

УДК 634.8.03

UDC 634.8.03

DOI 10.30679/2219-5335-2021-2-68-28-45

DOI 10.30679/2219-5335-2021-2-68-28-45

**ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ  
ПО СОЗДАНИЮ КОЛЛЕКЦИИ  
*IN VITRO* ДЛЯ СОРТА ВИНОГРАДА  
ФИОЛЕТОВЫЙ РАННИЙ**

**TEST REPORT ON THE CREATION  
OF *IN VITRO* COLLECTION  
FOR GRAPEVINE VARIETY  
THE FIOLETOVIY RANNIY**

Пузырнова Валентина Георгиевна  
младший научный сотрудник  
лаборатории контроля качества  
виноградовинодельческой продукции  
e-mail: [ruswinebooks@yandex.ru](mailto:ruswinebooks@yandex.ru)

Puzyrnova Valentina Georgievna  
Junior Research Associate  
of Quality Control of Vine-Wine  
Products Laboratory  
e-mail: [ruswinebooks@yandex.ru](mailto:ruswinebooks@yandex.ru)

Дорошенко Наталья Петровна  
д-р с.-х. наук,  
главный научный сотрудник  
лаборатории биотехнологий  
e-mail: [n.doroschenko2013@yandex.ru](mailto:n.doroschenko2013@yandex.ru)

Dorochenko Natalia Petrovna  
Dr. Sci. Agr.  
Chief Research Associate  
of Biotechnology Laboratory  
e-mail: [n.doroschenko2013@yandex.ru](mailto:n.doroschenko2013@yandex.ru)

*Всероссийский научно-исследовательский  
институт виноградарства и виноделия  
имени Я.И. Потепенко –  
филиал Федерального государственного  
бюджетного научного учреждения  
«Федеральный Ростовский  
аграрный научный центр»,  
Новочеркасск, Россия*

*All-Russian Research Institute  
named after Ya.I. Potapenko  
for Viticulture and Winemaking –  
Branch of Federal State  
Budget Scientific Institution  
«Federal Rostov Agricultural  
Research Center»,  
Novocherkassk, Russia*

Данная статья посвящена проблеме сохранения растительного биоразнообразия, актуальной для всего мира. Классические способы и методы уже не справляются с этой задачей. Применение достижений биотехнологии в дополнение к традиционным методам сохранения биоразнообразия *ex situ* и *in situ* позволяет устойчиво управлять генетическими ресурсами. Содержание растений в условиях медленно растущей коллекции – перспективный способ содержания растений в генетических коллекциях. Большинство исследователей отмечена сортоспецифическая реакция растений на приемы и методы клонального микроразмножения, поэтому единого алгоритма создания коллекции быть не может. Необходим

This article is devoted to the problem that is acute all over the world – the conservation of plant biodiversity. Classical methods no longer cope with this task. The application of achievements of biotechnology, in addition to traditional methods of *ex situ* and *in situ* conservation biodiversity, enables the sustainable management of genetic resources. Keeping the plants in a slow-growing collection is a successful and widely used method of plants maintenance in gene banks. Most researchers have noted that the way of plant reaction on techniques and methods of clonal micro-propagation depends on a variety, so there are no unique algorithm for creating a collection. A special

сорто-ориентированный подход. В статье представлены материалы исследований по разработке протокола создания коллекции *in vitro* для хранения сорта винограда Фиолетовый ранний в условиях замедленного роста. В проводимых исследованиях проанализировано влияние различных компонентов питательных сред на скорость ростовых процессов, а также места извлечения экспланта для дальнейшего культивирования растений. Все опыты были поставлены в лаборатории биотехнологии Всероссийского института виноградарства и виноделия имени Я.И. Потапенко по общепринятым в биотехнологии методикам. В результате исследований доказано улучшение приживаемости меристем, их ростовых характеристик, побегообразования при совместном использовании апикальных меристем и препаратов Рибавирин, салициловая кислота, Мелафен, антибиотика Цефотаксим. Выявлено замедление ростовых процессов растений при введении в состав питательной среды сахарозы, фруктозы, сорбита. Уточнение параметров применения изучаемых препаратов позволило увеличить продолжительность беспересадочного хранения растений до 10-12 месяцев, что способствует сохранению генетической чистоты и снижению затрат на последующее содержание коллекции.

