

Оценка регенерационной способности образцов винограда (*Vitis vinifera* L.) и красной смородины (*Ribes rubrum* L.) в культуре *in vitro* для создания криоколлекции ВИР

Вержук В.Г.[✉], Ерастенкова М.В., Хохленко А.А., Агаханов М.М., Кислин Е.Н., Ухатова Ю.В.

Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), Россия, 190000, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42-44

[✉]vverzhuk@mail.ru

Аннотация. Для создания криоколлекции культурных растений на основе части коллекции ВИР, а именно – вегетативно размножаемых культур с ценными генетическими признаками, проведены исследования по совершенствованию методов длительного хранения винограда и красной смородины *in vitro*. Цель исследования состояла в оценке регенерационной способности апексов различных по происхождению сортов винограда (*Vitis vinifera* L.) и красной смородины (*Ribes rubrum* L.) в культуре *in vitro* и получении регенерирующих побегов. Опыты проведены на 9 сортах винограда и 3 сортах красной смородины, собранных в полевых генных банках в филиалах ВИР. Материалом для введения в культуру *in vitro* служили апексы в стадии активного роста, полученные из однопочковых черенков, выращенных в лабораторных условиях. По результатам исследований отмечен высокий уровень приживаемости апикальных меристем у изучаемых культур: у образцов красной смородины он был в диапазоне 66,7–80,0%, у образцов винограда – от 68,4% до 85,0%. Среди сортов винограда высокий уровень приживаемости меристем наблюдали у сорта Бианка – 85,0%. При введении в культуру *in vitro* наибольший уровень инфицированных эксплантов отмечен у сорта Шоколадный – 20%. Подобран щадящий и эффективный метод стерилизации, при котором уровень некроза тканей сводился к минимуму. Среди сортов красной смородины выделены образцы Лапландия и Осиповская, у них уровень приживаемости достигал 80,0%. У сорта Лапландия 20% эксплантов были подвержены инфекции, также наблюдали высокий уровень некроза тканей. По результатам измерения морфометрических показателей можно отметить, что по длине регенерирующих побегов у красной смородины выделен сорт Лапландия (3,0±1,8 см), у винограда – сорт Бианка (3,7±1,6 см) по данным на 30-е сутки. Полученные результаты указывают на возможность получения растительного материала в культуре *in vitro* для отработки методов криоконсервации и расширения существующей криоколлекции ВИР новыми культурами.

Ключевые слова: микроклональное размножение; виноград; красная смородина; *in vitro* коллекции; криоконсервация.

Для цитирования: Вержук В.Г., Ерастенкова М.В., Хохленко А.А., Агаханов М.М., Кислин Е.Н., Ухатова Ю.В. Оценка регенерационной способности образцов винограда (*Vitis vinifera* L.) и красной смородины (*Ribes rubrum* L.) в культуре *in vitro* для создания криоколлекции ВИР // «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2022;24(3):214-218. DOI 10.34919/IM.2022.24.3.003.

ORIGINAL RESEARCH

Evaluation of regenerative capacity of grape (*V. vinifera* L.) and red currant (*R. rubrum* L.) accessions in the culture *in vitro* for the development of VIR cryocollection

Verzhuk V.G.[✉], Erastenkova M.V., Khokhlenko A.A., Agakhanov M.M., Kislin E.N., Ukhatova Yu.V.

Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42-44 Bolshaya Morskaya str., 190000 St. Petersburg, Russia

