

Н. М. Зеленянська,

Л. В. Джабурія,

Н. І. Теслюк

Національний науковий центр

«Інститут виноградарства і виноробства ім. В.Є. Таїрова»

Україна

РОЗРОБКА СПОСОБІВ ЗБІЛЬШЕННЯ СТРОКІВ ЗБЕРІГАННЯ КОЛЕКЦІЇ ЦІННИХ КЛОНІВ ВІНОГРАДУ В КУЛЬТУРІ IN VITRO.

Наведено результати наукових досліджень визначення оптимальних поживних середовищ, які сприяли мінімалізації ростових процесів та підвищенню життєздатності мікроклонів винограду, вперше встановлено можливість використання нового абсорбенту води в поживному середовищі під час довгострокового зберігання їх в культурі in vitro. Розроблені способи дозволили збільшити строки зберігання колекції цінних клонів винограду in vitro в умовах культурального боксу до 6 місяців без пересадок із збереженням життєздатності рослин і можливістю їх подальшої рекультивації.

Ключові слова: *культура in vitro, мікроклони винограду, поживне середовище, ініціальні експланти, абсорбенти води, осмотичні інгібітори.*

Питання створення колекції винограду in vitro – „банку клонів” є актуальним та новим для галузі виноградарства України. Тривале збереження в культурі in vitro колекцій періодично субкультивуємих рослин є доповненням до польової колекції клонів і сортів. Відомо, що утримання генетичної колекції в польових умовах вимагає значних трудовитрат і виробничих площ, не забезпечує гарантованого збереження матеріалу у зв'язку з можливістю елімінації під дією негативних факторів зовнішнього середовища, хвороб і шкідників [2, 4, 6].

Технологія довгострокового зберігання в культурі in vitro генофонду винограду дозволяє надійно зберігати цінний генетичний матеріал і створює можливість для інтродукції, обміну, розповсюдження зразків в будь-яку пору року. Сьогодні науково-дослідницька робота по створенню „банку клонів” в культурі in vitro проводиться в декількох основних напрямках [8]: 1) створення низькотемпературного кріобанку з використанням рідкого азоту – (t заморожування - 196°C; 2) зміна темпів росту, розвитку рослин під дією температури культивування [8]; освітлення та фотоперіоду; модифікацій мінерального складу поживних середовищ для зберігання [1]; застосування ростових та осмотичних інгібіторів, фітогормонів [2, 7]. В науковому і практичному відношенні наші дослідження направлені на зміну кінетики росту мікроклонів винограду in vitro, збільшення інтервалу між пересадками, економію матеріальних та трудових ресурсів.

Метою роботи була розробка способів збільшення строків зберігання колекції цінних клонів винограду в культурі in vitro. Для досягнення цієї мети необхідно було провести пошук

нових ростових та осмотичних інгібіторів росту рослин для вдосконалення поживних середовищ з пролонгованою дією та визначити оптимальні поживні середовища, які сприятимуть мінімізації ростових процесів мікроклонів винограду під час довгострокового зберігання їх у банку *in vitro*.

Матеріали та методи

Робота була виконана у групі культури тканин та органів *in vitro* відділу розсадництва і розмноження винограду ННЦ „ІВіВ ім. В.Є.Таїрова”. Для проведення дослідів в культуру *in vitro* були введені і вирощені до потрібних розмірів рослини цінних клонів винограду сортів: Мускат гамбургський (клон 2034), Шардоне (клон 4876), Ріпарія х Рупестріс 101-14 (клон 4923). Заготовку вихідного матеріалу проводили з кущів винограду, які ростуть в тепличному банку клонів інституту і пройшли фітосанітарний контроль. Введення в культуру *in vitro* дослідних клонів винограду проводили за загальноприйнятою в лабораторії методикою [5]. Для введення в колекцію клонів *in vitro* використовували одновічкові чубуки, однакові за розміром та пасажем.

За основу використовували поживне середовище Мурасіге і Скуга (МС). Всі технологічні прийоми проводили у напрямку модифікації складу поживного середовища, що дозволило мінімізувати ріст мікроклонів винограду та збільшити період між пересадками рослин. Для цього використовували осмотичні інгібітори – манніт (40 мг/л) та сорбіт (40 мг/л). Вперше для вирішення поставленої мети випробували новий препарат - абсорбент води „Терравет” (дрібна фракція). Шляхом експерименту було встановлено концентрацію препарату „Терравет”, агару та спосіб приготування поживного середовища, придатного для довгострокового культивування мікроклонів винограду *in vitro*. Контролем для всіх варіантів досліду було повне поживне середовище МС без додавання фітогормонів. Культивування проводили при температурі +24-25°C та освітленні –2300-2500 лк., з фотоперіодом –16 годин на добу.

В процесі досліджень спостерігали за реакцією дослідних сортів клонів винограду на різні умови депонування і визначали: приживлюваність рослин (%); довжину пагонів (см); кількість вузлів (шт.); масу зеленої частини (мг); кількість коренів (шт.); довжину коренів (см); масу коренів (мг). Через 3, 4, 6, 8 місяців культивування в колекції клонів *in vitro* встановлювали відсоток життєздатних рослин.