**Ключевые слова:** БИОТЕХНОЛОГИЯ СОХРАНЕНИЯ, ВИНОГРАД, КОЛЛЕКЦИЯ *IN VITRO*, ГЕНОФОНД, АНТИБИОТИКИ, УГЛЕВОДЫ

approach is needed for every variety or a group of varieties. The paper presents research materials on the development of minutes for creating an *in vitro* slow growing collection for storing the Fioletovy Ranniy grapevine variety. The studies analyzed the effects of various components of nutrient medium on the rate of growth processes, as well as the place of explant extraction for further cultivation. All experiments were performed in the laboratory of biotechnology of the All-Russian Institute of Viticulture and Winemaking named after Ya.I. Potapenko according to the methods generally accepted in biotechnology. As a result of studies, the improvement of the survival rate of meristems, their growth characteristics, and shoot formation was proved due to complex use of apical meristems and preparation of Ribavirin, Melafen, and the antibiotic of Cefotaxime. The growth processes of plants was slowed down when sucrose, fructose, and sorbitol were applied to the nutrient medium. Clarification of the parameters of use of studied preparations allowed to increase in the duration of vine plants' storage up to 10-12 months without replanting, that contributes to the preservation of genetic purity and reduces the cost of future maintaining the collection.

**Key words:** CONSERVATION BIOTECHNOLOGY, GRAPEVINE, *IN VITRO* COLLECTION, GENE POOL, ANTIBIOTICS, CARBOHYDRATES

**Введение.** Проблема сохранения биоразнообразия актуальна. Ей уделяется внимание на различных уровнях – от международных фондов и научных организаций до небольших волонтерских движений. Указом Президента Российской Федерации от 7 мая 2018 года № 204 сохранение биологического разнообразия отнесено к национальным целям и стратегическим

задачам развития Российской Федерации на период до 2024 года [1]. Зачастую, когда речь идет о сохранение биоразнообразия, имеется в виду опасность утраты видов растений и животных. Наряду с сокращением числа видов идет и потеря сортов.

Если рассматривать сорт как биологический объект, то он рождается, существует какое-то время, затем исчезает – теряется и забывается среди вновь выведенных. Судьба сортов в производстве различна: одни сорта занимают большие площади и регионы, другие распространены в средней степени, ареал третьих невелик. Различия в продолжительности жизни сортов обусловлены, прежде всего, их хозяйственными достоинствами и генетической стабильностью [2].

В своей работе мы акцентируем внимание на сохранении сортового разнообразия винограда как одной из наиболее экономически значимых культур во всем мире [3-5]. Какие-то сорта стали всем известной и любимой классикой, какие-то знакомы узкому числу специалистов, или только в каком-то одном регионе, другие совсем исчезли. А ведь есть сорта, которые исторически произрастали на конкретной территории, великолепно к ней адаптированы, ценны в производственном плане, являются национальным наследием и непременно нуждаются в сохранении. Кроме того, местные сорта народной селекции и аборигенные формы, подвергшиеся естественному отбору в течение столетий, являются носителями уникальных хозяйственно ценных признаков, которые представляют особую ценность для практической селекции.

Наши исследования посвящены способу сохранения сорта винограда Фиолетовый ранний в медленно растущей коллекции *in vitro*. Этот сорт был выведен институтом ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко в 1947 году. Фиолетовый ранний полюбился многим виноградарям за неприхотливость, морозо-

устойчивость, компактность и превосходный вкус ягод с мускатным ароматом. При отжиме доля сока составляет 84 % от массы плодов. Ягоды с мускатным ароматом прекрасны и для потребления в свежем виде и как сырье для виноделия. Вина отличаются оригинальностью букета – ярко выраженным ароматом чайной розы, имеют мягкий гармоничный вкус [6].

Вопросом сохранения генофонда винограда заняты научные организации по всему миру, создавая различные типы коллекций: *in-situ* и *ex-situ* [7-10]. По количеству содержащихся образцов крупнейшие в мире коллекции находятся во Франции (7179 образцов), США (5952 образца) и Индии (3900 образцов) [11].

Одна из старейших ампелографических коллекций в мире и крупнейшая в России находится в Институте «Магарач» (существует с 1814 года) [12]. Обширная коллекция (более 4000 сортов) создана в Анапском филиале Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия [13]. Однако полевые коллекции являются трудоемкими, дорогостоящими в обслуживании и подвержены стихийным бедствиям. Кроме того, заражение болезнетворными микроорганизмами, особенно вирусами, часто встречается у виноградной лозы из-за вегетативного размножения, которое традиционно используется для этого.

Применение достижений биотехнологии в дополнение к традиционным методам сохранения биоразнообразия *ex situ* и *in situ* позволяет устойчиво управлять генетическими ресурсами. Благодаря биотехнологическим методам существует альтернативный способ хранения генетического материала – коллекции *in vitro*, которые могут быть использованы в качестве резервной копии полевых коллекций [14-17]. Такие коллекции имеют множество преимуществ, главные из которых это и оздоровленные растения, малые занимаемые площади, отсутствие сезонности работ. На сегодняшний день такие коллекции созданы и успешно функционируют [18-19].

Одно из направлений современных исследований – совершенствование существующих методов, разработка протоколов формирования и содержания растений в коллекции *in vitro* в целях повышения продолжительности беспересадочного хранения, снижения трудоемкости и затрат.

