и на втором этапе культивирования резко снизилась гибель меристем из-за отсутствия развития и некроза тканей при продолжительности облучения 75–80 мин. А в варианте с продолжительностью облучения 120 мин., где наблюдался интенсивный рост меристем и конгломератов, отмечена почти полная их гибель.

Регенерационная способность меристем характеризуется в основном количеством образовавшихся побегов размером 10–25 мм, которые можно срезать для укоренения. Наибольшее число побегов образовалось и срезано при облучении в течение 75 и 65 мин. (табл. 2). В пересчете на одну выделенную меристему это составило 0,9 и 4,4 побега. В сравнении с контролем регенерационная способность меристем при воздействии СВЧ-лучами и лазером возросла в 5,5 раза.

Таким образом, воздействие электромагнитного излучения низкой интенсивности в комплексе с узкополосным лазером на высаженные на питательную среду меристемы способствует ускоренному их прохождению фаз развития, увеличению размерных характеристик, снижает гибель из-за некроза тканей, обеспечивает повышение регенерационной способности, а в конечном итоге способствует созданию оздоровленного посадочного материала.

Применение СВЧ-лучей на этапе микрочеренкования заключается в том, что микрочеренки, высаженные в пробирки, подвергаются воздействию электромагнитного излучения с частотой 37,5 ГГц и напряженностью 20 мВт, при этом расстояние пробирок с микрочеренками от источника высокочастот-

ных сигналов составляет 20–60 см с параллельным к источнику облучения расположением или перпендикулярным в один-два ряда расположением пробирок в ряду в количестве от 5 до 14.

При различном расположении пробирок плотность падающей мощности СВЧ-лучей изменяется, что создает более или менее оптимальные условия для облученных растений. Наблюдение за динамикой роста и развития винограда *in vitro* показало, что под воздействием электромагнитного излучения происходит изменение ростовых характеристик во время всего периода культивирования. Установлено у облученных растений увеличение суточной скорости роста и длины побега на 30-й день культивирования в 2,3–2,4 раза, на 50-й день – в 1,7–1,8 раза, на 70-й день – в 1,7 раза. Число образовавшихся узлов на побеге увеличилось соответственно в 1,3; 1,2 и 1,5 раза. Также установлено, что у облученных растений эти показатели на 50-й день культивирования выше, чем у необлученных на 70-й день культивирования. То есть возможно сократить период культивирования до 50–60 дней, чаще проводить субкультивирования и тем самым повысить эффективность клонального микроразмножения винограда при высоком качестве микрочеренков.

Разработан способ оптимизации клонального микроразмножения за счет введения в состав питательной среды семян винограда в виде тонкоразмолотого порошка в концентрации 0,1–0,5% от объёма среды. Семена винограда используются как стимуляторы роста естественного происхождения ввиду того, что в них находятся вещества с ценными биологическими свойствами: абсцизовая и хлорогеновая кислоты, общие фенолы, рутин, свободные ауксины и цитокинины, такие осмотически активные вещества как соли, сахара, органические кислоты. Наблюдения за развитием пробирочных растений в зависимости от количества молотых семян винограда, добавленных в питательную среду, представлено в табл. 3.

Добавление в питательную среду тонкоразмолотых семян винограда оказывает, в первую очередь, положительное влияние на укоренение микрочеренков и развитие корней пробирочных растений, уменьшается длина главного и придаточных корней,

Таблица 3. Влияние размолотых семян винограда в составе питательной среды на ход ростовых процессов растений**Table 3.** The effect of grained grape seeds in the nutrient medium on plant growth processes

Концентрация, % от объема	Показатели					
	число корней, шт.	сырой вес корней, мг	длина побега, мм	скорость роста, мм/сутки	вес сырой массы побегов, мг	число узлов, шт.
Контроль	3,3	38,3	95,4	1,51	197,6	8,8
0,05	3,6	75,6	98,6	1,57	219,6	9,1
0,1	4,2	101,4	108,2	1,72	255,4	10,3
0,25	6,0	158,3	112,8	1,79	314,7	11,3
0,5	5,4	156,9	104,4	1,66	266,1	11,2
0,8	2,4	107,3	68,1	1,08	176,3	9,3

но возрастает их число, что улучшает состояние корневой системы. Это способствует лучшему росту побегов, развитию большей листовой поверхности, увеличению общей массы побегов и числа узлов, которые дают начало новым растениям *in vitro* после их микрочеренкования. Таким образом, увеличивается потенциальное микрочеренкование и эффективность клонального микроразмножения возрастает на 27,4%. Максимальный положительный эффект получен при концентрации семян, добавляемых в питательную среду – 0,25%.

