

## Особенности применения углеводов для создания коллекции винограда *in vitro*

Пузырнова В.Г.<sup>✉</sup>, Дорошенко Н.П.

Всероссийский научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия имени Я.И. Потапенко – филиал ФГБНУ «Федеральный Ростовский аграрный научный центр», Россия, 346421, Ростовская область, г. Новочеркасск, пр. Баклановский, 166

<sup>✉</sup>valentina.puzirnova@yandex.ru

**Аннотация.** Виноград обладает богатым генетическим разнообразием и традиционно хранится в генбанках, главным образом в виде полевых коллекций, содержание которых дорого и ненадежно, т.к. насаждения могут быть потеряны в результате биологических или экологических катастроф. Принимая во внимание то, что многие сорта — это незаменимый ресурс для виноделия, часть национального наследия и культуры, методы сохранения разнообразия рода *Vitis* должны быть дополнены коллекциями *in vitro*. Вопрос о производстве оздоровленного посадочного материала не перестает быть актуальным. Среди способов воспроизводства растений лидирующее место по преимуществам занимает метод клонального микроразмножения растений. В статье представлены результаты исследований по влиянию различных источников углеводов в питательных средах на развитие растений сортов винограда Каберне-Совиньон и Фиолетовый ранний. Углеводы в культуральных средах играют роль основного питания растений, а также влияют на осмотические характеристики жидкости, что можно использовать для регулирования интенсивности протекания физиологических процессов. Исследования проведены в 2018-2022 гг. на растениях винограда из коллекции *in vitro* лаборатории биотехнологии Всероссийского научно-исследовательского института виноградарства и виноделия имени Я.И. Потапенко. Изучены особенности роста и развития растений винограда сортов Каберне-Совиньон и Фиолетовый ранний на культуральных средах с разными источниками углеводов – сахароза, фруктоза, сорбит в диапазоне концентраций 5-60 г/л. Определены параметры применения углеводов, позволяющих стимулировать и минимизировать скорость роста растений винограда. Полученные результаты позволяют усовершенствовать биотехнологию создания и содержания коллекций винограда *in vitro*. Максимальные показатели сохранности и продолжительности нахождения в культуре зафиксированы у растений на среде с сорбитом (93 % и 316 дней культивирования). Фруктоза способствовала активному ризогенезу и может быть использована при клональном микроразмножении трудноукореняемых сортов.

**Ключевые слова:** виноград; *in vitro*; клональное микроразмножение; питательные среды; сахароза; сорбит; фруктоза; концентрации; депонирование.

**Для цитирования:** Пузырнова В.Г., Дорошенко Н.П. Особенности применения углеводов для создания коллекции винограда *in vitro* // «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2023;25(1):14-23. DOI 10.34919/IM.2023.25.1.002.

ORIGINAL RESEARCH

## Application features of using carbohydrates to create a collection of grapes *in vitro*

Puzirnova V.G.<sup>✉</sup>, Doroshenko N.P.

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

<sup>✉</sup>valentina.puzirnova@yandex.ru

**Abstract.** Grapevine has a rich genetic diversity and is traditionally stored in genebanks, mainly in the form of field collections. The maintenance of field plantings is expensive and unreliable, because plantings can be lost as a result of biological or environmental disasters. Taking into account that many varieties are an indispensable resource for winemaking and a part of the national heritage and culture, methods of preserving the diversity of *Vitis* genus should be supplemented with *in vitro* collections. The issue of production healthy planting material does not cease to be relevant. Among the methods of plant reproduction, the leading place is occupied by the method of clonal micro-propagation of plants. The paper presents the results of research on the influence of various sources of carbohydrates in nutrient media on the development of grapevine cultivars 'Cabernet-Sauvignon' and 'Fioletovyi Ranniy'. Carbohydrates in culture media play the role of main plant nutrition, and also affect the osmotic characteristics of the liquid, which can be used to regulate the intensity of physiological processes. The research was carried out in 2018–2022 on the collection of grapevine plants *in vitro* at the All-Russian Research Institute for Viticulture and Winemaking named after Ya.I. Potapenko. The features of growth and development of 'Cabernet-Sauvignon' and 'Fioletovyi Ranniy' grapevines on culture media with different sources of carbohydrates – sucrose, fructose and sorbitol in the concentration range of 5-60 g/l were studied. The parameters of using carbohydrates were determined to stimulate and minimize the growth rate of grapevine plants. The results obtained will allow improving the biotechnology of creating and maintaining grapevine collections *in vitro*. The maximum indicators of preservation and duration of keeping in culture were recorded in plants on a medium with sorbitol (93 % and 316 days of cultivation). Fructose promoted active rhizogenesis and could be used for clonal micro-propagation of hard-to-root cultivars.

**Key words:** grapevine; *in vitro*; clonal micro-propagation; nutrient media; sucrose; sorbitol; fructose; concentrations; deposit.

**For citation:** Puzirnova V.G., Doroshenko N.P. Application features of using carbohydrates to create a collection of grapes *in vitro*. Magarach. Viticulture and Winemaking. 2023;25(1):14-23. DOI 10.34919/IM.2023.25.1.002 (*in Russian*).

## Введение

Разработка эффективных методов микроклонального размножения является основой и необходимостью для создания генетических банков *in vitro* [1]. Сегодня во всем мире ведется работа по формированию банков каллусных, суспензионных, меристематических культур, культуры семяпочек, пыльников и пыльцы, криосохранение растительных тканей [2-6].

Виноград входит в число наиболее важных плодовых культур, выращиваемых и потребляемых во всем мире.

Восстановление и сохранение генетического разнообразия местных сортов вызывает огромный интерес в районах виноградарства по всему миру. Коллекции винограда *in vitro* позволяют не просто собирать и хранить генетически ценный материал, но и производить обмен генетическими ресурсами на международном уровне – основополагающие компоненты международных продовольственных программ. Сегодня обмен материалом *in vitro* активно развивается [7].

По всему миру ведутся исследования по разработке и совершенствованию протоколов введения в культуру *in vitro* и эффективного содержания в коллекции ценных сортов. Особенности роста и развития растений в культуре *in vitro* сортоспецифичны, что отмечено большинством исследователей в этой области [8-10], поэтому единства приемов быть не может – необходим сортоориентированный подход.