Безусловно, есть цена, а есть ценность. И если ценность сохранения растительного генофонда оценить невозможно – это мировое наследие, то цену содержания растений в коллекции можно снизить. Один из способов снижения затрат – хранение *in vitro* в условиях замедленного роста. Поддержание органов растений или целых растений в условиях, замедляющих темпы их развития, применяется для снижения затрат труда и частоты пересадок, которые могут сопровождаться риском заражения и стрессовыми условиями, создающими в конечном итоге угрозу для генетической стабильности [20].

Существует несколько методов замедления роста – снижение температуры и модификации состава питательной среды [21-23]. В нашей работе применен метод модификации питательной среды в целях снижения скорости ростовых процессов сорта винограда Фиолетовый ранний.

Цель работы – разработать протокол исследований по созданию коллекции *in vitro*, включающий введение в культуру, оптимизацию этапа ввода, регенерацию растений и подбор параметров, снижающих скорость ростовых процессов для увеличения интервала между пассажами.

**Объекты и методы исследований.** Исследования проводились с 2017 по 2020 гг. по общепринятым в биотехнологии методикам Ф.Р. Уайта (1949) [24], Р.Г. Бутенко (1964) [25], Голодрига П.Я. и др. (1986) [26], Н.П. Дорошенко (2012, 1992) [27]. Питательные среды готовили из минеральных и органических компонентов, которые для удобства группировали в отдельные растворы макроэлементов, микроэлементов, хелатного железа, витаминов,

фитогормонов, по общепринятым в биотехнологии методикам. Все исследования проводили на питательной среде Мурасиге и Скуга, модифицированной для каждого этапа микроразмножения.

Жидкая питательная среда для ввода (мг/л). *Макроэлементы*:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1237,5;  $\text{KNO}_3$  1425;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  277,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  127,5;  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  330,0. *Микроэлементы*:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  6,2;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4$  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;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  0,25; КJ 0,83. *Хелат железа*:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  27,8;  $\text{Na}_2$  ЭДТА  $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  37,3 мг/л;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  170;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  221,0. *Витамины*: мезоинозит 100,0; тиамин HCl 0,5; 6 БАП 0,5; сахараза 30,0 г/л. Для приготовления твердой питательной среды в её состав добавляется 7,5 г/л агар-агара.

Жидкая питательная среда для пролиферации пазушных почек и побегов (мг/л). *Макроэлементы*  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1650;  $\text{KNO}_3$  1900;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  370;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  170;  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  440. *Микроэлементы*:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  6,2;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$   $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4$  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;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  0,25; КJ 0,83.  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  27,8;  $\text{Na}_2$  ЭДТА  $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  37,3;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  170, 221. *Витамины*: мезоинозит 50; миамин HCl 0,5; Сахароза 30 г/л; 6-БАП 0,5-2,0; PH 5,1

Питательная среда для укоренения побегов, полученных в результате пролиферации (мг/л). *Макроэлементы*:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  212;  $\text{KNO}_3$  903;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  72;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  51;  $\text{CaCl}_2$  366. *Микроэлементы*:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  1,6;  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  6,0;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,006;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,006;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2,2;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,6; КJ 0,21; *Хелат железа*:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  7,0;  $\text{Na}_2$  ЭДТА  $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  9,3; *Витамины*: мезоинозит 50; никотиновая кислота 0,2; ИУК 0,1; сахараза 10г/л; PH 5,0-5,2.

Каждый опыт был заложен в трехкратной повторности, по 10 растений в каждой. Для проведения исследований на этапе ввода использова-

лись препараты: Рибавирин, Цефотаксим, Мелафен; на этапе микроразмножения для корректировки ростовых процессов – Цефотаксим, Гентамицин, сахараза, фруктоза, сорбит.

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. Показатели, учитываемые при регенерации и сохранении растений: приживаемость, гибель от инфекции, гибель из-за отсутствия развития, число корней, длина корней, ризогенная зона, высота, количество листьев всего и на 1 см побега, скорость роста, коэффициент полярности. Статистическая обработка результатов проведена методике Б.А. Доспехова [28].

**Обсуждение результатов.** *Отбор исходного материала.* Для ввода в культуру *in vitro* в качестве исходного материала могут использоваться побеги кустов винограда, выращенного в полевых коллекциях, либо пробирочные растения, полученные в лабораторных условиях. Для заготовки черенков отбираются визуально здоровые, хорошо развитые кусты из полевой коллекции. Наличие повреждений на листьях, побегах, сближенные междоузлия, образование двух побегов из одного глазка, пятна на листьях, скрученность листьев, осветление жилок листьев свидетельствуют о болезнях винограда и для ввода в коллекцию не используются.

Если в качестве исходных растений берут пробирочные, то признаками болезней являются пятна молочного цвета в среде, темные пятна на поверхности питательной среды, утончение и почернение корней, суховершинность растений, короткие междоузлия, ветвистость растений. Для ввода отбирают пробирки с хорошо развитыми растениями, с прямыми стеблями, зелеными листьями, чистой питательной средой. Черенки пробирочных растений, выращенные в лабораторных условиях, в дополнительной стерили-

зации не нуждаются. Если в качестве экспланта для дальнейшего микроразмножения выбирают меристемы пробирочных растений, то следует отдавать предпочтение почкам из нижней и средней части побегов, так как такие меристемы характеризуются большей приживаемостью.