Метод водной терапии вызревших микрочеренков с последующей культурой апикальных меристем для комплексного оздоровления растений от вирусов и микоплазм отрабатывался на сегментах вызревших побегов с зимующими глазками сортов Степняк, Кунлеань, Саперави северный и Цветочный. Испытывалась температура воды 45, 50 и 55°C. Продолжительность обработки побегов составляла от 10 до 75 мин. Выявлено, что после проведения водной терапии у всех изученных сортов сохраняются жизнеспособные меристемы. Однако при некоторых режимах обработки отсутствует как приживаемость меристем, так и их регенерация. Такими режимами являются: 45°C, 10 мин.; 50°C, 10 мин.; 55°C, 45 мин.; 55°C, 60 мин.; 55°C, 75 мин. Они не пригодны для проведения водной терапии. Оптимальными режимами, обеспечивающими высокую репаративную и репродуктивную регенерацию меристем, являются: температура воды 45°C, экспозиция 45 мин., и температура воды 55°C, экспозиция 30 мин. Отмеченные различия в эффективности водной терапии у приведенных сортов винограда можно объяснить, как сортовыми особенностями, так и состоянием глазков перед обработкой. Отличное состояние побегов и глазков является одной из причин высокой регенерационной способности меристем после обработки их горячей водой у сорта Цветочный.

Для сортов винограда Душистый и Московский устойчивый с визуальными признаками вирусных заболеваний выявлены режимы водной терапии, способствующие увеличению регенерации меристем и оздоровлению от вирусной инфекции. Для сорта Душистый оптимальная температура составила 45–

55°C при экспозиции 15 мин., для сорта Московский устойчивый – 45°C в продолжение 45 мин. Улучшение приживаемости меристем и их регенерационной способности происходит в результате оздоровления их от грибных патогенов и вирусов. Это подтверждено PCR-анализом и тестированием на сорте-индикаторе Рупестрис дю Ло. Таким образом, водная терапия с последующей культурой апикальных меристем способствует оздоровлению винограда от вирусной инфекции.

Разработаны способы применения универсального регулятора роста Эмистим в составе питательных сред на различных этапах культивирования в зависимости от сортовых особенностей.

Особое значение имеет применение этого препарата на этапе ввода меристем в культуру. Под влиянием Эмистима активизируются ростовые формообразовательные и функциональные процессы, повышается устойчивость к патогенам, приживаемость меристем, регенерационная способность их на этапе собственно микроразмножения.

Для сорта Платовский эффективным оказалось применение более высоких концентраций этого препарата 10⁻⁵–10⁻⁶%. Число срезанных побегов увеличилось по сравнению с контролем в 3,5 раза.

Отмечено стимулирование роста растений в результате действия этого препарата на этапе микрочеренкования при массовом тиражировании мериклонов. Анализ применения Эмистима в разведении от 10⁻⁶ до 10⁻¹⁰ при микрочеренковании 6 сортов винограда (привойных – Дружба, Каберне северный, Цветочный и подвойных – Кобера 5ББ, Рупестрис дю Ло, 1615-2) показал, что происходит улучшение приживаемости микрочеренков, более быстрое образование и рост корней, побегов, листьев, что обеспечивает ускорение процесса, повышение эффективности клонального микроразмножения оздоровленных растений. Большое значение имеет правильно подобранная концентрация препарата, так как помимо стимулирующего эффекта, может наблюдаться и ингибирование, чрезмерное развитие ризогенной зоны, тормозящее развитие побегов и образование листьев, что ведет к снижению коэффициента размножения. Стимулирование развития корней и побегов отмечено