Стратегия получения мериклонов и их хранения *in vitro* является на сегодняшний день практически единственным надежным способом для оздоровления вегетативно размножаемых растений и сохранения свободных от фитопатогенов образцов.

Один из методических подходов к депонированию – содержание биологических объектов в условиях замедленного их метаболизма.

Среди биотехнологических методов создания условий для замедленного роста – применение осмотиков. Осмотики – вещества, имитирующие для растения недостаток влаги. Действие водного стресса на растение выражается в снижении скорости ростовых процессов и ферментной активности, угнетении фотосинтеза и дыхания, изменении соотношения минеральных веществ.

Углеводы в питательной среде являются источником энергии для культивируемых растений и основным осмотическим агентом.

Сахароза – источник углерода, традиционно используемого для размножения *in vitro*, поскольку он является преобладающим углеводом в соке флоэмы большинства видов растений. Относительно универсальными концентрациями сахарозы являются 10–40 г/л [11].

Ингибирующее действие сахаров апробировано при исследовании многих видов растений в культуре *in vitro* [12-13], ведутся такие исследования и на винограде [14].

Однако некоторые ученые для ряда культур предлагают альтернативные источники углеводного пита-

ния в качестве более эффективного заменителя сахарозы. Представлены результаты опытов по изучению влияния различных источников углеводного питания (сахарозы, глюкозы, мальтозы или фруктозы в концентрации 0,05 и 0,1 моль/л) на ризогенез микрочеренков ягодных культур: малины обыкновенной, жимолости, ежевики [15]. Максимальная частота укоренения получена на средах с сахарозой и мальтозой. Минимальное количество микрочеренков укоренилось на средах с глюкозой (43,9–48,3 %). На средах с фруктозой частота укоренения была практически одинаковой при разных концентрациях углевода.

Исследователи отмечают роль фруктозы в сохранении генетической стабильности. Использование фруктозы в качестве источника углерода в среде для укоренения в количестве 10000–20000 мг/л или смеси фруктозы и сахарозы в соотношении 0,5–1:1 уменьшает структурные и количественные изменения хромосом. Число клеток с нормальным кариотипом возрастает. Растения-регенеранты, полученные по предлагаемому способу, в условиях защищенного грунта опережают в своем развитии контрольные растения и характеризуются повышенной продуктивностью [16].

Изучение сорбита в роли источника питания и осмотически активного вещества ведется на многих культурах. В исследованиях на персике сорбит выделен как лучший источник питания, положительно влияющий на ризогенез в сравнении с сахарозой [17].

В исследованиях на винограде установлено замедление ростовых процессов в сравнении с сахарозой [18].

В работе Ritterbusch et al. (2020) отмечают лучшее развитие корневой системы на сахарозе по сравнению с сорбитом, причем, чем выше концентрация, тем лучше развита ризогенная зона. В то время как на сорбите с повышением концентрации происходит уменьшение длины и количества корней [19].

Разночтения в рекомендуемых углеводах и их концентрациях, а также сортовая специфичность и цели культивирования оставляют этот вопрос открытым.

**Целью исследования** было определить особенности роста растений винограда на культуральных средах с различными источниками углеводного питания – сахароза, фруктоза, сорбит.

## Материалы и методы исследования

Исследования проводились по общепринятым в биотехнологии методикам Ф.Р. Уайта (1949), Р.Г. Бутенко (1964), Голодрига П.Я. и др. (1986), Н.П. Дорошенко (2012, 1992); Б.А. Доспехова (1965) в лаборатории биотехнологии Всероссийского научно-исследовательского института виноградарства и виноделия имени Я.И. Потапенко – филиал ФГБНУ ФРАНЦ. Все работы в лаборатории биотехнологии проведены с соблюдением строгой стерильности. Материалом исследования были растения *in vitro* сортов винограда Фиолетовый ранний и Каберне-Совиньон.

Для опытов отбирали растения, регенерированные из апикальных меристем размером 0,1–0,2 мм и размноженные в культуре *in vitro*. В операционной комнате в ламинарном боксе «Фортран» осуществ-

вляли микрочеренкование растений. Длина микрочеренка 10–12 мм, 1–2 мм над глазком, остальные – под глазком. Полученные микрочеренки высаживали по одному в пробирку на твердую питательную среду Мурасиге и Скуга следующего состава (мг/л):

– макроэлементы  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 138,  $\text{KNO}_3$  – 950,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) – 185,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 68,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 166;

– микроэлементы  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 6,2,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) – 22,3,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,025,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,025,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 8,6,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  – 0,25, KJ – 0,83;

– хелат железа: железо сернокислое 7-водное- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ –27.8, трилон-Б- $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ –37.3;

– витамины-мезоинозит-50, тиамин HCl-0,2;

– ИУК-0,1-3.

pH среды перед автоклавированием 5,7–5,9.

В состав питательной среды вводили сахарозу, сорбит, фруктозу в количестве 5, 10, 20, 40, 60 г/л. Контролем была среда с содержанием сахарозы 20 г/л. В каждом варианте опыта было 3 повторности, в повторности 14 растений.

Культивирование осуществляли в культуральной комнате при освещенности 3,0 тыс. люксов, фотопериоде – 16/8 ч, температуре 25–27±2 °С, влажности воздуха 70–75 %.

Показатели, учитываемые при регенерации и сохранении растений: приживаемость, гибель от инфекции, гибель из-за отсутствия развития, число корней, длина корней, средняя длина корня, ризогенная зона, длина побега, количество листьев всего и на 1 см побега, скорость роста, коэффициент полярности.

Жизнеспособность растений оценивали по количеству некротов тканей листьев и побегов: 0 баллов – визуальная гибель растения, 1 балл – некроз более 50 % тканей растения, 2 балла – некроз менее 50 % тканей, 3 балла – растения без некроза.

Статистическая обработка выполнена при 95 % уровне доверительной вероятности по методике Б.А. Доспехова (1985). Для оценки адекватности полученных данных использовали критерий Фишера (F).

### Результаты и их обсуждение

Ранее в лаборатории биотехнологии проведено исследование различных источников углеводного питания. Было установлено, что они сильно отличаются по способности поддерживать рост изолированных растений винограда. При использовании гексоз наблюдалось отсутствие развития у 44,1 % растений, при применении олигосахаров не развилось 51,8 % растений, сахароспиртов – 84,5 %. Однако внутри этих групп отдельные углеводы отличаются по степени влияния на рост изолированных растений винограда.

