

Н.М. Зеленянська

Л.В. Джабурія

Н.І. Теслюк

Національний науковий центр

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

ПРИЙОМИ ОПТИМІЗАЦІЇ КЛОНАЛЬНОГО МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ ВИНОГРАДУ IN VITRO

Наведені результати досліджень по визначенню найбільш ефективного поживного середовища для розмноження винограду in vitro на основі харчових крохмалів. Встановлено, що середовище Мурасіге і Скуга, виготовлене на основі кукурудзяного крохмалю є найкращим для використання на першому та другому етапах мікроклонального розмноження винограда in vitro.

Ключові слова: мікроклони, кукурудзяний крохмаль, картопляний крохмаль, пшеничний крохмаль.

Вступ. Для створення вихідного садивного матеріалу високопродуктивних, стійких до хвороб, несприятливих факторів середовища сортів і клонів винограду та його розмноження, у сільськогосподарській практиці широко застосовують методи біотехнології, зокрема метод культури тканин та органів in vitro. Основою цього методу є індукція органогенезу із ініціальної бруньки на штучних поживних середовищах. Його ефективність, в більшості випадків, обумовлена правильним підбором поживних середовищ, кількісний та якісний склад яких впливає на приживлюваність ініціальних експлантів, обумовлює початок проліферації пазушних бруньок та процес ризогенезу [1].

Найчастіше у культурі винограду in vitro використовують тверді поживні середовища, виготовлені на основі агару, який є складною сумішшю полісахаридів, що отримують при переробці червоних та бурих водоростей. Виготовляють агар за кордоном, а із країн ближнього зарубіжжя - в Прибалтиці та Росії (із усіх країн близького зарубіжжя тільки в цих країнах є необхідні для його виробництва ресурси сировини). Вартість агару, що ввозиться в Україну, дуже висока, а агароїд, що виробляється в Україні, суттєво відрізняється від агару за хімічним складом і не придатний для застосування в культурі винограду in vitro. Тому, **метою нашої роботи** було розробити прийоми підвищення ефективності мікроклонального розмноження винограду на основі застосування сучасних

замінювачів агару та оцінити їх вплив на показники приживлюваності і розвитку експлантів винограду в культурі *in vitro*.

Матеріал і методи досліджень. Дослідження з пошуку нових желюючих компонентів проводили протягом 2007 - 2009 рр. у відділі розсадництва і розмноження винограду ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» на сортах Марсельський чорний ранній, Трамінер рожевий, Каберне, Совіньон, Шардоне, Мечта, Кобзар, Оригінал, Кардішах та Добриня. Заготівлю лози проводили в осінньо-зимовий період на виділених кущах винограду, перевіренних на відсутність бактеріальних та вірусних хвороб. Із пророщеної лози відбирали молоді, зелені пагони, які послідовно обробляли у розчинах дезінфікуючих агентів. Після стерилізації пагони розрізали на одновічкові чубуки розміром 0,5-1,0 см, які містили пазушну бруньку та вводили на поживні середовища першого етапу культивування - Мурасіге і Скуга (МС), Ніча і Ніч (НіН), Гамборга. Після проліферації пазушної бруньки ініціальних експлантів та подальшого росту мікроклонів (до розмірів 6,0-8,0 см) на поживних середовищах першого етапу розмноження, їх живцювали та пересаджували на дослідні середовища 2-го етапу клонального мікророзмноження із різними желюючими агентами. Для желювання середовищ використовували пшеничний, картопляний та кукурудзяний крохмалі, у кількості 70 г/л [1]. Таку концентрацію крохмалів було встановлено експериментальним шляхом у процесі проведення досліджень. У конторолі – застосовували агар (8 г/л). Консистенція середовищ, які вивчали була достатньо щільною, зручною для садіння експлантів та їх розвитку. Всі поживні середовища стерилізували шляхом автоклавування під тиском 1 атм. протягом 15-20 хв., роботу проводили у стерильних умовах ламінарного боксу. Культивування ініціальних експлантів здійснювали в культуральному боксі при температурі 25-27С°, перший тиждень при освітленні 800-1000 люкс., надалі його збільшували до 2000-5000 люкс., при 16-годинному фотоперіоді та вологості повітря 60-70 %. У процесі досліджень проводили візуальні спостереження за розвитком експлантів та визначали їх приживлюваність (на 20 день від початку культивування (%)), початок проліферації (день розпускання пазушної бруньки), період ризогенезу (початок утворення коренів, дні) та проводили біометричні обліки розвитку.