Таблица 4. Анализ ввода меристем сорта Презент в культуру, 2018–2019 гг.
Table 4. Analysis of meristem introduction of 'Prezent' variety into culture, 2018–2019

Рибавирин, мг/л	Число меристем, % размером			Гибель меристем, %		Общее число развившихся
	до 1мм	от 1 до 3 мм	более 3 мм	ГИ	ОР	
30 дней культивирования						
0	0	31,0	53,5	0	15,5	84,5
10	0	31,0	69,0	0	0	100,0
20	0	15,5	69,0	0	15,5	84,5
30	0	46,0	38,5	0	15,5	84,5
40	0	0	0	0	100,0	0
60 дней культивирования						
0	0	31,0	53,5	0	15,5	84,5
10	0	31,0	69,0	0	0	100,0
20	0	31,0	46,0	0	23,0	77,0
30	0	38,0	31,0	0	31,0	69,0
40	0	0	0	0	100,0	0
90 дней культивирования						
0	0	15,5	61,5	0	23,0	77,0
10	0	23,0	61,5	0	15,5	84,5
20	0	8,0	23,0	0	69,0	31,0
30	0	31,0	31,0	0	38,0	62,0
40	0	0	0	0	100,0	0

но у всех сортов и подвоев, но концентрации, обеспечивающие стимулирование, были различными для каждого сорта. Так, у сорта Дружба, подвоев Кобера 5ББ, 1612-5 лучшее развитие растений произошло при разведении Эмистима 10^{-7} – 10^{-8} %, у сорта Цветочный при разведении 10^{-10} . Наиболее существенное улучшение отмечено при концентрации Эмистима 10^{-8} и 10^{-10} мг/л. Благодаря этому образование растений из микрочеренков увеличилось с 25,0% в контроле до 67,8–75,0 % в этих вариантах.

Установлены оптимальные концентрации препарата Эмистим в составе питательных сред в зависимости от сортовых особенностей: на этапе ввода меристем в культуру следует применять препарат в концентрации 10^{-5} – 10^{-11} , для улучшения ризогенеза – 10^{-10} %, на этапе микрочеренкования – от 10^{-7} до 10^{-10} %. Сочетание интенсивности освещения 2200–2400 лк + Эмистим в разведении 10^{-7} – 10^{-9} % обеспечивает оптимальное развитие мериклонов на этапе микрочеренкования. Для улучшения адаптивных способностей растений перед переносом в нестерильные условия необходимо обрабатывать их Эмистимом в разведении 10^{-7} – 10^{-9} %.

Способы оптимизации состава питательных сред на отдельных этапах клонального микроразмножения изучены при помощи регуляторов роста: лигногумат калийный, салициловая кислота, циркон, эпин-экстра, мелафен и деконтаминации растений с помощью антибиотиков гентамицин и цефотаксим.

Схема регенерации растений постоянно совершенствуется по пути ее упрощения, позволяющего исключить этап микрочеренкования, увеличить ко-

эффициент размножения, улучшить качество регенерированных растений, сократить период регенерации растений, освободить площади культуральных коммат.

Разработан для ингибирования вирусной инфекции метод хемотерапии, основанный на введении в питательную среду химического Рибавирина (виразол, 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide). Выявлено, что применение этого противовирусного препарата не оказывает пагубного действия на развитие меристем, так как отмечен их интенсивный рост. Общее число развившихся меристем (84,5%) и наибольшее число крупных меристем размером более 3 мм отмечено при концентрации 10,0 мг/л. Концентрация 40 мг/л оказалась токсичной для меристем и привела к их полной гибели (табл. 4).

В процессе культивирования происходила гибель меристем из-за отсутствия развития и последующего некроза, а также из-за инфекции. Наибольшая гибель от некроза отмечена при повышенных концентрациях препарата: 20 и 30 мг/л. В то же время в этих вариантах снизилась гибель меристем от инфекции. Лучшее состояние меристем по этим показателям отмечено при концентрации Рибавирина 10 мг/л: снизилась гибель меристем от инфекции, улучшилась их сохранность, и произошло образование и срезка побегов для дальнейшего микроразмножения.