Полученные результаты подтверждают представление о сахарозе как лучшем субстрате для роста изолированных культур, в частности для культуры винограда *in vitro*. Это определяется рядом структурных особенностей сахарозы, обеспечивающих высокий энергетический потенциал и защищенность ее главных реакционноспособных связей, и является той ос-

новой, которая определяет особое положение сахарозы и её чрезвычайно важную роль для растений.

Однако в условиях преобладающей цели длительного депонирования в культуре *in vitro* сахароза может уступать, т.к. обеспечивает интенсивный рост растений. В связи с этим необходим подбор концентраций, минимизирующих рост, и дальнейшее изучение других источников углеводов.

**Сахароза.** Опыт по изучению влияния концентраций сахарозы на рост и развитие растений винограда был заложен на сорте Фиолетовый ранний. В опыте следует отметить высокую приживаемость микрочеренков, отсутствие гибели растений от инфекции (табл. 1).

Гибель микрочеренков и растений, низкая при культивировании в течение 1,5–3 месяцев (3,6–10,7 %), увеличилась при культивировании в течение 4–5 месяцев до 17,9–35,7 %. Приживаемость растений в опыте сохранилась на высоком уровне. По вариантам опыта она колебалась от 64,3 до 82,1 %. Самая высокая приживаемость отмечена при концентрации 60 г/л – 82,1 %; в контроле 75,0 %.

Увеличение содержания сахарозы в питательной среде до 40–60 г/л способствовало увеличению числа корней, их длины и, как следствие, увеличению ризогенной зоны в 1,7–1,9 раза. При минимальной концентрации длина ризогенной зоны уменьшилась. Аналогичным образом изменилась и высота и облиственность растений – увеличилась при концентрации 60 г/л и уменьшилась при концентрации 5 г/л. Таким образом, при концентрации сахарозы в питательной среде 5 г/л наблюдается торможение ростовых процессов.

Самая высокая приживаемость после 10 месяцев наблюдений отмечена в варианте с концентрацией 60 г/л. Наиболее развитая ризогенная зона на протяжении всего эксперимента у растений в варианте с концентрацией 40 г/л, а высота – в варианте 60 г/л. Скорость роста с увеличением концентрации также увеличилась.

**Сорбит.** Опыт по изучению сорбита заложен на растениях сорта Каберне-Совиньон в диапазоне концентраций сорбита 5–60 г/л (табл. 2). Контролем была принята среда с содержанием сахарозы 20 г/л. На протяжении 10 месяцев наблюдений в вариантах с сорбитом отсутствует гибель растений от инфекции, которая наблюдается, начиная с 4-го месяца культивирования, лишь в контрольном варианте. Начиная с 9-го месяца культивирования, длину корней и их количество не измеряли из-за сильно развитой ризогенной зоны и переплетения корней.

Стопроцентная сохранность растений отмечена в течение первых 3 месяцев культивирования. Начиная с 4-го месяца, в вариантах с концентрацией сорбита 10 и 30 г/л происходит незначительная гибель растений из-за усыхания. В варианте с концентрацией сорбита 60 г/л погибло 71,4 % по этой же причине. В дальнейшем при культивировании в течение 7 месяцев увеличилась гибель растений при концентрации сорбита 30 г/л. С увеличением продолжительности

**Таблица 1.** Влияние сахарозы на рост и развитие микрочеренков сорта Фиолетовый ранний, 2018–2019 гг.  
**Table 1.** The effect of sucrose on the growth and development of micro-cuttings of 'Fioletovyi Ranni' cultivar, 2018–2019

Концентрация, г/л	Гибель, %	Приживаемость, %	Корни			Длина побега, см	Число листьев, шт.		Скорость роста, мм/сутки
			число, шт.	средняя длина, см	ризогенная зона, см		всего	на 1 см побега	
<b>50 дней культивирования</b>									
Контроль 20	0	100	1,1	3,9	4,3	2,7	2,2	0,8	0,5
5	0	100	1,5	1,9	2,9	2,3	2,2	1,0	0,5
40	0	100	1,5	4,6	6,9	3,0	2,6	0,9	0,6
60	3,6	96,4	1,0	5,2	5,2	3,2	2,9	0,9	0,6
НСР <sub>0,95</sub>			–	0,3		–			
<b>120 дней культивирования</b>									
Контроль 20	17,9	82,1	1,1	4,9	5,4	10,8	9,9	0,9	0,9
5	21,4	78,6	1,5	2,2	3,3	6,5	8,0	1,2	0,5
40	28,6	71,4	1,7	5,6	9,5	11,9	11,9	1,0	1,0
60	10,7	89,3	1,2	6,6	7,9	12,2	10,2	0,8	1,0
НСР <sub>0,95</sub>			–	0,7		2,5			
<b>165 дней культивирования</b>									
Контроль 20	25,0	75,0	1,1	4,9	5,4	13,1	12,3	0,9	0,8
5	25,0	75,0	1,7	2,6	4,4	8,1	10,9	1,3	0,5
40	35,7	64,3	1,6	6,4	10,2	13,6	12,7	0,9	0,8
60	17,9	82,1	1,3	7,1	9,2	14,6	11,8	0,8	0,9
НСР <sub>0,95</sub>			–	2,3		2,3			
<b>205 дней культивирования</b>									
Контроль 20	42,9	51,7	1,1	4,6	5,1	15,2	13,0	0,9	0,7
5	57,1	42,9	1,6	2,5	4,0	10,7	12,5	1,2	0,5
40	57,1	42,9	1,6	5,2	8,3	15,3	13,6	0,9	0,7
60	35,7	64,3	1,2	6,2	7,4	15,8	13,1	0,8	0,8
НСР <sub>0,95</sub>			–	1,4		1,6			
<b>268 дней культивирования</b>									
Контроль 20	42,9	57,1	1,1	4,6	5,1	15,9	15,6	1,0	0,6
5	57,1	42,9	1,6	3,1	5,0	10,7	18,0	1,7	0,4
40	60,7	39,3	1,7	4,6	7,8	15,7	18,5	1,2	0,6
60	53,6	46,4	1,4	5,4	7,6	16,0	16,2	1,0	0,6
НСР <sub>0,95</sub>			0,2	1,6		1,4			
<b>301 день культивирования</b>									
Контроль 20	46,4	53,6	1,1	4,7	5,2	16,2	15,0	0,9	0,5
5	57,1	42,9	1,6	3,1	5,0	11,5	15,2	1,3	0,4
40	67,9	32,1	1,6	5,3	8,5	16,2	16,6	1,0	0,5
60	53,6	46,4	1,5	7,6	11,4	17,0	16,2	1,0	0,6
НСР <sub>0,95</sub>			–	1,4		2,3			

хранения гибель растений в этих вариантах возросла. Сохранность растений после 10 месяцев хранения проиллюстрирована на рис. 1.