Результати досліджень. Роботу проводили у два етапи. На першому етапі з метою підвищення приживлюваності ініціальних експлантів були апробовані різні поживні середовища - Ніча і Ніч, Гамборга та Мурасіге і Скуга стандартні та на основі кукурудзяного крохмалю. Як свідчать отримані дані (табл. 1) у варіантах, де для желювання середовища використовували кукурудзяний крохмаль – приживлюваність була значно вищою від варіанту із агаром.

Приживлюваність ініціальних експлантів винограду на різних поживних середовищах

Тип поживного середовища	Марсельський чорний ранній	Трамінер рожевий	Каберне Совіньон	Шардоне
НіН + агар	57,33	56,67	63,33	58,67
НіН + кукурудзяний крохмаль	68,67	70,00	76,00	72,00
Гамборга + агар	42,00	40,00	46,00	42,67
Гамборга + кукурудзяний крохмаль	50,67	48,00	60,00	50,67

Так, на звичайному поживному середовищі Гамборга вона була дуже низькою, не досягала навіть і 50%. А на середовищі Гамборга із кукурудзяним крохмалем ці значення коливались в межах 50,0-60,0% в залежності від сорту винограду. В середньому по сортах на середовищі Гамборга із агаром приживлюваність складала – 43,0%, а із кукурудзяним крохмалем – 55,0%. Інколи, при введенні ініціалів на середовища Гамборга були відмічені випадки різкого потемніння експлантів та їх подальша нежиттєздатність. Дослідження показників приживлюваності на середовищі Ніча і Ніч із кукурудзяним крохмалем показало, що приживлюваність ініціальних експлантів на ньому збільшувалась і становила 59,0-65,0%, а при використанні кукурудзяного крохмалю – 66,0-74,0%. Заміна агару на кукурудзяний крохмаль в середовищі Ніча і Ніч дозволила підвищити приживлюваність експлантів в середньому по даним сортам на 9,6%. Найвищі показники приживлюваності були відмічені на середовищі МС із кукурудзяним крохмалем. Так, наприклад у сорту Кобзар приживлюваність була на рівні 91,0%, що на 18,0% більше в порівнянні із агаровим середовищем того ж складу. Таким чином було встановлено, що для досягнення високого рівня приживлюваності найкращим було поживне середовище МС модифіковане із кукурудзяним крохмалем.

З огляду на те, що найкращі результати по приживлюваності ініціальних експлантів були одержані на поживному середовищі МС з додаванням кукурудзяного крохмалю, на другому етапі проведення досліджень до МС додавали такі желюючі компоненти як кукурудзяний, картопляний та пшеничний крохмаль. Згідно з даними Рис. 1 у сорту Добриня найбільше експлантів приживалося на поживному середовищі МС + кукурудзяний крохмаль – 100%, дещо менше на поживному середовищі з агаром – 90% і найменше на середовищах з картопляним та пшеничним крохмалю – 70 і 75%.