На этапе ввода в культуру *in vitro* сорта Красностоп золотовский под действием салициловой кислоты уменьшилась гибель меристем от инфекции: первый этап ввода завершило в 2,8–3,5 раза больше меристем, чем в контроле. Улучшилось прохождение следующего этапа собственно микроразмножения,

Таблица 5. Продуктивная регенерация меристем при добавлении в состав питательной среды салициловой кислоты, Красностоп золотовский, 2018 – 2020 гг.

Table 5. Productive regeneration of meristems when salicylic acid is added to the nutrient medium, 'Krasnostop Zolotovskiy', 2018 – 2020

Варианты, мг/л	Завершили ввод, %	Число образовавшихся побегов, шт. в пассаже									
		1	2	3	4	5	6	7	8	всего	
Контроль	19,0	—	10	2	3	3	—	1	8	27	
СК —0,14	47,6	3	12	4	17	9	7	6	11	69	
СК —1,4	47,6	—	—	2	2	—	10	16	4	34	

Таблица 6. Развитие меристем и срезка побегов в ходе пролиферации сортов Кристалл и Платовский, 2016–2018 гг.

Table 6. Development of meristems and cutting of shoots during proliferation of varieties 'Kristall' and 'Platovskiy', 2016–2018

Препарат	Концентрация	Развилось меристем, шт.		Срезано побегов, шт.	
		Кристалл	Платовский	Кристалл	Платовский
Контроль	0	9	8	1	3
Мелафен	10 ⁻⁷	9	6	1	3
Рибавирин	5,0 мг/л	7	8	6	2
Салициловая кислота	0,14 мг/л	9	9	2	3
Рибавирин+ салициловая кислота	5,0 мг/л + 0,14 мг/л	8	10	0	8
Цефотаксим	100 мг/л	10	6	4	6

образование новых узлов и побегов. Наибольшее число побегов образовалось, и было срезано для укоренения в варианте с концентрацией СК – 0,14 мг/л, больше чем в контроле в 2,6 раза. При повышении содержания СК в составе питательной среды на этапе ввода до 1,4 мг/л новообразование побегов снижается, но всё-таки остается выше, чем в контроле (табл. 5).

Салициловая кислота, добавленная в состав питательной среды на этапе ввода, способствует улучшению адаптации меристем к условиям культивирования и регенерации из них растений; на этапе микрочеренкования применение СК в диапазоне концентраций 0,14–1,4 мг/л улучшает приживаемость микрочеренков, стимулирует корнеобразование, но ингибирует рост растений. Отмечена различная реакция отдельных сортов винограда на её применение: для подвойных сортов винограда лучшей оказалась концентрация – 1,4 мг/л; для сорта Красностоп золотовский – 0,14 мг/л (табл. 6).

Следовательно, салициловая кислота в оптимальных концентрациях отличается низкой фитотоксичностью и даже проявляет стимулирующее действие на процессы морфогенеза у растений, повышая коэффициент размножения и ризогенную способность. Эффективным оказалось совместное применение Рибавирина и салициловой кислоты. Учитывая это, и антивирусную активность, её следует применять для оздоровления растений в дополнение к культуре меристем.

На основании проведенных исследований доказано, что под действием антибиотика Цефотаксим снижается заражение растений бактериальной инфекцией, которое выражается в улучшении приживаемости

микрочеренков и регенерации из них растений. При слабом инфицировании растений применение антибиотика улучшает регенерацию на 5,0–15,0% по сравнению с контролем. В данном случае эффективны низкие концентрации Цефотаксима 50–250 мг/л. При заражении от 15,0 до 50,0% растений эффективность применения Цефотаксима возрастает: приживаемость микрочеренков увеличивается по сравнению с контролем на 35,0–45,0%. При этом эффективны концентрации 250–450 мг/л.

Таким образом, доказана необходимость применения хемотерапии на этапе ввода меристем в культуру *in vitro*: для оздоровления от микозов — добавление антибиотика Цефотаксим; для оздоровления от вирусной инфекции – препарата Рибавирин совместно с салициловой кислотой. Для повышения коэффициента размножения следует использовать регулятор роста Мелафен и улучшить условия асептического культивирования растений *in vitro*.