Максимальная сохранность отмечена в варианте 7,5 г/л – 92,9 % (контроль 64,3). В варианте 10,0 г/л сохранность была на уровне контрольной. Необходи-

мо отметить вариант с концентрацией 30 г/л, где сохранность хоть и была несколько ниже контрольной, но в совокупности с явным торможением ростовых процессов может быть оправдана для применения при хранении растений в коллекции.

Интенсивность ростовых процессов в вариантах с

**Таблица 2.** Влияние препарата сорбит на показатели развития растений сорта Каберне-Совиньон в процессе длительного хранения, 2019–2020 гг.**Table 2.** The effect of sorbitol on the development indicators of 'Cabernet-Sauvignon' grapevine plants during long-term storage, 2019–2020

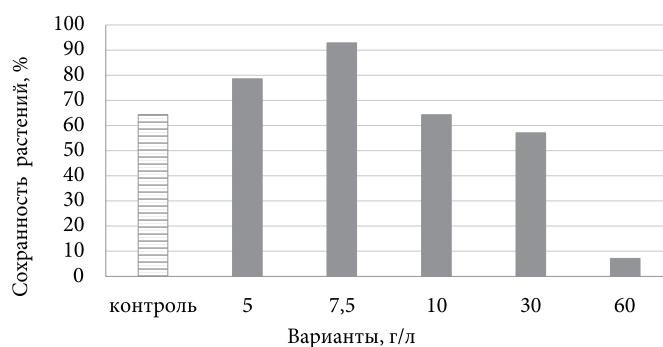
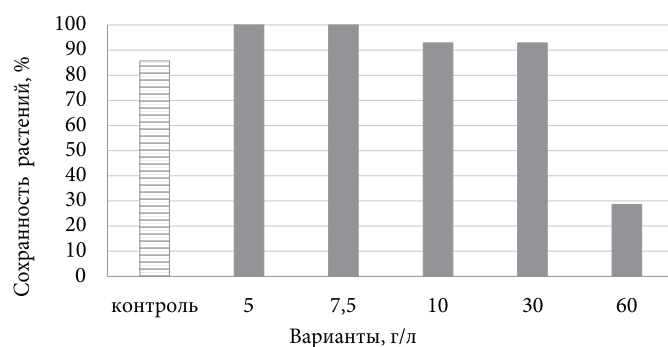
Вариант, г/л	Гибель, %		Сохранившихся жизнеспособных растений, %	Корни			Длина побега, см	Число ли- стьев на 1 см побега, шт.	Скорость роста, мм/сутки
	ГИ*	ОР*		число, шт.	средняя длина, см	ризогенная зона, см			
<b>30 дней культивирования</b>									
контроль	0	0	100	3,6	1,0	3,6	1,5	1,1	0,5
5	0	0	100	3,6	0,4	1,4	1,1	1,5	0,4
7,5	0	0	100	3,6	0,4	1,4	1,0	1,1	0,3
10	0	0	100	2,8	0,6	1,7	0,8	1,6	0,3
30	0	0	100	2,4	0,6	1,4	0,2	2,5	0,1
60	0	0	100	2,3	0,5	1,2	0,1	1,0	0
<b>115 дней культивирования</b>									
контроль	14,3	0,0	85,7	4,7	2,1	9,9	8,8	0,9	0,8
5	0	0,0	100	4,9	1,5	7,4	8,6	1,0	0,7
7,5	0	0,0	100	4,4	1,5	6,6	7,9	1,0	0,7
10	0	7,1	92,9	4,3	1,6	6,9	5,3	1,4	0,5
30	0	7,1	92,9	4,1	1,7	7,0	3,5	1,7	0,3
60	0	71,4	28,6	3,0	1,7	5,1	1,8	1,9	0,2
<b>218 дней культивирования</b>									
контроль	14,3	7,1	78,6	4,9	2,4	11,8	8,8	1,0	0,4
5	0	0	100	6,2	2,2	13,6	9,0	1,4	0,4
7,5	0	0	100	5,7	2,0	11,4	10,3	1,2	0,5
10	0	7,1	92,9	4,9	2,5	12,3	7,2	1,5	0,3
30	0	21,4	78,6	4,6	3,4	15,6	4,4	1,8	0,2
60	0	71,4	28,6	3,5	2,8	9,8	2,6	2,2	0,1
<b>252 дня культивирования</b>									
контроль	14,3	14,3	71,4	5,2	3,0	15,6	8,5	1,0	0,3
5	0	0	100	5,6	2,5	14,0	9,3	1,3	0,4
7,5	0	0	100	5,4	2,3	12,4	10,3	1,2	0,4
10	0	7,1	92,9	5,0	2,6	13,0	7,7	1,3	0,3
30	0	28,6	71,4	4,9	3,2	15,7	4,9	1,6	0,2
60	0	85,7	14,3	4,0	2,3	9,2	3,4	1,9	0,1
<b>316 дней культивирования</b>									
контроль	14,3	21,4	64,3	–	–	–	9,0	0,9	0,3
5	0	21,4	78,6	–	–	–	9,9	1,3	0,3
7,5	0	7,1	92,9	–	–	–	9,7	1,3	0,3
10	0	28,6	64,3	–	–	–	9,0	1,1	0,3
30	0	42,9	57,1	–	–	–	6,2	1,4	0,2
60	0	92,9	7,1	–	–	–	3,5	1,7	0,1

*Примечание.* \*ГИ - гибель от инфекции; \*ОР - отсутствие развития

сорбитом на протяжении всего периода культивирования замедлена. Особенно явно это видно при повышенных концентрациях сорбита. На протяжении первых 3 месяцев отмечалось уменьшение числа кор-

ней, длины ризогенной зоны, длины побега.