[✉]vverzhuk@mail.ru

Abstract. To develop cryocollections of cultivated plants with valuable genetic traits from the existing at VIR field gene banks, the studies were carried out to improve *in vitro* grape and red currant conservation methods. The goal of this work was to evaluate regenerative capacity of grape (*Vitis vinifera* L.) and red currant (*Ribes rubrum* L.) apices in the culture *in vitro* and obtain regenerated shoot. Experiments were conducted on 9 grape varieties and 3 red currant varieties sampled in experimental stations, branches of VIR. Apexes at the stage of active vegetation obtained from single-bud cuttings grown under laboratory conditions served as the material for introduction to *in vitro* culture. Based on the research findings, a high level of apical meristem establishment was noted in the studied crops: 66.7% – 80.0% in red currant samples and 68.4%–85.0% in grape samples. In grapes, a high level of meristem establishment was observed in 'Bianca' variety – 85.0%. When introduced to *in vitro* culture, a high level of infected explants was noted in 'Shokoladny' variety – 20%. A gentle and efficient defertilization method allowing to minimize the level of tissue necrosis was chosen. In red currants, the highest level of establishment was found in 'Laplandiya' and 'Osipovskaya' varieties – 80.0%. In 'Laplandiya' variety, 20% of samples were susceptible to infection and demonstrated a high level of tissue necrosis. Following the results of morphometric indicators, it can be noted that in terms of the height of regenerated shoots after 30 days, 'Laplandiya' variety excelled in red currants (3.0±1.8 cm), and 'Bianca' variety - in grapes (3.7±1.6 cm). The results of the study reveal the possibility of obtaining plant material in the culture *in vitro* for testing cryopreservation methods and development of VIR cryocollection.

Key words: microclonal reproduction; grapes; red currant; *in vitro* collections; cryopreservation.

For citation: Verzhuk V.G., Erastenkova M.V., Khokhlenko A.A., Agakhanov M.M., Kislin E.N., Ukhatova Yu.V. Evaluation of regenerative capacity of grape (*V. vinifera* L.) and red currant (*R. rubrum* L.) accessions in the culture *in vitro* for the development of VIR cryocollection. Magarach. Viticulture and Winemaking. 2022; 24(3):214-218. DOI 10.34919/IM.2022.24.3.003 (in Russian).

Введение

Хранение генофонда вегетативно размножаемых культур кроме полевых коллекций включает также создание дублетных коллекций, сохраняемых в контролируемых условиях – при низкой и сверхнизкой температуре, оздоровлении в условиях *in vitro* от болезней и инфекций, направленных на получение высокой жизнеспособности, регенерационной способности растений. Перспективным способом длительного хранения вегетативно размножаемых культур является криоконсервация частей растений в виде черенков, почек, пыльцы и меристем в жидком азоте (-196°C) или его парах при -183–185°C [1–3].

В настоящее время стандартов культивирования *in vitro* и криохранения не разработано, однако по всему миру продолжают работы по созданию *in vitro* и криоколлекций и оптимизации существующих методик. Методы *in vitro* играют важную роль в стратегии сохранения *ex situ* исчезающих видов и вегетативно размножаемых культур, которые, в отличие от образцов семенных коллекций, ежегодно накапливают фитопатогены и снижают свои хозяйственно ценные показатели. Одной из основных задач при сохранении генофонда культурных растений из числа вегетативно размножаемых культур является оздоровление и создание надежного дублета [3, 4].

Цель исследования состояла в проведении оценки регенерационной способности апексов винограда и красной смородины *in vitro* и получении оздоровленного материала для криоколлекций.

Актуальность данных исследований состоит в том, что в связи с потерей в 80–90 гг. XX столетия больших площадей виноградников в промышленной зоне виноградарства проводятся работы по восстановлению высокотехнологичных сортов винограда

и других плодово-ягодных культур [5]. По историческим справкам выявлено, что, начиная с 1985 г., ампелографическая коллекция винограда сократилась более чем на 200 сортов элитных форм, исчез практически весь генофонд амурского винограда (*V. amurensis* Rupr.) из коллекции ВНИИ виноградарства и виноделия им. Я.И. Потапенко. Согласно данным Намовой (2015), к 1986 г. основная ампелографическая коллекция насчитывала 1100 сортообразцов; подвоев – 75 сортообразцов; коллекция (*V. amurensis* Rupr.) – 1500 растений; коллекция (*V. sylvestris* L.) – 15 экотипов [6]. В тот же период ампелографическая коллекция ВИР сократилась с 3500 до 600 образцов [4].

Коллекция красной смородины в ВИР насчитывает около 240 образцов и пополняется новыми поступлениями. Данная культура обладает такими ценными качествами, как скороспелость, урожайность и морозоустойчивость. В России красную смородину выращивают во многих регионах, начиная с Северного и заканчивая Северо-Кавказским. В наши исследования она была взята для отработки методики по введению образцов в культуру *in vitro* и оценки регенерационной способности [7].