*Стерилизация.* Черенки, заготовленные в полевых условиях, подвергаются в лаборатории ступенчатой стерилизации. Для этого их нарезают на сегменты длиной 1-2 см с одним междоузлем. Затем их помещают в емкость и подвергают поэтапной стерилизации.

1. Мыльный раствор. Емкость с нарезанными черенками заливают водой с двумя каплями жидкого мыла и встряхивают 2 минуты. Мыльный раствор сливают.

2. Дистиллированная вода. Емкость с черенками заливают на две минуты дистиллированной водой, встряхивают и воду сливают.

3. Выдерживают 40 секунд в 70 %-ном спирте.

4. Выдержка в 0,8 %-ном растворе  $\text{AgNO}_3$ : 10 мин для вызревших побегов, 5-7 мин для незревших.

5. В стерильном боксе сегменты переносят в химический стакан с дистиллированной стерильной водой и выдерживают по 2 минуты 5 раз, при этом меняя воду.

*Ввод.* Работа по выделению меристем, высадке эксплантов, проводится в ламинарном боксе под бинокулярным микроскопом при 25-кратном увеличении. При помощи пинцета и скальпеля из побегов вычлениают апикальные меристемы. На культивирование на этапе ввода используют пробирки размером  $20 \times 72$  мм. В каждую пробирку высаживают по одной меристеме на твердую питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) (по прописи). Пробирки закрывают фольгой и размещают в культуральной комнате на 2-3 недели при температуре 23-28 °С. Освещенность в первую неделю 800-1000 лкс, затем увеличивают до 2-5 тыс. лкс.

При выделении меристем из черенков полевых растений среда МС для ввода дополняется Рибавирином в концентрации 5-10 мг /л, Цефотаксимом – 200 мг/л и Мелафеном в концентрации  $10^{-7}$ . Рибавирин и Цефотаксим вносят после автоклавирования среды и охлаждения ее до 50 °С (табл. 1).

Таблица 1 – Влияние препарата Мелафен на приживаемость меристем, 2019 г.

Вариант	Отсутствие развития меристем (шт.) по дням пролиферации						
	15 суток	30 суток	45 суток	60 суток	75 суток	90 суток	Всего
Контроль	1	1	1	3	–	–	6
$10^{-5}$	1	1	1	–	–	–	3
$10^{-7}$	1	–	2	–	–	–	3
$10^{-9}$	3	2	–	–	1	9	15
$10^{-11}$	1	1	3	5	1	–	11
Всего на пассаж	7	5	7	8	2	9	38

Табличные данные демонстрируют, что лучшая приживаемость была в концентрациях  $10^{-5}$ - $10^{-7}$ .

*Пролиферация.* При достижении меристемами размеров 3 мм и более их переносят на жидкую питательную среду для прохождения этапа пролиферации в конические колбы Эрленмейера (100 мл) с мостиками из фильтровальной бумаги. Питательная среда МС для пролиферации – по прописи. Толщина слоя среды в колбе 2 мм (около 10-12 мл). Учеты и пересадку эксплантов на свежую питательную среду проводят через 14 дней.

*Укоренение побегов и одноглазковых черенков.* После образования побегов высотой 20-25 мм с 3-5 листьями их отделяют от конгломератов и высаживают на укоренение на твердую питательную среду МС с уменьшенным содержанием макроэлементов, сахарозы (10 г/л) и 0,1 мг/л ИУК. Укоренение побегов проводят при освещенности 3-5 тыс. люксов на протяжении 14-16 часов при температуре 20–25 °С в темный и 25-30 °С в световой периоды.

*Микрочеренкование.* Пробирочные растения, выращенные *in vitro*, разделяют на однопочковые микрочеренки, которые используют в качестве вторичных эксплантов. Микрочеренки высаживают на модифицированную среду МС с уменьшенным содержанием ИУК и макроэлементов. Оптимальное расположение микрочеренков – наклонное, размер – 0,8 см (табл. 2).

Таблица 2 – Влияние размера микрочеренков и их ориентации в пространстве на приживаемость и развитие растений винограда сорта Фиолетовый ранний, 2019-2020 гг.