По сравнению с контрольным вариантом длина побега на среде с сорбитом меньше на 0,4–1,1 см, величина ризогенной зоны в 2–3 раза меньше. Уве-



**Рис. 1.** Сохранность растений винограда сорта Каберне-Совиньон: А – 5 месяцев культивирования, Б – 10 месяцев культивирования

**Fig. 1.** Preservation of 'Cabernet-Sauvignon' grapevine plants: A - 5 months of cultivation, B - 10 months of cultivation

личение ризогенной зоны отмечено лишь на 7–8-й месяц культивирования при концентрации сорбита 10–30 г/л.

При концентрациях сорбита 10 и 30 г/л, начиная с 5 месяцев хранения растений, увеличивалась длина ризогенной зоны, за счет этого снизилась интенсивность роста растений, происходило подсыхание растений и их гибель. Наибольшее угнетение и гибель растений отмечены при концентрации 60 г/л.

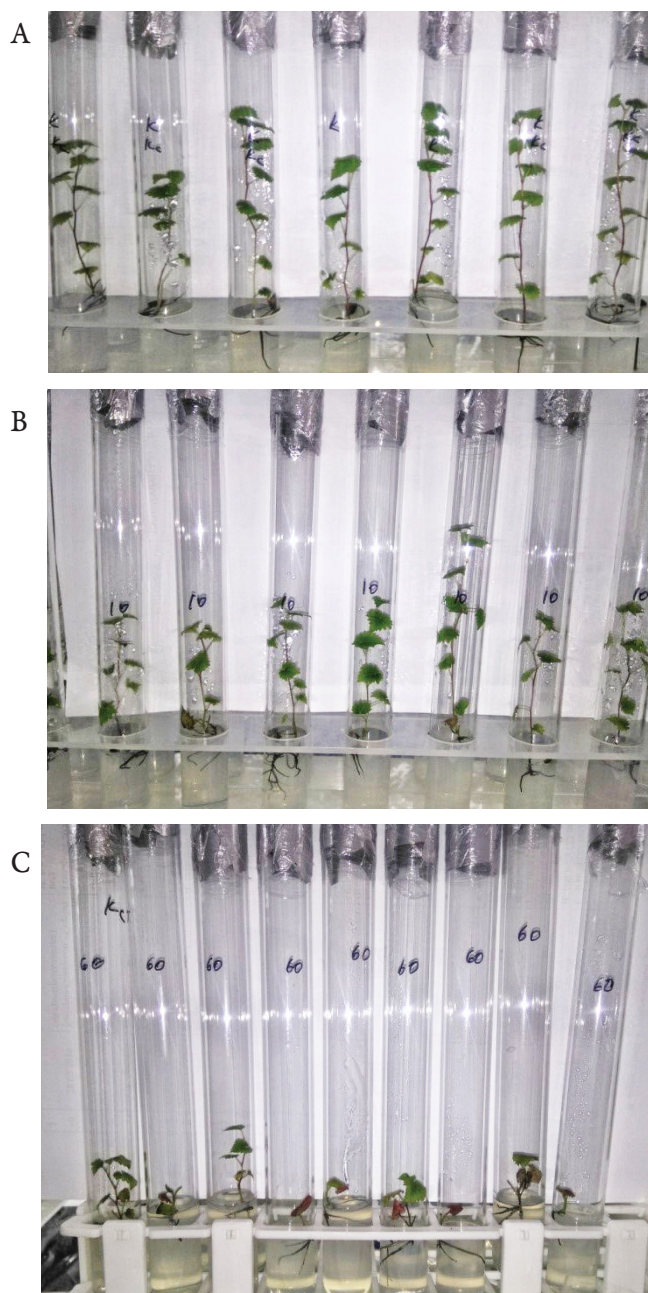
Начиная с 5-го месяца культивирования (рис. 1), отмечено увеличение роста растений при концентрации 5 г/л и, особенно, 7,5 г/л. В вариантах с концентрацией 10, 30 и 60 г/л наблюдалось торможение ростовых процессов в течение всего периода культивирования. Минимальная длина побега зафиксирована в варианте с наибольшей концентрацией сорбита – 60 г/л (рис. 2).

Выявлено увеличение длины ризогенной зоны, начиная с 5 месяцев культивирования, в вариантах с концентрацией сорбита 10 г/л и, особенно, 30 г/л, что сопровождалось снижением роста растений в этих вариантах, то есть произошел сдвиг соотношения побег/корень в сторону корней и возрос коэффициент полярности. Положительного влияния на сохранность жизнеспособных растений это не оказало.

При концентрации сорбита 60 г/л положение усугубилось слабым развитием ризогенной зоны. Сохранность растений в этом варианте после 10 месяцев наблюдений была низкой – 7,1 %, что почти в 10 раз ниже контрольного варианта. Данные показатели свидетельствуют о том, что большая концентрация сорбита является неприемлемой для использования в целях сохранения растений в вегетирующей коллекции с замедленным ростом.

Таким образом, помимо ингибирующей роли сорбита при концентрациях 10, 30 и 60 г/л нами выявлено стимулирование ростовых процессов при минимальных концентрациях препарата 5 и, особенно, 7,5 г/л, которое можно рекомендовать при массовом тиражировании мериклонов.