Материалы и методы исследований

Исходным материалом для исследований послужила выборка из 9 сортов ампелографической коллекции, сохраняемой в условиях *ex situ* Дагестанской опытной станции – филиала ВИР (ДОС ВИР) и 3 сортов красной смородины, отобранных в различных регионах России: Полярная ОС – филиал ВИР (ПОС ВИР) и ФНЦ им. И.В. Мичурина; материал для работ с *in vitro* отбирали в НПБ «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР» (табл. 1).

Для успешной работы с культурой *in vitro* необходимо провести подбор режима стерилизации исход-

Таблица 1. Сорта винограда и красной смородины, взятые в изучение регенерационной способности апикальных меристем

Table 1. The varieties of grapes and red currants taken to study regenerative capacity of apical meristems

№	Сорт	№ каталога	Место сбора образца	Место происхождения образца
Красная смородина				
1	Светлана	201	г. Апатиты	ПОС ВИР
2	Лапландия	315	г. Апатиты	ПОС ВИР
3	Осиповская	-	г. Павловск	ФНЦ им. И.В. Мичурина, г. Мичуринск
Виноград				
1	Кацу Цпиц	41702	Дагестан	ДОС ВИР
2	Шоколадный	41856	Дагестан	ДОС ВИР
3	Кишмиш ВИРа	41715	Дагестан	ДОС ВИР
4	Изабелла	41805	Дагестан	ДОС ВИР
5	Виерул-59	41883	Дагестан	ДОС ВИР
6	Яй изюм белый	41646	Дагестан	ДОС ВИР
7	Цимлянский черный	41767	Дагестан	ДОС ВИР
8	Джунга	41664	Дагестан	ДОС ВИР
9	Бианка	41918	Дагестан	ДОС ВИР

Таблица 2. Уровень приживаемости меристем винограда и красной смородины на этапе введения в культуру
Table 2. The level of survival of grape and red currant meristems at the stage of introduction to the culture

№	Сорт	Количество высаженных эксплантов, шт.	Количество инфицированных эксплантов, шт.	Количество инфицированных эксплантов, %	Количество эксплантов с некрозом, шт.	Приживаемость	
						шт.	%
Красная смородина							
1	Светлана	9	0	0,0	3	6	66,7±16,7
2	Лапландия	10	2	20,0	0	8	80,0±13,3
3	Осиповская	10	0	0,0	2	8	80,0±13,3
Виноград							
1	Кацу Цпиц	20	1	5,0	2	17	85,0±8,2
2	Шоколадный	20	4	20,0	1	16	80,0±9,2
3	Кишмиш ВИРа	20	2	10,0	2	16	80,0±9,2
4	Изабелла	19	0	0,0	4	15	78,9±9,6
5	Виерул-59	20	2	10,0	2	16	80,0±9,2
6	Яй изюм белый	20	0	0,0	3	17	85,0±8,2
7	Цимлянский черный	19	2	10,5	4	13	68,4±9,6
8	Джунга	20	0	0,0	4	16	80,0±9,2
9	Бианка	20	0	0,0	3	17	85,0±8,2

ного материала. Одревесневшие черенки винограда, полученные из ДОС ВИР, проращивали в световой комнате для получения исходного материала – зеленых побегов. В работу брали побеги в стадии активного роста, с хорошо развитыми пазушными и апикальными почками. Стерилизацию проводили по схеме: 1 – промывка в проточной воде с жидким моющим средством Fairy 15–20 мин.; 2 – стерилизующий раствор (бытовой хлорсодержащий отбеливатель АСЕ, 10%), 15 мин.; 3 – отмывка стерилизующего раствора в ламинар-боксе 3 раза по 10 мин. автоклавированной водой.

При обработке методики введения винограда в культуру *in vitro* мы опирались на имеющиеся методические разработки [8]. Для введения в культуру *in vitro* использовали ранее рекомендованные питательные среды Мурасиге и Скуга с добавлением гормонов 6-БАП в концентрации 1 мг/л и для винограда [9] и 2 мг/л 6-БАП, 0,5 ИМК, 0,1 мг/л ГК для красной смородины [10]. Затем образцы помещали в световую комнату с режимом 8 ч ночь, 16 ч день и освещенностью 6 тыс. люкс.