Усовершенствованы существующие и установлена возможность использования новых приёмов световой биотехнологии, позволяющих повысить эффективность метода оздоровления и клонального размножения винограда [17–18].

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что оно показало целесообразность пересмотра некоторых аспектов культивирования в направлении снижения энергоёмкости метода клонального микроразмножения. Разработана оптимизация условий культивирования изолированных тканей винограда *in vitro* при помощи интенсивности освещения, изменения продолжительности фотопериода, качества излучения, в том числе в сочетании с регулятором роста растений Эмистимом, которая обеспе-

чивает повышение качества, выхода мериклонов и снижение их себестоимости.

Усовершенствован метод тестирования на травянистых индикаторах на наличие сокопереносимых вирусов [19–20]. Инактивация ингибиторов вирусов и повышение эффективности тестирования происходит при добавлении в инокулюм тиосульфата натрия (натрий серноватисто-кислый – $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) совместно с тонкоразмолотым порошком семян винограда в концентрации 18–21% (источник заражения – молодые листья); 12% (корни), 2,5–9% (сок ягод).

Для выявления всего комплекса вирусных заболеваний разработан метод микропрививок с помощью сортов-индикаторов, который осуществляется на стеллажах ускоренного выращивания растений.

Адаптации оздоровленных растений *in vitro* к нестерильным условиям среды. Процесс адаптации пробирочных растений к нестерильным условиям является ответственной и трудоемкой операцией [21–22]. Это связано с тем, что у пробирочных растений нарушена деятельность устьичного аппарата, вследствие чего они подвержены очень быстрому обезвоживанию. При переносе растений, размноженных в культуре ткани *in vitro*, в нестерильные условия они испытывают стрессовые реакции, направленные на защиту клеточных структур и устранение неблагоприятных изменений в клетках, то есть наблюдается явление адаптационного синдрома.

Усовершенствован состав почвенного субстрата для адаптации и способ подготовки, улучшающий его структуру и питательные свойства, подобраны оптимальные соотношения компонентов. Замена речного песка на глауконитовый в составе субстрата способствует улучшению всех показателей развития растений, особенно это было заметно при высадке их в полевых условиях. В конце вегетации прирост и вызревание увеличились у этих растений более чем на 20,0%. То есть у растений улучшилась адаптация к условиям открытого грунта.

Исследована эффективность применения препаратов: Лигногумат калийный, Суперстим № 1, Экстарасол-55, Эмистим – с целью повышения адаптивности к нестерильным условиям.

Изучена адаптивность различных сортов к условиям *in vivo*, выявлены закономерности, способствующие ее прогнозированию и повышению.

Тестирование оздоровленных линий, осуществленное перед высадкой на маточник биологическими методами (травянистых индикаторов, прививки на сорта-индикаторы) и при помощи ПЦР, позволило выделить для дальнейшего размножения линии различных сортов, свободные от наиболее опасных вирусных заболеваний и бактериального рака.

Вегетирующие саженцы с закрытой корневой системой после адаптации, доращивания и закалки, вы-



Рис. Базисный маточник привойных сортов винограда в Нижне-Кундрюческом отделении опытного поля

Fig. Basic nursery of grafted grape varieties in the Nizhne-Kundryuchesk branch of experimental field

саживали в открытый грунт или теплицу. Благодаря правильно подобранному срокам, способам посадки и ведению маточника, приживаемость в полевых условиях возросла с 75,0% до 95,0% и составила в первый год около 90,0-100,0%.

В результате внедрения технологии получен исходный посадочный материал, из которого заложен базисный маточник на Нижне-Кундрюческом отделении опытного поля.

Высажены на базисном маточнике оздоровленные при помощи культуры апикальных меристем растения сортов:

- селекции института (Баклановский, Дружба, Каберне северный, Памяти Кострикина, Платовский, Талисман, Фиолетовый ранний, Цветочный);

- донских аборигенных (Кабашный, Красностоп золотовский, Крестовский, Кумшацкий белый, Сибирьковский, Сыпун черный, Цимлянский белый, Цимлянский черный и два его клона (1-3-13-2-3 и 1-1-61-10-3));

- классических (Каберне-Совиньон, Мерло, Пино нуар);

- подвой (Гравесак, Виерул 3, Кобера 5ББ, Презент, Рупестрис дю Ло, РСБ, SO₄, Телеки 5С, Феркаль).