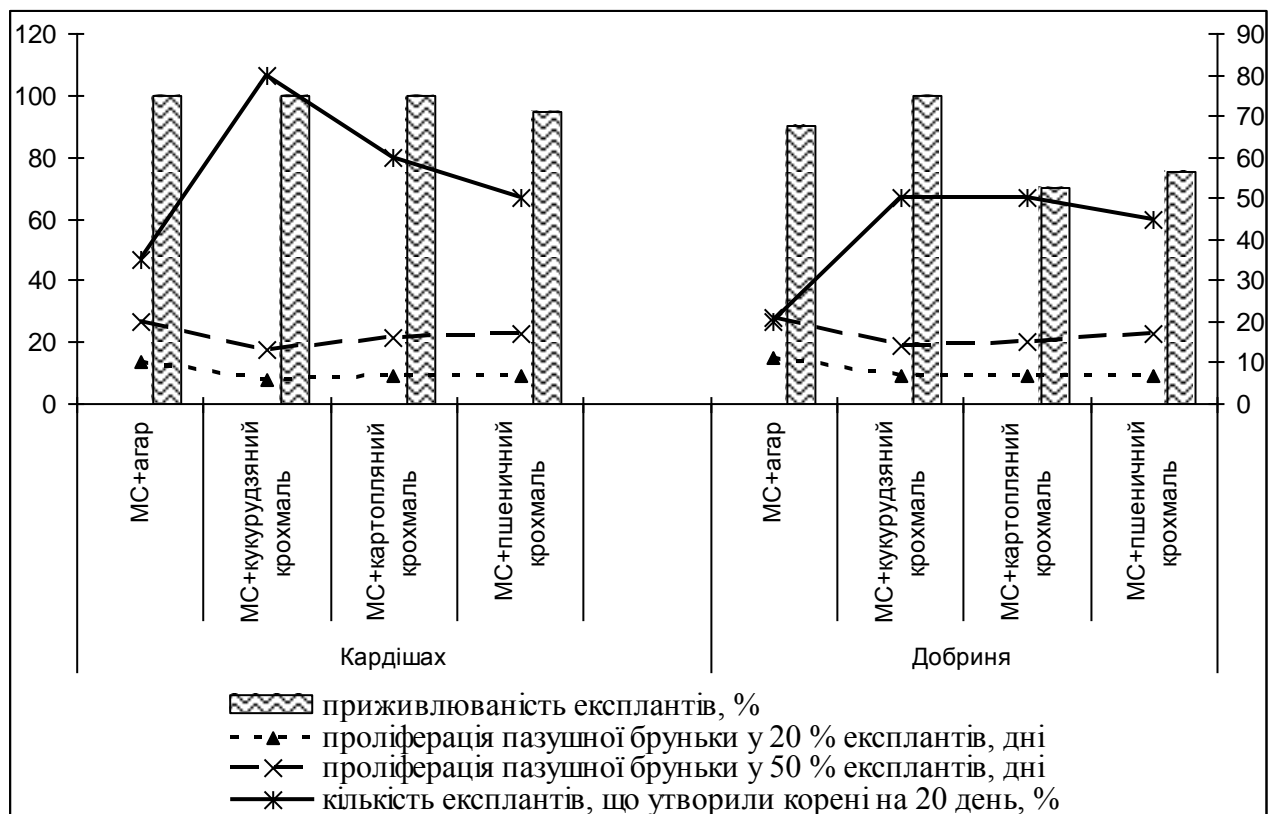


Рис. 1 Розвиток мікроклонів винограду на поживних середовищах другого етапу клонального мікророзмноження із різними желюючими компонентами

У сорту Кардішак високим ступенем приживлювання ініціальних експлантів характеризувалися практично всі типи поживних середовищ, які досліджувалися. На рівні 100% знаходився цей показник на середовищі із кукурудзяним, картопляним крохмалю та агарі, і на рівні 95% - на середовищі із пшеничним крохмалем.

Візуальні спостереження за розвитком пазушних бруньок одновіткових чубуків показали, що найшвидше цей процес відбувався на поживному середовищі із кукурудзяним крохмалем, дещо пізніше на середовищах із картопляним та пшеничним крохмалю. Найнижчі результати були у варіантах з агаром. Так, на поживному середовищі із кукурудзяним крохмалем у 20-30% експлантів обох сортів проліферація пазушних бруньок розпочиналася вже на 5-7 день після пересаджування. Дещо їм поступалися варіанти з застосуванням картопляного та пшеничного крохмалю: у 20-30% експлантів проліферація бруньок розпочиналась на 6-8 день. На середовищі із агаром процес проліферації пазушної бруньки розпочинався відповідно на 9 та 10 день. Аналогічну закономірність розвитку експлантів простежували і на етапі, коли у 50% експлантів була добре розвинена пазушна брунька.

Через 20 днів від початку культивування були проведені агробіологічні обліки розвитку коренів. У результаті встановлено, що найбільше експлантів столового сорту

винограду Кардішах, у яких спостерігали добре розвинені корені або їх зачатки були на поживному середовищі із кукурудзяним крохмалем. Їх кількість складала 80%. На поживному середовищі з картопляним крохмалем, кількість експлантів з коренями була меншою на 20% порівняно з агаром та більшою на 10% порівняно із пшеничним крохмалем. Проведення обліків за даним показником у експлантів підщепи Добриня показало, що цей процес відбувався менш активно, але вище вказана тенденція для сорту Кардішах, зберігалася: 20% експлантів мали розвинені корені на поживному середовищі з агаром, 50% - на поживному середовищі з кукурудзяним і картопляним крохмалями та 45% - на поживному середовищі з пшеничним крохмалем.