Расположение и размер микрочеренка	Корни			Высота, см	Число листьев на 1 см побега	Скорость роста, мм/сутки	Коэффициент полярности
	число, шт	длина, см	ризогенная зона, см				
39 суток							
Наклонно 0,7–0,8 см	3,0	1,1	3,3	1,2	0,8	0,3	2,8
Наклонно 1,5 см	2,7	1,4	3,8	1,6	0,9	0,4	2,5
Наклонно 0,5 см	3,1	1,3	4,0	0,7	0,8	0,2	6,7
Вертикально	2,8	0,8	2,2	0,8	1,1	0,2	2,9
Горизонтально	5,6	1,1	6,2	0,5	0,5	0,1	5,2
НСР <sub>0,95</sub>	0,9	–		–			
65 суток							
Наклонно 0,7–0,8 см	3,2	1,9	6,1	3,8	0,7	0,6	1,6
Наклонно 1,5 см	3,0	2,0	6,0	3,9	0,8	0,6	1,7
Наклонно 0,5 см	3,5	1,8	6,3	2,0	0,9	0,3	3,4
Вертикально	3,1	1,6	5,0	2,8	0,8	0,4	1,8
Горизонтально	5,3	1,7	9,0	1,4	0,4	0,2	3,0
НСР <sub>0,95</sub>	1,1	–		–			

Выбирая эксплант для микрочеренкования, следует отдавать предпочтение верхней части побегов. Исследования показали, что растения, иницированные из верхней части побега, имели хорошую приживаемость (до 100 %) и сохранность (до 340 суток). При этом отмечается умеренное развитие ризогенной зоны, побегов, облиственности у растений из верхней части побегов, что особенно важно при создании медленно растущей коллекции (табл. 3).

Таблица 3 – Рост и развитие растений, иницированных из разных частей побега, сорт Фиолетовый ранний, 2019–2020 гг.

Вариант	Корни			Высота, см	Число листьев, шт.		Скорость роста, мм/сутки	Коэффициент полярности
	число, шт.	длина, см	ризогенная зона, см		всего	на 1 см побега		
39 дней культивирования								
Верх	3,0	1,0	3,0	2,0	1,0	0,5	0,5	1,5
Середина	2,5	0,8	2,0	2,5	2,0	0,8	0,6	0,8
Низ	1,0	0,3	0,3	0	0	0	0	0
75 дней культивирования								
Верх	3,0	2,9	8,7	3,0	3,0	1,0	0,4	2,9
Середина	2,5	0,9	2,3	4,3	5,0	1,2	0,6	0,5
Низ	1,5	2,7	4,1	0	0	0	0	0
117 дней культивирования								
Верх	3,0	2,8	8,4	3,5	5,0	1,4	0,3	2,4
Середина	4,0	0,8	3,2	4,3	4,9	1,1	0,4	0,7
147 дней культивирования								
Верх	3,0	2,6	7,8	5,0	8,0	1,6	0,3	1,6
Середина	5,5	1,0	5,5	5,0	6,5	1,3	0,3	1,1
230 дней культивирования								
Верх	4,0	2,4	9,6	6,0	9,0	1,5	0,3	1,6
280 дней культивирования								
Верх	3,5	2,8	9,8	6,0	9,0	1,5	0,2	1,6
313 дней культивирования								
Верх	3,0	3,3	9,3	6,2	8	1,3	0,2	1,5
341 дней культивирования								
Верх	3,0	3,1	9,9	7,0	8	1,1	0,2	1,4

Данные таблицы 3 демонстрируют, что растения, иницированные из нижней и средней части побегов, уступают по количеству времени нахождения в культуре растениям из верхней части.

*Применение антибиотиков.* При клональном микроразмножении растений часто возникает опасность появления в них внутренних бактериальных инфекций. Иногда контаминация является прямым следствием использования инфицированного экспланта. Кроме того, источником контаминации могут явиться компоненты питательных сред. Реальным и достаточно

распространенным источником контаминации является внутрилабораторная передача инфекции из воздуха, от персонала, от используемых препаратов и от одной культуры клеток к другим.

Совместное культивирование в одном помещении контаминированных и свободных от микоплазм клеток уже через 1-2 пассажа приводит к инфицированию последних. В таком случае проводят антибактериальную химиотерапию, основанную на применении антибиотиков. Использование антибиотиков основано на их свойстве подавлять развитие патогенной микрофлоры. Кроме того, антибиотики, как и другие микробные метаболиты, могут оказывать непосредственное воздействие на обмен веществ и развитие растений. Антибиотики могут оказывать и стимулирующее влияние на рост и развитие растений, определенным образом активировать отдельные процессы и функции.

Мы рекомендуем для подавления бактериальных инфекций и замедления ростовых процессов антибиотики Цефотаксим в концентрации 100-200 мг/л или Гентамицин в концентрации 0,01 мл/л. Результаты испытаний антибиотика Гентамицин представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Влияние антибиотика Гентамицин на приживаемость и развитие растений винограда сорта Фиолетовый ранний, 2019–2020 гг.