Результати та обговорення

Відомо, що ріст рослин можливо затримувати за допомогою додавання в поживні середовища осмотичних інгібіторів росту – манніту, сорбіту. Так, Дорошенко Н.П. [2,3] для уповільнення росту винограду *in vitro* рекомендує додавати в середовище 30-60 мг/л сорбіту, а Русева Р.Д. [7] – 3-5% манніту та 3% сахарози. Нашими дослідженнями було встановлено концентрацію (40мг/л) та виявлено позитивний вплив додавання сорбіту в поживне середовище для тривалого культивування в умовах *in vitro* і збільшення періоду між пересадками. Також встановлено необхідну концентрацію манніту – 40 мг/л. В результаті

пошуку вперше встановлено можливість використання нового абсорбенту води „Терравет” для приготування поживних середовищ і використання їх для довгострокового зберігання винограду в культурі *in vitro*, розроблено оптимальні концентрації препарату, способи приготування середовища.

В результаті досліджень нами було встановлено, що середовище МС з додаванням сорбіту сприяло мінімалізації росту мікроклонів винограду, сповільнювало процеси проліферації пазухових бруньок, та коренеутворення (Табл. 1).

Таблиця 1

Розвиток ініціальних експлантів винограду на різних поживних середовищах для довгострокового зберігання в культурі *in vitro* (середнє по сортах)

Тип поживного середовища	Приживлюваність, %	Початок проліферації, дні	Початок ризогенезу (у 50% рослин), дні
МС повне (контроль)	68,8	6-7	11-12
МС + сорбіт	78,0	6-7	12-13
МС + манніт	81,3	4-5	10
МС + „Терравет”	76,6	5-6	9-10

Так, приживлюваність експлантів була невисокою і становила 78%, інколи візуально спостерігали почервоніння та підсихання базальної частини експланту. Проліферація пазушних бруньок починалась на 6-7 день від початку культивування, що відповідає контролю, а процеси ризогенезу починались пізніше на 1-2 дні ніж в контрольному варіанті. Додавання сорбіту в поживне середовище сприяло сповільненому розвитку пагонів. Так, наприклад, у сорту Шардоне 4876 через 4 місяці культивування довжина пагону становила на середовищі з сорбітом в середньому 10,6 см, кількість пагонів – 8 шт., довжина коренів хоча і була великою та корінці були тонкими.

На середовищі з додаванням манніту приживлюваність рослин була на рівні 76-85% і в середньому по сортах становила 81,5%, проліферація бруньок починалась значно раніше – на 4-5 день. Також інтенсивно відбувались процеси коренеутворення – на 10 день від початку культивування до 50% експлантів були з корінцями та їх зачатками. Через 5 місяців культивування без пересадок довжина коренів у мікроклонів сорту Шардоне 4876 в середньому становила 19,2 см, але корені були тонкими. На середовищі МС з маннітом швидкість росту та висота рослин була на рівні показників інших варіантів середовищ, але значно збільшувалась довжина міжвузлів, площа листкової поверхні була меншою.

Найкращі результати були отримані на новому, розробленому середовищі з додаванням препарату „Терравет”. Слід відмітити, що приживлюваність рослин на цьому середовищі складала 76,6%, проліферація вічок в середньому починалась на 5-6 день, сила росту пагонів була середньою. Головна перевага такого середовища заключалась в інтенсивному

коренеутворенні, причому корені були добре розвинені, з великою кількістю коренів II та III порядків. Завдяки цьому рослини могли зберігатися тривалий час без пересаджувань.

При аналізі біометричних показників розвитку рослин винограду при довгостроковому зберіганні в культурі *in vitro* (6 місяців без пересаджувань) було встановлено, що додавання в поживне середовище нового абсорбенту „Терравет” сприяє кращому збереженню у середовищі поживних речовин та води і як результат кращому розвитку і стану дослідних рослин (Табл. 2).

Таблиця 2

Розвиток мікроклонів винограду сорту Шардоне 4876 на різних поживних середовищах для довгострокового зберігання в культурі *in vitro*

Тип поживного середовища	Кількість життєздатних рослин ч-з 6 міс., (%)	Висота рослини (см)	Кількість вузлів на основному пагоні (шт.)	Маса зеленої частини (мг)	Довжина коренів (см)	Кількість коренів (шт.)	Маса сирих коренів (мг)
МС повне (контроль)	10	10,5	9,0	625	13,5	2,0	240
МС + сорбіт	20	14,6	9,8	892	22,1	2,2	680
МС + манніт	25	15,9	8,7	930	19,2	2,4	818
МС + „Терравет”	35	16,5	10,7	1052	16,6	3,0	1086

Так, наприклад, у сорту Шардоне клон 4876 висота зеленої частини та кількість міжвузль на основному пагоні були на рівні інших дослідних варіантів, але маса зеленої частини суттєво збільшувалась. Показники довжини коренів на середовищі з „Терравет” були нижчі – 16,6 см ніж на середовищах з маннітом – 19,2 см і з сорбітом – 22,1 см, але показники кількості утворених коренів і їх маса були значно вищі за всі інші варіанти. Подібну закономірність росту і розвитку мікроклонів спостерігали у сортів Мускат гамбургський (клон 2034) та Ріпарія x Рупестріс 101-14 (клон 4923).