Анализ экспериментального материала дает основание считать, что сорбит может быть успешно применен в составе питательных сред для регулирования скорости ростовых процессов при культивировании *in vitro*, как для массового тиражирования оздоров-



**Рис. 2.** Состояние растений на питательной среде: А – контроль, сахароза, 20 г/л; В – сорбит, 10 г/л; С – сорбит, 60 г/л

**Fig. 2.** Condition of plants on nutrient medium: A – control, sucrose, 20 g/l; B – sorbitol, 10 g/l; C - sorbitol, 60 g/l

**Таблица 3.** Влияние фруктозы на рост и развитие микрочеренков сорта Фиолетовый ранний, 2019–2020 гг.  
**Table 3.** The effect of fructose on the growth and development of micro-cuttings of 'Fioletovyi Ranniy' cultivar, 2019–2020

Вариант, г/л	Гибель, %	Приживаемость, %	Корни			Длина побега, см	Число листьев на 1 см побега, шт.	Скорость роста, мм/сутки	Коэффициент полярности
			число, шт.	средняя длина, см	ризогенная зона, см				
<b>60 дней культивирования</b>									
Контроль	3,3	96,7	1,9	2,4	4,6	2,7	1,0	0,5	1,8
5	0	100	2,0	1,8	3,6	2,8	1,1	0,5	1,2
10	6,7	93,3	1,9	2,3	4,4	2,1	1,0	0,4	2,1
20	0	100	2,2	2,6	5,7	1,4	1,2	0,2	4,5
40	26,7	73,3	2,6	1,7	4,4	0,4	0,5	0,1	11,9
60	93,3	6,7	1,3	0,8	1,0	0	0	0	0
НСР <sub>0,95</sub>			–	2,2		1,1			
<b>120 дней культивирования</b>									
Контроль	3,3	96,7	2,0	3,4	6,8	7,8	0,9	0,7	0,9
5	0	100	1,9	3,0	5,7	6,9	1,0	0,6	0,8
10	6,7	93,3	2,0	3,3	6,6	5,8	1,1	0,5	1,2
20	0	100	2,0	4,4	8,8	4,0	1,0	0,3	2,1
40	26,7	73,3	2,3	3,3	7,6	2,0	1,5	0,2	6,3
60	96,7	5,3	1,4	0,7	1,0	0	0	0	6,3
НСР <sub>0,95</sub>			–	3,7		1,3			
<b>180 дней культивирования</b>									
Контроль	13,3	86,7	2,0	3,7	7,4	13,8	0,9	0,8	0,6
5	16,7	83,3	1,8	3,0	5,4	12,4	1,1	0,7	0,4
10	40,0	60,0	2,0	3,1	6,2	14,0	0,9	0,8	0,4
20	40,0	60,0	2,1	5,5	11,6	11,9	1,1	0,7	0,9
40	76,7	23,3	1,7	2,4	4,1	7,0	1,0	0,4	0,6
60	96,7	3,3	1,3	0,4	0,5	0,8	1,1	0	0,7
НСР <sub>0,95</sub>			–	1,7		1,5			
<b>210 дней культивирования</b>									
Контроль	13,3	86,7	2,1	3,8	8,0	13,9	0,9	0,7	0,6
5	16,7	83,3	2,0	3,0	6,0	14,6	1,0	0,7	0,3
10	40,0	60,0	1,9	3,4	6,5	14,6	1,0	0,7	0,4
20	40,0	60,0	2,3	5,2	12,0	13,0	1,1	0,6	0,9
40	76,7	23,3	1,9	2,9	5,5	7,3	1,1	0,3	0,8
60	96,7	3,3	1,3	0,4	0,5	1,0	0,9	0	0,6
НСР <sub>0,95</sub>			–	1,7		4,4			

ленного посадочного материала, так и для создания генетической коллекции винограда *in vitro*.

**Фруктоза.** Опыт по изучения действия фруктозы на приживаемость и развитие микрочеренков

растений был заложен на сорте Фиолетовый ранний (табл. 3). Контролем в этом опыте была взята сахароза в концентрации 20 г/л.

В течение первых 4 месяцев культивирования

приживаемость микрочеренков и сохранность микрорастений была выше в вариантах с фруктозой в количестве 5, 10, 20 г/л. Резкое снижение приживаемости произошло при концентрации фруктозы 60 г/л. В этом варианте приживаемость с 1-го месяца культивирования и на протяжении всего опыта была низкая (6,7–3,3 %). Через 6 месяцев культивирования растения во всех вариантах опыта приостановились в росте, листья пожелтели и высохли, произошла их гибель.

На графике видно, что лучшая сохранность растений в течение 7 месяцев культивирования выявлена на среде с сахарозой (контроль) и в варианте с минимальной концентрацией фруктозы – 5 г/л. Больше половины растений (60,0 %) сохранилось при концентрациях фруктозы 10 и 20 г/л. Резко снизилась приживаемость в вариантах с содержанием фруктозы 40 и, особенно, 60 г/л, что указывает на токсичность для растений такого количества углевода в питательной среде.

При сравнении сахарозы (контроль 20 г/л) и фруктозы (20 г/л) видно, что сахароза больше способствовала сохранности растений (86,7 %), чем фруктоза (60,0 %).

Наблюдения за образованием корней, их ростом, длиной ризогенной зоны показало положительное влияние фруктозы на ризогенез. Особенно отчетливо оно проявилось при концентрации 20 г/л самой большой длиной ризогенной зоны на протяжении всего периода культивирования.

Торможение роста побегов было отмечено уже через 3 месяца культивирования (рис. 4). Наиболее явным оно было при концентрациях фруктозы 20, 40 и 60 г/л. При концентрациях 5 и 10 г/л рост побегов приближался к контролю. Необходимо отметить вариант с концентрацией фруктозы 20 г/л. В этом варианте выявлена самая развитая в опыте ризогенная зона, как за счет числа образовавшихся корней, так и их длины, что привело к снижению роста побегов и возможности увеличения продолжительности беспересадочного хранения в коллекции.

В табл. 4 сведены показатели по трем исследуемым углеводам на момент завершения беспересадочного хранения. Длительность культивирования на сахарозе и сорбите была на 3 месяца больше, чем на фруктозе - 301 и 316 дней соответственно. Наибольшее число сохранившихся растений было на среде с сорбитом (7,5 г/л) - 93 %.

### Выводы

Анализируя результаты опытов, мы пришли к заключению, что максимально эффективного депонирования в коллекции растений винограда можно достигнуть, используя сорбит в качестве источника углеводного питания.