Гентамицин, мл/л	Гибель, %		Приживаемость, %	Корни			Высота, см	Число листьев, шт.		Скорость роста, мм/сутки
	ГИ	ОР		число, шт.	длина, см	ризогенная зона, см		всего	на 1 см побега	
30 дней культивирования										
Контроль	0	0	100	1,9	1,4	2,7	1,4	1,7	1,2	0,5
0,005	13,3	0	86,7	1,8	1,1	2,0	1,2	1,0	0,9	0,5
0,01	10,0	0	90,0	2,4	0,7	1,7	1,2	1,2	1,1	0,4
0,03	6,7	0	93,3	1,7	0,3	0,5	1,0	1,3	1,3	0,3
0,05	3,3	0	96,7	0,9	0,2	0,2	0,4	0,8	2,1	0,1
НСР <sub>0,95</sub>				0,9	0,03		0,7			

Гентамицин, мл/л	Гибель, %		Приживаемость, %	Корни			Высота, см	Число листьев, шт.		Скорость роста, мм/сутки
	ГИ	ОР		число, шт.	длина, см	ризогенная зона, см		всего	на 1 см побега	
122 дней культивирования										
Контроль	6,7	10	83,3	2,0	2,6	5,2	11,9	11,8	1,0	0,97
0,005	13,3	0	86,7	1,9	2,8	5,3	7,4	9,8	1,3	0,6
0,01	10,0	23,3	66,7	2,9	1,4	4,1	7,0	8,6	1,2	0,6
0,03	10,0	40	50,0	2,0	0,5	1,0	4,3	7,3	1,8	0,4
0,05	16,6	46,7	36,7	1,7	0,9	1,5	2,7	5,8	2,4	0,2
НСР <sub>0,95</sub>				1,8	1,4		2,5			
220 дней культивирования										
Контроль	6,7	30	63,3	3,0	2,9	8,7	15,2	15,7	1,0	0,69
0,005	13,3	0	86,7	3,2	4,0	12,8	11,7	16,9	1,5	0,5
0,01	10,0	23,3	66,7	4,6	1,9	8,7	12,9	16,2	1,3	0,6
0,03	10,0	53,3	36,7	4,7	1,0	4,7	5,9	12,2	2,1	0,3
0,05	16,6	60	23,3	3,2	1,3	4,2	6,0	13,1	2,4	0,3
НСР <sub>0,95</sub>				–	1,4	4,8	4,6			

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

Углеводы в питательной среде являются источником энергии для культивируемых растений и основным осмотическим агентом. Относительно универсальным рекомендуемым источником углеводного питания является сахароза в концентрации 20-40 г/л. Однако некоторые исследователи для ряда культур предлагают альтернативные источники углеводного питания в качестве более эффективного заменителя сахарозы. Среди биотехнологических методов создания условий для замедленного роста – применение осмотиков. Осмотики – вещества, имитирующие для растения недостаток влаги. Сахароза находит широкое применение в качестве осмотика.

Опыт по изучению влияния концентрации сахарозы на рост и развитие растений винограда сорта Фиолетовый ранний демонстрирует высокую приживаемость. Самая высокая приживаемость отмечена при концентрации сахарозы 60 г/л-82,1 %; в контроле 75,0 %. При минимальной ее 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.

Фруктоза или плодовый сахар  $C_6H_{12}O_6$  – моносахарид, в качестве моносахаридного звена входит в состав сахарозы. По строению фруктоза представляет собой шестиатомный кетонспирт. Лучшая сохранность растений в течение 7 месяцев культивирования выявлена на среде с сахарозой (контроль) и в варианте минимальной концентрации фруктозы –5,0 г/л. Больше половины растений сохранилось при концентрациях фруктозы 10,0 и 20,0 г/л. Резко снизилась приживаемость в вариантах с содержанием фруктозы 40,0 особенно 60,0 г/л, что указывает на токсичность для растений такого количества углевода в питательной среде. При сравнении сахарозы и фруктозы в одинаковой концентрации (20,0 г/л) установлено, что сахароза больше способствовала сохранности растений (86,7 %), чем фруктоза (60,0 %).

Торможение роста побегов было отмечено уже через 3 месяца культивирования. Наиболее явным оно было при концентрациях фруктозы 20,0; 40,0 и 60,0 г/л. При концентрациях 5,0 и 10,0 г/л рост побегов приближался к контрольному.

В опытах с использованием сорбита максимальная сохранность растений отмечена в варианте 7,5 г/л-92,9 % (контроль 64,3 %). В варианте 10 г/л сохранность была на уровне контрольной. Необходимо отметить вариант с концентрацией сорбита 30 г/л, где сохранность хотя и была несколько ниже контрольной, но в совокупности с явным торможением ростовых процессов она может быть рекомендована для применения при хранении растений в коллекции.

Плотность питательной среды также оказывает влияние на скорость ростовых процессов. В вариантах с содержанием агар-агара 8,0 мг/л и выше отмечено уменьшение длины ризогенной зоны в 1,1-1,2 раза. Также в 1,2 раза

уменьшились рост и облиственность растений. То есть, происходит замедление ростовых процессов при достаточно высокой приживаемости растений, что необходимо для создания коллекции генофонда винограда *in vitro*.