Таким образом, на основании разработанных методов создана технология, которая обеспечивает процесс регенерации растений: «от меристемы к базисному маточнику».

Выращивание сертифицированного посадочного материала, из оздоровленного *in vitro* исходного, позволяет не только избавиться от ряда фитоплазменных и вирусных заболеваний, но и от сосущих вредителей, таких как филлоксеры и виноградный зудень. Уменьшается также вероятность присутствия на маточных растениях возбудителей эски, эутипиоза и черного рака, то есть возбудителей, входящих в

группу хронических вредных организмов.

Благодаря этому переход на закладку промышленных насаждений сертифицированным посадочным материалом обеспечивает повышение продуктивности виноградников и продление их продуктивной эксплуатации. В случае предохранения от вторичного заражения возбудителями хронических болезней реально увеличить продуктивность будущих насаждений в 1,5–2 раза.

Источник финансирования

Не указан.

Financing source

Not specified.

Конфликт интересов

Не заявлен.

Conflict of interests

Not declared.

Список литературы

1. Thung T.H. Smetstof en plantencel bij enkele virusziekten van de tabaksplant IV. Tijdschr. Plantenziekten. 1938;44:225–245.
2. White P.R. Handbook of Plant Tissue Culture. Lancaster: Pa. Jagues Cattel Press. 1943:1–277.
3. Morel G., Martin C. Guérison de dahlia atteints d'une maladie a virus. C.R. Acad. Sci. 1952;235:1324–1325.
4. Thomson A.D. Heat treatment and tissue culture as a means of freeing potatoes from virus Y. Nature. 1956;177:1–709.
5. Cheruvathur M.K., Abraham J., Thomas T.D. *In vitro* micropropagation and flowering in *Ipomoea sepiaria Roxb.* An important ethanomedicinal plant. Asian Pacific Journal of Reproduction. 2015;4(1):49–53. DOI 10.1016/S2305-0500(14)60058-0.
6. Doroshenko N.P., Puzirnova V.G. Biotechnological methods of preservation of the grape gene pool in the *in vitro* collection. BIO Web of Conf. 2020;25:04001. DOI 10.1051/bioconf/20202504001.
7. Jadcak P., Kulpa D., Zbrojewska A. *In vitro* micropropagation of *Drosera rotundifolia*. World Scientific News. 2017;66:75–85.
8. Maghradze D., Ocete R., García J.L., Cantos M. Micropropagation and *in vitro* germplasm conservation of Georgian wild grapevines. Vitis. 2015;54:257–258.
9. Mozafari A., Ghoraiishi O., Ghaderi H., Javadi T. Micropropagation of grape cultivars (*Vitis Vinifera* L.) on different basal media supplemented with benzyl adenine. Agriculturae Conspectus Scientificus. 2016;81(3):123–129.
10. Ivashchuk O.A., Fedorov V.I., Shcherbinina N.V., Maslova E.V., Shamraeva E.O., Zhuravlev M.D.. Microclonal propagation of plant process modeling and optimization of its parameters based on neural network. Drug Invention Today. 2018;10(3):3170–3175.
11. Bahadur B., Venkat Rajam M., Sahijram L., Krishnamurthy K. Micropropagation of Plants. Plant Biology and Biotechnology. Springer, New Delhi. 2015;2:329–346. DOI 10.1007/978-81-322-2283-5_16.
12. Kordi M., Kaviani B., Hashemabadi D. *In vitro* propagation of *Kalanchoe blossfeldiana* using BA and NAA. Pelagia Research Library European Journal of Experimental Biology. 2013;3(1):285–288.
13. Kinfe B., Feyssa T., Bedada G. *In vitro* micropropagation of grape vine (*Vitis Vinifera* L.) from nodal culture. African Journal of Biotechnology. 2017;16(43):2083–2091. DOI 10.5897/AJB2016.15803.
14. San Pedro Tània, Peiró Rosa, Villanova Joan, Olmos Antonio, Gisbert Carmina. *In vitro* propagation of *Vitis Vinifera*