Под действием сорбита отмечено снижение интенсивности ростовых процессов на протяжении всего периода культивирования. Более интенсивный ризогенез и рост побегов отмечен при концентрациях 5–10 г/л, а торможение ростовых процессов при концентрациях 20–30 г/л, что дает возможность ис-



Рис. 3. Сохранность растений после 210 дней культивирования на среде с фруктозой

Fig. 3. Preservation of plants after 210 days of cultivation on a medium with fructose

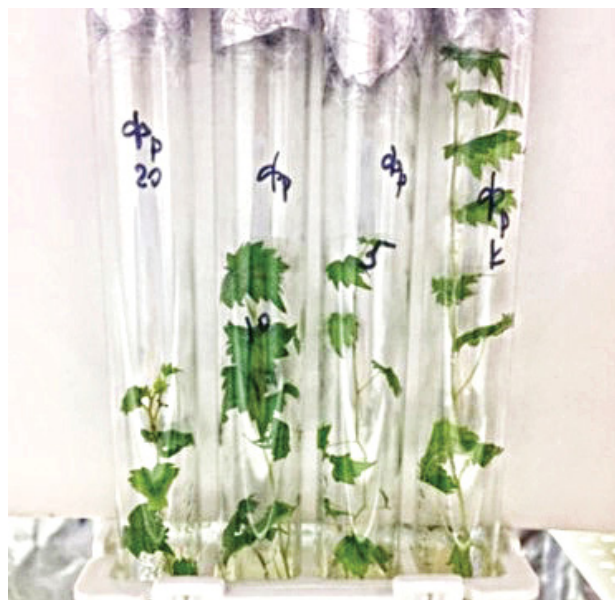


Рис. 4. Минимизация роста побегов при применении фруктозы

Fig. 4. Minimizing of shoot growth when using fructose

Таблица 4. Анализ эффективности источников углеводного питания для содержания растений винограда в коллекции *in vitro*

Table 4. The effectiveness analysis of carbohydrate nutrition sources to maintain grapevine plants in the collection *in vitro*

Углевод, г/л	Сохранность, %	Продолжительность культивирования, дней
Сахароза, 20	53,6	301
Фруктоза, 5	83,0	210
Сорбит, 7,5	93,0	316

пользовать сорбит в таком количестве для создания «зеленой медленнорастущей» коллекции винограда *in vitro*. Следует отметить при этом отличное состояние растений.

Исследована кинетика ростовых процессов растений при введении сахарозы в состав питательной среды в диапазоне от 0 до 60 г/л. Менее интенсивное, чем



при применении сорбита, торможение ростовых процессов наблюдалось при концентрациях 5 и 60 г/л.

При концентрации фруктозы 20 г/л выявлена самая развитая ризогенная зона, хорошая сохранность (60 %) и статистически значимое торможение роста побегов.

#### Источник финансирования

Работа выполнена в рамках государственного задания № FSMF-2019-0029.

#### Financing source

The work was conducted under public assignment No. FSMF-2019-0029.

#### Конфликт интересов

Не заявлен.

#### Conflict of interests

Not declared.

#### Список литературы

1. Sorokopudov V.N., Knyazeva I.V., Sorokopudova O.A., Burmenko J.V., Baranova T.V. Biotechnological methods of maintaining collections of the genus *Ribes* L. *Acta Hort.* 2021;1324:123-130. DOI 10.17660/ActaHortic.2021.1324.19.
2. Zdunic G., Maul E., Eiras Dias J.E.J., Muñoz Organero G., Carka F. et al. Guiding principles for identification, evaluation and conservation of *Vitis vinifera* L. sbsp. *sylvestris*. *Vitis*. 2017;56(3):127-131. DOI 10.5073/vitis.2017.56.127-131.
3. 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.
4. Cantizano J., García de Luján A., Arroyo-García R. Molecular characterization of table grape varieties preserved in the Rancho de la Merced Grapevine Germplasm Bank (Spain). *Vitis*. 2018;57(3): 93-101. DOI 10.5073/vitis.2018.57.93-101.
5. Jiménez C., Peiró R., Yuste A., García J., Martínez-Gil F., Gisbert C. Looking for old grapevine varieties. *Vitis*. 2019;58(2):59-60. DOI 10.5073/vitis.2019.58.59-60.
6. Горбунов И.В., Лукьянова А.А. Мобилизация и сохранение генресурсов винограда Анапской ампелографической коллекции в 2019 году // Научные труды СКФНЦСВВ. 2020;28:89-93. DOI 10.30679/2587-9847-2020-28-89-93.
7. El Aou-ouad H., Montero R., Baraza E., Bota J. Recovering ancient grapevine cultivars in the Balearic Islands: sanitary status evaluation and virus elimination. *Plants*. 2022;11(13):1754. DOI 10.3390/plants11131754.
8. Егорова Н.А., Ставцева И.В., Якимова О.В., Каменек Л.И., Кривоухатко А.Г. Некоторые аспекты клонального микро-размножения и сохранения *in vitro* эфиромасличных растений // Таврический вестник аграрной науки. 2015;1:18-24.
9. Острикова О.В., Федотова И.Э., Хархардина Е.Л. Влияние условий культивирования на эффективность первого этапа клонального микроразмножения сортов абрикоса обыкновенного // Селекция и сорторазведение садовых культур. 2019;2:55-59.
10. Celebi-Toprak F., Kayhan F., Alan A.R. *In vitro* propagation and cryopreservation of important grape cultivars (*Vitis Vinifera* L.) and rootstocks. *International Journal of Secondary Metabolite*. 2014;1(1):75.
11. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС. 1999:1-160.
12. Виноградова Е.Г. Использование сахарозы в качестве селективного агента в культуре *in vitro* льна, с целью получения засухоустойчивых генотипов // Синергетика в общественных и естественных науках. 2015;2:64-66.
13. Гусева К.Ю., Бородулина И.Д. Влияние концентрации сахарозы на укоренение картофеля *Solanum Tuberosum* L. в культуре *in vitro* // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности. 2015:229-232.
14. Дорошенко Н.П., Куприкова А.С., Пузырнова В.Г. Влияние сахарозы на замедление роста и сохранение растений винограда *in vitro* // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2017;46(4):33-48.
15. Бородаева Ж.А., Муратова С.А., Кулько С.В., Тохтарь Л.А. Влияние различных источников углеводного питания на ризогенез микрочеренков ягодных культур в условиях *in vitro* // Региональные геосистемы. 2017;25(274):21-35.
16. Муратова С.А., Папихин Р.В., Янковская М.Б. Влияние различных углеводов на регенерацию, размножение и рост растений *in vitro* // Плодоводство и ягодоводство России. 2012;31(2):86-94.
17. Ahmad T., Abbasi N., Hafiz I., Ansar A. Comparison of sucrose and sorbitol as main carbon energy sources in micropropagation of peach rootstock GF-677. *Pakistan Journal of Botany*. 2007;39(4):1269-1275.
18. Дорошенко Н.П., Пузырнова В.Г. Влияние осмотика сорбита на ростовые процессы винограда в культуре *in vitro* // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2020;64(4):190-209. DOI 10.30679/2219-5335-2020-4-64-190-209.
19. Ritterbusch C.W., Lucho S.R., Radmann E.B., Bianchi V.J. Effect of cytokinins, carbohydrate source and auxins on *in vitro* propagation of the 'G × N-9' peach rootstock. *International Journal of Fruit Science*. 2020;20(3):1607-1619. DOI 10.1080/15538362.2020.1822266.