Результаты и их обсуждение

На основании проведенных экспериментов рассчитан процент приживаемости эксплантов винограда и красной смородины. Результаты уровня приживаемости меристем на этапе введения в культуру приведены в табл. 2.

Анализ данных, представленных в табл. 2, показал высокий уровень приживаемости меристем на 14-й день после стерилизации: у образцов красной смородины он был в диапазоне 66,7%–80,0%, у сортов винограда еще больше – от 68,4% до 85,0%. Оценка

отдельно по сортам показала, что у сортов красной смородины Лапландия и Осиповская уровень приживаемости достигал 80,0%, что указывает на эффективность образцов при введении в культуру *in vitro*.

Среди сортов винограда самый высокий уровень приживаемости меристем наблюдали у сорта Бианка – 85,0%, у остальных был также высоким и составлял 80,0%. По количеству инфицированных эксплантов отмечены сорта Шоколадный (20,0%), Виерул-59 (10,0%) и Цимлянский черный (10,5%).

В течение развития побега производился учет длины всех побегов и выводилось среднее значение для каждого сорта. Данные представлены в табл. 3.

По результатам морфометрических измерений на 30-е сутки отмечено, что по длине регенерирующих побегов у красной смородины сорт Лапландия имеет наибольшую величину показателя, у винограда – сорт Бианка. Динамика развития регенерирующих побегов винограда в культуре *in vitro* на 10–30-е сутки представлена на рис.

Выводы

Для создания криоколлекции красной смородины и винограда определяющим моментом является создание *in vitro* коллекции данных культур. В настоящее время проведена работа по подбору режима стерилизации растительного материала, подобраны оптимальные среды для интенсивного развития растений в культуре *in vitro*.

Оценка динамики роста регенерирующих побегов указала на сорта винограда с высокими показателями к регенерации, что возможно повлияет на восстановление образцов после криоконсервации. По данным работы можно отобрать сорта со способ-

Таблица 3. Морфометрические показатели регенерирующих побегов

Table 3. Morphometric indicators of regenerated shoots

№	Сорт	Длина регенерирующих побегов, см				
		10-е сутки	15 дней	20-е сутки	25-е сутки	30-е сутки
Красная смородина						
1	Лапландия	0,7±0,3	1,1±0,2	2,2±1,0	2,6±1,4	3,0±1,8
2	Светлана	0,5±0,2	0,9±0,5	1,2±0,5	1,8±0,8	2,3±1,2
3	Осиповская	0,5±0,2	0,7±0,6	1,6±0,7	2,0±1,1	2,3±1,6
Виноград						
1	Кацу Цпиц	0,6±0,1	0,8±0,1	1,0±0,1	1,5±0,1	2,3±0,1
2	Шоколадный	1,1±,2	1,4±0,4	1,9±0,3	2,1±0,4	2,7±0,7
3	Кишмиш ВИРа	0,9±0,1	1,0±0,1	1,3±0,1	2,0±0,1	2,5±0,1
4	Изабелла	0,6±0,0	0,7±0,1	0,9±0,1	1,2±0,1	2,0±0,1
5	Виерул-59	0,7±0,3	1,4±0,4	1,6±0,4	2,3±0,8	2,8±0,8
6	Яй изюм белый	0,6±0,0	0,7±0,1	0,9±0,0	1,3±0,1	1,8±0,1
7	Цимлянский черный	0,7±0,2	0,8±0,1	1,0±0,1	1,6±0,1	2,0±0,1
8	Джунга	0,9±0,2	2,0±0,7	2,3±1,2	2,5±1,4	3,1±1,4
9	Бианка	0,9±0,3	1,3±0,5	1,7±0,7	2,8±1,1	3,7±1,6