**Выводы.** Впервые разработана схема введения в культуру и подготовки к депонированию, объединяющая оптимизацию ввода, стимулирование регенерации и замедления скорости ростовых процессов для сорта Фиолетовый ранний.

На основании проведенных четырехлетних исследований разработан протокол создания банка асептических растений в генетической коллекции *in vitro*, состоящей из трех блоков:

- подготовка и ввод растений в культуру (а – из побегов винограда полевой коллекции; б – из растений, выращенных *in vitro*);
- регенерация, тиражирование, подготовка растений к хранению;
- формирование медленнорастущей коллекции, на основании модификация питательных сред при помощи антибиотиков и альтернативных источников углеводов.

На основании протокола исследований продолжительность беспересадочного хранения составила 10-12 и более месяцев, что способствовало сохранению генетической стабильности растений повышению экономической эффективности хранения.

#### Литература

1. Сохранение биоразнообразия [электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.mnr.gov.ru/press/news/sokhranenie\\_bioraznoobraziya\\_prioritet\\_minprirody\\_rossii/](https://www.mnr.gov.ru/press/news/sokhranenie_bioraznoobraziya_prioritet_minprirody_rossii/)
2. Биологическое сортоведение [электронный ресурс]. Режим доступа: <http://agropost.ru/rastenievodstvo/zemledelie/biologicheskoe-sortovedenie-rasteniy-v-sov-rast.html>
3. Ahmed Ali Al-Aizari, Rashid S. Al-Obeed, Mahmoud A.H. Mohamed Improving micropropagation of some grape cultivars via boron, calcium and phosphate // Electronic Journal of Biotechnology. – 2020. – № 48. –P. 95-100.
4. Tehrim S. and Sajid G.M., Conservation and its Implications for Grape Germplasm Biodiversity Romanian \ Biotechnological Letters. – 2011– Vol. 16. – No. 6.
5. Bi Wen-Lu, Pan Chen, Hao Xin-Yi, et al. Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.)– a review Plan t// In vitro cellular & developmental biology. – 2017. – V.53. – №.5. – P. 449-460.

6. Трошин Л.П., Радчевский П.П. Районированные сорта винограда России. Краснодар, 2005. 176 с.

7. Maletić E., Pejić I., Karoglan Kontić J., Zdunić G. et al. Ampelographic and genetic characterization of Croatian grapevine varieties // *Vitis* 54. – 2015 (Special Issue), P. 93–98.

8. Cheng Yuan ; Wan DongYan ; Zhang BaoLin ; Wang YueJin ; Wen Ying Qiang Induction, preservation, propagation and cytological observation of pro-embryonic masses of grapevine // *Journal of Fruit Science*. – 2017. – Vol.34. – No.8. – P. 968-976.

9. Margaryan K., Maul E., Muradyan Z. et al. Armenian national grapevine collection: Conservation, characterization and prospects // *BIO Web Conf.* – 2019. –Vol 12. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191201002>.

10. Tsvetkov I., Dzhambazova T., KondakovaV., Batchvarova R. *In vitro* Long-term Storage and Regeneration of Bulgarian Grapevine Variety “Velika” via Repetitive Somatic Embryogenesis // *Universal Journal of Plant Science*. – 2014. – 2(2). – P. 48-51, DOI: 10.13189/ujps.2014.020204.

11. Dettweiler E., This P., Eibach R. The European network for grapevine genetic resources conservation and characterization // *XXV Congres mondial de la vigne et du Vin*. // *Franse*. – 2004. – P. 1–10.

12. Polulyakh A.A., Volynkin V.A., Likhovskoi V.V. Problems and prospects of grapevine genetic resources preservation at "Magarach" Institute // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. – 2017. –Vol. 21. – No.6. – P. 608-616.

13. Большаков В.А., Лукьянова А.А., Коваленко А.Г. Высококачественные столовые сорта винограда в Анапской ампелографической коллекции // *Научная жизнь*. 2018. № 10. С. 126-133.

14. F.K. Pilatti, T. Aguiar, T. Simões, et al. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 47, 82-98 (2011). <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9302-y>.

15. Reed B.M., Sarasan V., Kane M., Bunn E., Pence V.C. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools // *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. – 2011. – Vol. 47. – № 1. – P. 1-4.

16. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. – 2011. – Vol. 47. P. 5-16.

17. Deepa A.V., Thomas T.D. *In vitro* strategies for the conservation of Indian medicinal climbers // *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*. – 2020 – № 56. – P. 784-802. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10084-x>.

18. Barnicoat H., Cripps R., Kendon J., Sarasan V. Conservation *in vitro* of rare and threatened ferns—case studies of biodiversity hotspot and island species // *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant*. – 2011. – № 47. –P. 37–45. <http://doi.org/10.1007/s11627-010-9303-x>.