#### References

1. Sorokopudov V.N., Knyazeva I.V., Sorokopudova O.A., Burmenko J.V., Baranova T.V. Biotechnological methods of maintaining collections of the genus *Ribes* L. *Acta Hort.* 2021;1324:123-130. DOI 10.17660/ActaHortic.2021.1324.19.
2. Zdunic G., Maul E., Eiras Dias J.E.J., Muñoz Organero G., Carka F. et al. Guiding principles for identification, evaluation and conservation of *Vitis vinifera* L. sbsp. *sylvestris*. *Vitis*. 2017;56(3):127-131. DOI 10.5073/vitis.2017.56.127-131.
3. 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.
4. Cantizano J., García de Luján A., Arroyo-García R. Molecular characterization of table grape varieties preserved in the Rancho de la Merced Grapevine Germplasm Bank (Spain). *Vitis*. 2018;57(3): 93-101. DOI 10.5073/vitis.2018.57.93-101.
5. Jiménez C., Peiró R., Yuste A., García J., Martínez-Gil F., Gisbert C. Looking for old grapevine varieties. *Vitis*. 2019;58(2):59-60. DOI 10.5073/vitis.2019.58.59-60.
6. Gorbunov I.V., Lukyanova A.A. Mobilization and preservation of grape gene resources in the Anapa ampelographic collection in 2019. *Scientific Works of NCFSCVW*. 2020;28:89-93. DOI 10.30679/2587-9847-2020-28-89-93 (*in Russian*).
7. El Aou-ouad H., Montero R., Baraza E., Bota J. Recovering ancient grapevine cultivars in the Balearic Islands: sanitary status evaluation and virus elimination. *Plants*. 2022;11(13):1754. DOI 10.3390/plants11131754.
8. Egorova N.A., Stavtseva I.V., Yakimova O.V., Kamenek L.I., Krivokhatko A.G. Some aspects of clonal micropropagation and conservation *in vitro* of essential oil plants. *Taurida Herald of the Agrarian Sciences*. 2015;1:18-24 (*in Russian*).
9. Ostrikova O.V., Fedotova I.E., Kharkhardina E.L. Influence of cultivation conditions on effectiveness of the first stage of clonal micromanifolding of an apricot ordinary grades.

- Selection and Variety Breeding of Fruitgrowing Cultures. 2019;2:55-59 (*in Russian*).
10. Celebi-Toprak F., Kayhan F., Alan A.R. *In vitro* propagation and cryopreservation of important grape cultivars (*Vitis Vinifera* L.) and rootstocks. International Journal of Secondary Metabolite. 2014;1(1):75.
  11. Butenko R.G. Biology of higher plant cells *in vitro* and biotechnology based on them. M.: FBK-PRESS. 1999:1-160 (*in Russian*).
  12. Vinogradova E.G. The use of sucrose as a selective agent in *in vitro* flax culture in order to obtain drought-resistant genotypes. Synergetics in Social and Natural Sciences. 2015;2:64-66 (*in Russian*).
  13. Guseva K.Yu., Borodulina I.D. Influence of sucrose concentration on potato rooting *Solanum Tuberosum* L. in the *in vitro* culture. Technologies and equipment for chemical, biotechnological and food industries. 2015:229-232 (*in Russian*).
  14. Doroshenko N.P., Kuprikova A.S., Puzirnova V.G. Effect of sucrose on retardation of growth and preservation of grape plants in the collection *in vitro*. Fruit Growing and Viticulture of South Russia. 2017;46(4):33-48 (*in Russian*).
  15. Borodaeva Zh.A., Muratova S.A., Kulko S.V., Tokhtar L.A. Influence of various sources of carbohydrate nutrition on rhizogenesis of microcrops of berry crops under the *in vitro* conditions. Regional Geosystems. 2017;25(274):21-35 (*in Russian*).
  16. Muratova S.A., Papikhin R.V., Yankovskaya M.B. Influence of various carbohydrates on regeneration, reproduction and growth of plants *in vitro*. Pomiculture and Small Fruits Culture in Russia. 2012;31(2):86-94 (*in Russian*).
  17. Ahmad T., Abbasi N., Hafiz I., Ansar A. Comparison of sucrose and sorbitol as main carbon energy sources in micropropagation of peach rootstock GF-677. Pakistan Journal of Botany. 2007;39(4):1269-1275.
  18. Doroshenko N.P., Puzirnova V.G. The effect of sorbitol on grapevine's growth *in vitro*. Fruit Growing and Viticulture of South Russia. 2020;64(4):190-209. DOI 10.30679/2219-5335-2020-4-64-190-209 (*in Russian*).
  19. Ritterbusch C.W., Lucho S.R., Radmann E.B., Bianchi V.J. Effect of cytokinins, carbohydrate source and auxins on *in vitro* propagation of the 'G × N-9' peach rootstock. International Journal of Fruit Science. 2020;20(3):1607-1619. DOI 10.1080/15538362.2020.1822266.

### Информация об авторах

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

**Валентина Георгиевна Пузырнова**, мл. науч. сотр. лаборатории контроля качества виноградовинодельческой продукции; e-мэйл: valentina.puzirnova@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3930-1639>.

### Information about authors

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

**Valentina G. Puzirnova**, Junior Staff Scientist, Laboratory of Quality Control of Grape and Wine Products; e-mail: valentina.puzirnova@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3930-1639>.

Статья поступила в редакцию 19.01.2023, одобрена после рецензии 14.02.2022, принята к публикации 21.02.2023.