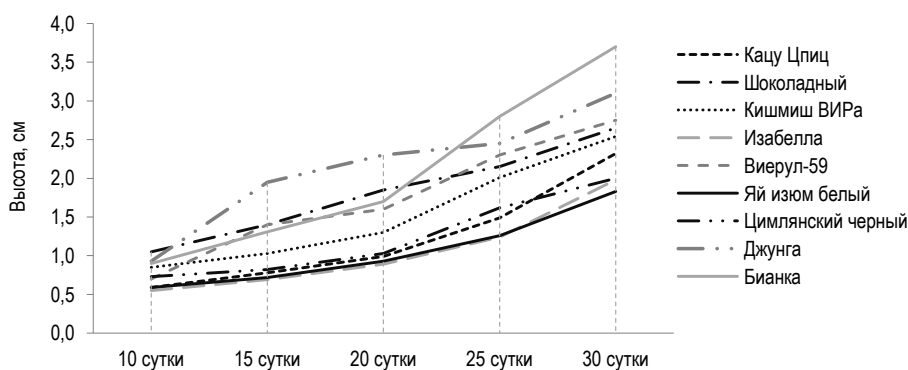


Рис. Динамика развития регенерирующих побегов винограда в культуре *in vitro* на 10–30-е сутки

Fig. Development dynamics of regenerated grape shoots in the culture *in vitro* on the 10th–30th day

ностью к ускоренному микроразмножению для получения большего количества материала на отработку методики криохранения образцов генофонда ВИР.

Источник финансирования

Не указан.

Financing source

Not specified.

Конфликт интересов

Не заявлен.

Conflict of interests

Not declared.

Список литературы

1. Tanner J. D., Chen K.Y., Bonnart R.M., Minas I.S., Volk G.M. Consideration for large-scale implementation of dormant budwood cryopreservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PSTOC)*. 2021;144:35-48. DOI 10.1007/

s11240-020-01884-5.

2. Ухатова Ю.В., Гавриленко Т.А. Методы криоконсервации вегетативно размножаемых культурных растений // *Биотехнология и селекция растений*. 2018;1(1):52-63. DOI 10.30901/2658-6266-2018-1-52-63.

3. Verzhuk V., Pavlov A., Novikova L.Yu., Filipenko G. Viability of red (*Ribes rubrum* L.) and black (*Ribes nigrum* L.) currant cuttings in field conditions after cryopreservation in vapors of liquid nitrogen. *Agriculture*. 2020;10:476. DOI 10.3390/agriculture10100476.

4. Кислин Е.Н., Носульчак В.А., Дзюбенко Н.И. Ампелогографическая коллекция ВИР им. Н.И. Вавилова. Прошлое, настоящее и будущее // «Магарач». *Виноградарство и виноделие*. 2015;3:14-16.

5. Волынкин В.А., Зленко В.А., Олейников Н.П., Лиховской В.В., Модонкаева А.З. Морозоустойчивость генетически рознородного генофонда винограда различных ботанических таксонов // «Магарач». *Виноградарство и виноделие*. 2012;1:2-4.

6. Наумова Л.Г., Ганич В.А. Из истории ампелогографической коллекции ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко // «Магарач». *Виноградарство и виноделие*. 2015;(3):2-4.

7. Заварихина Е.А., Ситников М.Н. Анализ жизнеспособности красной смородины в условиях *in vitro* // *NovalInfo*. 2019;105:7-8.

8. Медведева Н.И., Поливарова Н.В., Трошин Л.П. Методические рекомендации по микроклональному размножению

- винограда *in vitro* // Научный журнал КубГАУ. 2010;62(8): 314-326.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15:473-497. DOI 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
10. Sedlak J., Paprstein F. *In vitro* establishment and proliferation of red currant cultivar 'Detvan'. *Acta Horticulturae*. 2012;946:387-390. DOI 10.17660/ActaHortic.2012.946.

References

1. Tanner J.D., Chen K.Y., Bonnart R.M., Minas I.S., Volk G.M. Consideration for large-scale implementation of dormant budwood cryopreservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2021;144:35-48. DOI 10.1007/s11240-020-01884-5.
2. Ukhatova Yu.V., Gavrilenko T.A. Cryoconservation methods for vegetatively propagated crops. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2018;1(1):52-63. DOI 10.30901/2658-6266-2018-1-52-63 (*in Russian*).
3. Verzhuk V., Pavlov A., Novikova L.Yu., Filipenko G. Viability of red (*Ribes rubrum* L.) and black (*Ribes nigrum* L.) currant cuttings in field conditions after cryopreservation in vapors of liquid nitrogen. *Agriculture*. 2020;10:476. DOI 10.3390/agriculture10100476.