L. cv. 'Monastrell'. Electronic Journal of Biotechnology. 2017;27:80–83. DOI 10.1016/j.ejbt.2017.03.006.

15. Grout B.W. Meristem-Tip Culture for Propagation and Virus Elimination. Plant Cell Culture Protocols. Totowa. 1990:115–125.
16. Morel G. Martin C. Guirisan de Dahlais atteints d'une mala a virus. Acad.Sci. 1952:235/21.
17. Соболев А.А., Дорошенко Н.П. Световая биотехнология в культуре изолированных тканей винограда // Виноделие и виноградарство. 2004;6:27–29.
18. Соболев А.А., Ребров А.Н., Дорошенко Н.П. Влияние интенсивности спектрального состава и калийного лигногумата на регенерационную способность винограда *in vitro*. Современные достижения биотехнологии в виноградарстве и других отраслях сельского хозяйства. Материалы конф. (29–30 июня 2005). Новочеркасск. 2005:126–134.
19. Дорошенко Н.П. Диагностика вирусных болезней винограда с помощью метода травянистых индикаторов // Виноград и вино России. 1997;3:2–4.
20. Дорошенко Н.П., Ребров А.Н. Применение травянистых индикаторов для тестирования на вирусную инфекцию // Критерии и принципы формирования высокопродуктивного виноградарства. Анапа. 2007:251–258.
21. Дорошенко Н.П., Семенова Л.Н. Адаптация оздоровленных пробирочных растений винограда к нестерильным условиям // Перспективы внедрения современных биотехнологических разработок для повышения эффективности сельскохозяйственного производства. Ставрополь. 2000:1–28.
22. Дорошенко Н.П., Ребров А.Н. Новые аспекты адаптации растений, полученных *in vitro* к нестерильным условиям // Захаровские чтения «Агротехнологические и экологические аспекты развития виноградо-винодельческой отрасли». Новочеркасск. 2007:307–312.

References

1. Thung T.H. Smetstof en plantencel bij enkele virusziekten van de tabaksplant IV. Tijdschr. Plantenziekten. 1938;44:225–245.
2. White P.R. Handbook of Plant Tissue Culture. Lancaster: Pa. Jagues Cattel Press. 1943:1–277.
3. Morel G., Martin C. Guérison de dahlia atteints d'une maladie a virus. C.R. Acad. Sci. 1952;235:1324–1325.
4. Thomson A.D. Heat treatment and tissue culture as a means of freeing potatoes from virus Y. Nature. 1956;177:1–709.
5. Cheruvathur M.K., Abraham J., Thomas T.D. *In vitro* micropropagation and flowering in *Ipomoea sepiaria Roxb.* An important ethanomedicinal plant. Asian Pacific Journal of Reproduction. 2015;4(1):49–53. DOI 10.1016/S2305-0500(14)60058-0.
6. Doroshenko N.P., Puzirnova V.G. Biotechnological methods of preservation of the grape gene pool in the *in vitro* collection. BIO Web of Conf. 2020;25:04001. DOI 10.1051/bioconf/20202504001.
7. Jadcak P., Kulpa D., Zbrojewska A. *In vitro* micropropagation of *Drosera rotundifolia*. World Scientific News. 2017;66:75–85.
8. Maghradze D., Ocete R., García J.L., Cantos M. Micropropagation and *in vitro* germplasm conservation of Georgian wild grapevines. Vitis. 2015;54:257–258.
9. Mozafari A., Ghoraiishi O., Ghaderi H., Javadi T. Micropropagation of grape cultivars (*Vitis Vinifera* L.) on different basal media supplemented with benzyl adenine. Agriculturae Conspectus Scientificus. 2016;81(3):123–129.
10. Ivashchuk O.A., Fedorov V.I., Shcherbinina N.V., Maslova E.V., Shamraeva E.O., Zhuravlev M.D.. Microclonal propagation of plant process modeling and optimization of its parameters based on neural network. Drug Invention Today.