При вивченні життєздатності мікроклонів винограду дослідних сортів було встановлено, що через 6 місяців культивування без пересадок на контрольному середовищі МС залишалось в середньому всього до 10% рослин, придатних до подальшого розмноження в культурі *in vitro*. На середовищі з сорбітом цей показник становив 20%; при додаванні манніту життєздатність рослин збільшувалась до 25%, а на новому середовищі з „Терравет” в середньому 35%. Слід зазначити, що середовище з абсорбентом води „Терравет” на відміну від інших поживних середовищ майже не розшаровувалось і не всихало, довго зберігало свої поживні властивості.

Висновки

1. Вперше встановлено можливість використання нового абсорбента води – препарату „Терравет” в поживному середовищі для довгострокового зберігання мікроклонів винограду в культурі *in vitro*.

2. Використання поживного середовища з „Терраветом” дозволяє збільшити строки зберігання колекції цінних клонів винограду *in vitro*, при звичайних умовах культурального боксу, до 6 місяців без пересадок із збереженням життєздатності рослин і можливістю їх подальшої рекультивації.

Література:

1. Димитрова В. К. Оптимизиране на условията за клонално микроразмножаване на лозата: автореф. на дисертация за присъждане на образователна и научна степен «доктор» / В. К. Димитрова.- София, 1998. – 31 с.
2. Дорошенко Н. П. Биотехнологические методы ускоренного размножения и оздоровления, селекции бессемянных сортов и создания коллекций генофонда винограда: автореф. дис. на получение науч. степени д-ра с.-х. наук : спец. 06.01.08 „Виноградарство” / Н. П. Дорошенко. – Новочеркасск, 1999. – 59 с.
3. Дорошенко Н. П. Длительное сохранение *in vitro* растений винограда / Н. П. Дорошенко, Г. В. Соколова // Научно-технический прогресс в виноградарстве : мат. междунар. науч. симпозиума, посвященного 90- летию со дня рождения Л. В. Колесника. – Кишинев, 1998. – С. 33 - 34.
4. Дорошенко Н.П. Способ создания коллекции генофонда “*in vitro*” / Н. П. Дорошенко, М. А. Хохлова // Виноград и вино России. – 1993. – № 6. – С. 18 – 21.
5. Зеленьанская Н. Н. Технология размножения винограда с использованием методов культуры тканей *in vitro* / Н. Н. Зеленьанская, Л. В. Джабурия, Н. И. Теслюк // ВиноГрад. – 2009. – №3. – С.50 – 53.
6. Ульянова Е. К. Длительность хранения земляники *in vitro* / Е. К. Ульянова // НТБ ВНИИР им. Н.И. Вавилова. – Ленинград, 1990. – Вып. 197. – С.57 – 58.
7. Русева Р. Приложение на въглехидрати за продължително съхранение на експланти от лоза в условия *in vitro* / Р. Русева // Устойчиво развитие на лозарството и винарството, основани на знанието : научн. конфю. с международно участие. – Плевен, 2007. – С. 87 – 91.
8. Русева Р. *In vitro* съхранение на експланти от лоза /*Vitis vinifera L.*/ при ниски температури / Р. Русева // Устойчиво развитие на лозарството и винарството, основани на знанието : научн. конфю. с международно участие. – Плевен, 2007. – С. 82 – 86.

Н. Н. Зеленьская, Л. В. Джабурия, Н. И. Теслюк

***РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ УВЕЛИЧЕНИЯ СРОКОВ ХРАНЕНИЯ КОЛЛЕКЦИИ
ЦЕННЫХ КЛОНОВ ВИНОГРАДА В КУЛЬТУРЕ IN VITRO***

Приведены результаты научных исследований определения оптимальных питательных сред, которые способствовали минимализации ростовых процессов и повышению жизнеспособности микроклонов винограда, впервые установлена возможность использования нового абсорбента воды в питательной среде во время долгосрочного хранения их в культуре in vitro. Разработанные способы позволили увеличить сроки хранения коллекции ценных клонов винограда in vitro в условиях культурального бокса до 6 месяцев без пересадок с сохранением жизнеспособности растений и возможностью их последующей рекультивации.

N. N. Zelenjanskaja, L.V. Dzaburia, N. I. Tesljuk

***THE DEVELOPING OF THE METHODS INCREASING THE PERIOD OF
GRAPEVINE CLONES STORAGE IN VITRO***

The results of the determination of optimal nutrient media, which facilitate to growth processes decreasing and to grapevine microclones vitality increasing is demonstrated. The possibility of new water absorbent applying in nutrient medium during long-term grapevine clones in vitro bank storage. The developed methods allow to increase the period of grapevine clones in vitro storage under the ordinary conditions of cultural boxes till 6 months without the transplantation with the plant vitality and its possibility to next recultivation reservation.