4. Kislin E.N., Nosulchak V.A., Dzyubenko N.I. Ampelographic collection of the Vavilov Institute: past, present and future. *Magarach. Viticulture and Winemaking*. 2015;3:14-16 (*in Russian*).
5. Volynkin V.A., Zlenko V.A., Oleinikov N.P., Likhovskoi V.V., Modonkayeva A.E. Frost resistance of genetically diverse grape genofond belonging to different botanical taxons. *Magarach. Viticulture and Winemaking*. 2012;1:2-4 (*in Russian*).
6. Naumova L.G., Ganich V.A. Past and present of ampelographical collections of ARRIV&W. *Magarach. Viticulture and Winemaking*. 2015;(3):2-4 (*in Russian*).
7. Zavarikhina E.A., Sitnikov M.N. Analysis of red currant viability under *in vitro* conditions. *NovaInfo*. 2019;105:7-8 (*in Russian*).
8. Medvedeva N.I., Polivara N.V., Troshin L.P. Methodical recommendation on microclonal propagation of *in vitro* grape variety. *Scientific Journal of Kuban State Agrarian University*. 2010;62:314-326 (*in Russian*).
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15:473-497. DOI 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
10. Sedlak J., Paprstein F. *In vitro* establishment and proliferation of red currant cultivar 'Detvan'. *Acta Horticulturae*. 2012;946:387-390. DOI 10.17660/ActaHortic.2012.946.

Информация об авторах

Владимир Григорьевич Вержук, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории длительного хранения генофонда растений; e-мэйл: vverzhuk@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6891-6272>;

Мария Викторовна Ерастенкова, аспирант, ведущий специалист лаборатории длительного хранения генофонда растений; e-мэйл: merastenkova@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-7328-437X>;

Анна Андреевна Хохленко, бакалавр, лаборант-исследователь лаборатории длительного хранения генофонда растений; e-мэйл: annhohlenko@yandex.ru;

Магамедгусейн Магамедганифович Агаханов, канд. биол. наук, науч. сотр. отдела плодовых культур; e-мэйл: m.agahanov@vir.nw.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2438-9156>;

Евгений Николаевич Кислин, канд. биол. наук, науч. сотр. отдела плодовых культур; e-мэйл: kislin@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1832-894x>;

Юлия Васильевна Ухатова, канд. биол. наук, зав. ЦКП «Лаборатория искусственного выращивания и оздоровления генофонда растений», зам. директора по научно-организационной работе; e-мэйл: y.ukhatova@vir.nw.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9366-0216>.

Information about authors

Vladimir G. Verzhuk, Cand. Biol. Sci., Senior Staff Scientist, Laboratory of Plant Genetic Diversity Long-Term Storage; e-mail: vverzhuk@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6891-6272>;

Maria V. Erastenkova, Postgraduate Student, Leading Specialist, Laboratory of Plant Genetic Diversity Long-Term Storage; e-mail: merastenkova@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-7328-437X>;

Anna A. Khokhlenko, Bachelor of Science, Laboratory Research Assistant, Laboratory of Plant Genetic Diversity Long-Term Storage; e-mail: annhohlenko@yandex.ru;

Magamedgusein M. Agahanov, Cand. Biol. Sci., Staff Scientist, Department of Fruit Crops; e-mail: m.agahanov@vir.nw.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2438-9156>;

Evgeny N. Kislin, Cand. Biol. Sci., Staff Scientist, Department of Fruit Crops; e-mail: kislin@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1832-894x>;

Yulia V. Ukhatova, Cand. Biol. Sci., Head of the Laboratory of Artificial Growing and Health Improvement of Plant Genetic Diversity, Deputy Director for Scientific and Organizational Work; e-mail: y.ukhatova@vir.nw.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9366-0216>.

Статья поступила в редакцию 29.07.2022, одобрена после рецензии 17.08.2022, принята к публикации 30.08.2022.