Через 60 діб культивування мікроклонів винограду на поживних середовищах з різними желуючими агентами, провели вимірювання висоти рослин, обліки кількості листків, міжвузлів, визначали життєздатність мікроклонів. При аналізі вказаних показників було відмічено пряму їх залежність від типу поживного середовища на якому культивували рослини (Рис. 2).

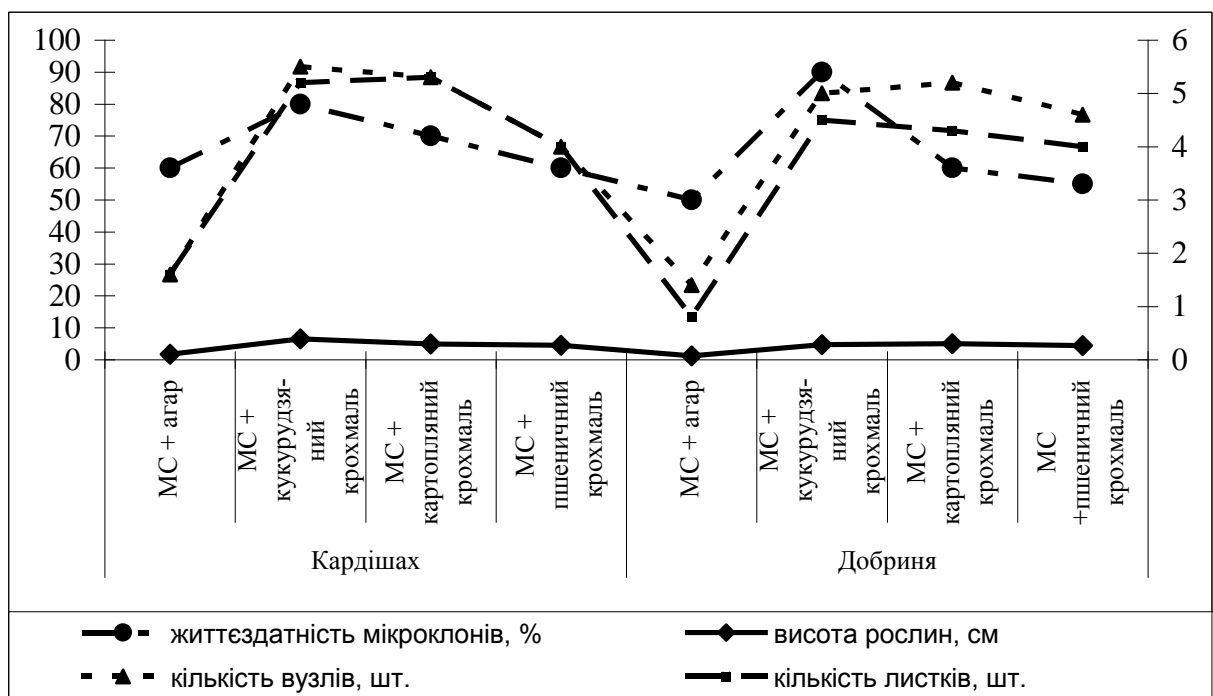


Рис. 2 Біометричні показники розвитку рослин на поживних середовищах із різними желуючими речовинами через 60 днів культивування

Так, наприклад, найвищі мікроклони сорту Кардішах формувалися на поживному середовищі з желуванням кукурудзяним крохмалем: висота зеленого приросту дорівнювала 6,5 см, що на 4,8 см більше ніж на середовищі з агаром. На середовищі з картопляним та пшеничним крохмалем рослини досягали висоти 4,5 – 4,9 см, що в порівнянні з агаровим середовищем на 2,8-3,2 см. більше. За кількістю міжвузлів та листових пластинок на основному пагоні між мікроклонами, які культивували на

поживних середовищах з кукурудзяним, картопляним та пшеничним агаром вірогідної різниці не було. А порівняно з варіантом, де в якості желуючого компоненту застосовували агар така різниця була і досить суттєва. У мікроклонів сорту Кардішах на поживних середовищах з кукурудзяним, картопляним та пшеничним крохмалем утворювалося на 2,4-3,9 шт. більше міжвузлів та листкових пластинок. У мікроклонів сорту Добриня - відповідно на 3,2-3,8 шт.