- 2018;10(3):3170–3175.
11. Bahadur B., Venkat Rajam M., Sahijram L., Krishnamurthy K. Micropropagation of Plants. Plant Biology and Biotechnology. Springer, New Delhi. 2015;2:329–346. DOI 10.1007/978-81-322-2283-5_16.
 12. Kordi M., Kaviani B., Hashemabadi D. *In vitro* propagation of *Kalanchoe blossfeldiana* using BA and NAA. Pelagia Research Library European Journal of Experimental Biology. 2013;3(1):285–288.
 13. Kinfe B., Feyssa T., Bedada G. *In vitro* micropropagation of grape vine (*Vitis Vinifera* L.) from nodal culture. African Journal of Biotechnology. 2017;16(43):2083–2091. DOI 10.5897/AJB2016.15803.
 14. San Pedro Tània, Peiró Rosa, Villanova Joan, Olmos Antonio, Gisbert Carmina. *In vitro* propagation of *Vitis Vinifera* L. cv. 'Monastrell'. Electronic Journal of Biotechnology. 2017;27:80–83. DOI 10.1016/j.ejbt.2017.03.006.
 15. Grout B.W. Meristem-Tip Culture for Propagation and Virus Elimination. Plant Cell Culture Protocols. Totowa. 1990:115–125.
 16. Morel G. Martin C. Guirisan de Dahlaia atteints d'une mala a virus. Acad.Sci. 1952:235/21.
 17. Sobolev A.A., Doroshenko N.P. Light biotechnology in the culture of isolated tissues of grapes. Winemaking and Viticulture. 2004;6:27–29 (*in Russian*).
 18. Sobolev A.A., Rebrov A.N., Doroshenko N.P. The effect of the intensity of spectral composition and potassium lignohumate on regenerative capacity of grapes *in vitro*. Modern achievements of biotechnology in viticulture and other branches of agriculture. Conf. (June 29–30, 2005). Novocherkassk. 2005:126–134 (*in Russian*).
 19. Doroshenko N.P. Diagnosis of viral diseases of grapes using the method of herbaceous indicators. Grapes and wine of Russia. 1997;3:2–4 (*in Russian*).
 20. Doroshenko N.P., Rebrov A.N. The use of herbaceous indicators for testing for viral infection. Criteria and principles of formation highly productive viticulture. Anapa. 2007:251–258 (*in Russian*).
 21. Doroshenko N.P., Semenova L.N. Adaptation of healthy test-tube grape plants to non-sterile conditions. Prospects of introduction modern biotechnological developments to improve the efficiency of agricultural production. Stavropol. 2000:1–28 (*in Russian*).
 22. Doroshenko N.P., Rebrov A.N. New aspects of adaptation plants obtained *in vitro* to non-sterile conditions. Zakharovskie readings "Agrotechnological and environmental aspects of development of viticultural and winemaking industry". Novocherkassk. 2007:307–312 (*in Russian*).

Информация об авторах

Наталья Петровна Дорошенко, д-р с.-х. наук, главный научный сотрудник лаборатории биотехнологии винограда; e-мэйл: n.doroschenko2013@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7284-120X>;

Валентина Георгиевна Пузырнова, младший научный сотрудник лаборатории контроля качества виноградовинодельческой продукции; e-мэйл: ruswinebooks@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3930-1639>;

Леонид Петрович Трошин, д-р биол. наук, профессор; e-мэйл: lptroshin@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1232-2077>.

Information about authors

Natalia P. Doroshenko, Dr. Agric. Sci., Chief Staff Scientist, Laboratory of Grape Biotechnology; e-mail: n.doroschenko2013@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7284-120X>;

Valentina G. Puzirnova, Junior Staff Scientist, Laboratory of Quality Control in Vine and Wine Production; e-mail: ruswinebooks@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3930-1639>;

Leonid P. Troshin, Dr. Biol. Sci., Professor; e-mail: lptroshin@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1232-2077>.

Статья поступила в редакцию 31.03.2022, одобрена после рецензии 05.05.2022, принята к публикации 20.05.2022