Поживне середовище з кукурудзяним крохмалем сприяло і збереженню більшої кількості життєздатних рослин. Так, кількість мікроклональних рослин сорту Кардішах, придатних для подальшого розмноження становила 85%, для сорту Добриня відповідно 90%. На поживних середовищах з картопляним та пшеничним крохмалем кількість життєздатних рослин складала 75-80% у сорту Кардішах та 70-75% у сорту Добриня. У варіантах з застосуванням агару кількість життєздатних мікроклонів була на рівні 65-70%.

ВИСНОВКИ

1. З метою підвищення ефективності клонального мікророзмноження винограду *in vitro* рекомендується використовувати поживне середовище Мурасіге і Скуга, виготовлене на основі кукурудзяного, картопляного та пшеничного крохмалів. Для досягнення необхідної консистенції середовищ вміст крохмалів складав 70 г/л.

2. Встановлено, що вище названі желуючі агенти покращують показники приживлюваності, проліферації пазушних бруньок, сприяють активному росту та розвитку ініціальних експлантів. Через 60 діб культивування за біометричними показниками розвитку (висота рослин, кількість листків та міжвузлів) мікроклони винограду на всіх досліджуваних типах поживних середовищ (МС модифіковане із кукурудзяним, картопляним та пшеничним крохмалем) перевищували аналогічні показники мікроклонів на поживному середовищі із агаром.

3. Із дослідженого переліку середовищ поживне середовище Мурасіге і Скуга модифіковане із кукурудзяним крохмалем є найкращим для використання на першому та другому етапах мікроклонального розмноження винограду *in vitro*.

ЛІТЕРАТУРА

1. Болвелл Т. Г. Биотехнология растений: культура клеток / Т. Г. Болвелл, К. Р. Вуд, Р. А. Гонзалес. – М.: Агропромиздат, 1989. – С. 124 – 125.
2. Черевата Т. М. Розробка і оптимізація прийомів клонального мікророзмноження для виробництва садивного матеріалу винограду: автореф. дис. на здобуття наук, ступеня канд. с-г. наук: спец. 06.01.08 – «Виноградарство» / Т. М. Черевата. - Одеса, 2006. – 22 с.
3. Пат. № 47417 Україна А 01 G 31/00, 17/00 Поживне середовище для вирощування мікроклонів винограду / Стицько С. А., Мілкус Б. Н., Теслюк Н. І.; заявник і

патентовласник Інститут виноградарства і виноробства ім. В. Є. Таїрова. - Опубл. 15.07.2002., Бюл. № 7.

4. Зеленьянская Н. Н. Технология размножения винограда с использованием методов культуры тканей *in vitro* / Н. Н. Зеленьянская, Л. В. Джабурия, Н. И. Теслюк // Виноград. – 2009. – № 3. – С. 50 – 53.

5. Теслюк Н. І. Використання нового желюющего компонента для винограду в культурі *in vitro* / Н. І. Теслюк // Аграрний вісник Причорномор'я. – Одеса: ОДАУ, 2005. – Вип. 29. – С. 141 – 14.

6. ТУ У 18.267-95. Крохмаль кукурудзяний модифікований харчовий (желюющий) замість ТУ 10.18 УРСР 443-91. –01.08.95 без обмеженого терміну дій.

7. Пат. 47417 Україна, МПК А 01 G 31/00, 17/00. Поживне середовище для вирощування мікроклонів винограду / Стицько С. А., Мілкус Б. Н., Теслюк Н. І.; заявник та патентовласник Інститут виноградарства і виноробства ім. В.Є. Таїрова. – № 97062877 ; заявл. 18.06.97 ; опубл. 15.07.02, Бюл. № 7.

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

**ПРИЕМЫ ОПТИМИЗАЦИИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ
ВИНОГРАДА IN VITRO**

*Приведены результаты исследований по определению наиболее эффективной питательной среды для размножения винограда *in vitro* на основе пищевых крахмалов. Установлено, что среда Мурасиге и Скуга приготовленная на основе кукурузного крахмала является наилучшей для использования на первом и втором этапах микроклонального размножения винограда *in vitro*.*

N. N. Zelenjanskaya, L. V. Dzaburiya, N.I. Tesluk

**METHODS FOR OPTIMIZING IN VITRO CULTURE CLONAL
MICROPROPAGATION OF GRAPEVINE**

The results of study to determine the most effective nutrients medium for the grapevine propagation in vitro culture on the basis of nutrient corn starch have been presented. It has been stated that nutrient medium MS with corn starch is the optimal on the first and second stages of clonal micro-propagation of grapevine in vitro cultura.