19. Rafael de Carvalho Silva, Zanderluce Gomes Luis and Jonny Everson Scherwinski-Pereira. Short-term storage *in vitro* and large-scale propagation of grapevine genotypes // *Pesq. agropec. Bras.* – 2012. – 47. – №.3. P. 344-350. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000300005>.

20. Doroshenko N. and Puzirnova V. Biotechnological methods of preservation of the grape gene pool in the *in vitro* collection // *BIO Web Conf.* – 2020. – № 25. 04001. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20202504001>.

21. El-Hawaz R.F., Adelberg J., Naylor-Adelberg J. et al., The effect of slow-growth strategy on a production of *Petunia × hybrida* Vilm. Microcuttings // *In Vitro Cell.Dev.Biol. Plant*. – 2019. – 55. P. 433–441 <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09996-0>.

22. Alzubi H., Yepes L.M. & Fuchs M. *In vitro* storage of micropropagated grapevine rootstocks at low temperature // *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. – 2019. –№ 55.–P. 334–341 <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09980-8>.

23. Sabah A. Hassanen, A.I.A. Abido, M.A.M. Aly and G.A. Rayan, In vitro Preservation of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Muscat of Alexandria and Black Monukka Cultivars as Genetic Resource // African Journal of Basic & Applied Sciences. –2013. –№ 5 (2). – P. 55–63.

24. Уайт Ф.Р. Культура растительных тканей. М.: Иностранная литература, 1949. 160 с.

25. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 272 с.

26. Методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда / П.Я. Голодрига [и др.] // ВНИИВиПП «Магарач». Ялта, 1986. 56 с.

27. Дорошенко Н.П. Клональное микроразмножение и оздоровление посадочного материала винограда для создания из него сортовых маточников интенсивного типа (рекомендации) / Министерство сельского хозяйства и продовольствия РСФСР. Москва, 1992.

28. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Колос, 1965. 424 с.

### References

1. Sohranenie bioraznoobraziya [elektronnyj resurs]. Rezhim dostupa: [https://www.mnr.gov.ru/press/news/sokhranenie\\_bioraznoobraziya\\_prioritet\\_minprirody\\_rossii/](https://www.mnr.gov.ru/press/news/sokhranenie_bioraznoobraziya_prioritet_minprirody_rossii/)

2. Biologicheskoe sortovedenie [elektronnyj resurs]. Rezhim dostupa: <http://agropost.ru/rasteniievodstvo/zemledelie/biologicheskoe-sortovedenie-rasteniy-v-sov-rast.html>.

3. Ahmed Ali Al-Aizari, Rashid S. Al-Obeed, Mahmoud A.H. Mohamed Improving micropropagation of some grape cultivars via boron, calcium and phosphate // Electronic Journal of Biotechnology. – 2020. – № 48. –R. 95-100.

4. Tehrim S. and Sajid G.M., Conservation and its Implications for Grape Germplasm Biodiversity Romanian \\\ Biotechnological Letters. – 2011– Vol. 16. – No. 6.

5. Bi Wen-Lu, Pan Chen, Hao Xin-Yi, et al. Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.)— a review Plan t/ In vitro cellular & developmental biology. – 2017. – V.53. – №.5. – R. 449-460.

6. Troshin L.P., Radchevskij P.P. Rajonirovannye sorta vinograda Rossii. Krasnodar, 2005. 176 s.

7. Maletić E., Pejić I., Karoglan Kontić J., Zdunić G. et al. Ampelographic and genetic characterization of Croatian grapevine varieties // *Vitis* 54. – 2015 (Special Issue), R. 93–98.

8. Cheng Yuan; Wan DongYan; Zhang BaoLin; Wang Yue-Jin; Wen Ying Qiang Induction, preservation, propagation and cytological observation of pro-embryonic masses of grapevine // Journal of Fruit Science. – 2017. – Vol.34. – No.8. – R. 968-976.

9. Margaryan K., Maul E., Muradyan Z. et al. Armenian national grapevine collection: Conservation, characterization and prospects // BIO Web Conf. – 2019. –Vol 12. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191201002>.

10. Tsvetkov I., Dzhambazova T., Kondakova V., Batchvarova R. *In vitro* Long-term Storage and Regeneration of Bulgarian Grapevine Variety “Velika” via Repetitive Somatic Embryogenesis // Universal Journal of Plant Science. – 2014. – 2(2). – R. 48-51, DOI: 10.13189/ujps.2014.020204.

11. Dettweiler E., This P., Eibach R. The European network for grapevine genetic resources conservation and characterization // XXV Congres mondial de la vigne et du Vin. // Franse. – 2004. – R. 1–10.

12. Polulyakh A.A., Volynkin V.A., Likhovskoi V.V. Problems and prospects of grapevine genetic resources preservation at "Magarach" Institute // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. – 2017. –Vol. 21. – No.6. – R. 608-616.

13. Bol'shakov V.A., Luk'yanova A.A., Kovalenko A.G. Vysokokachestvennyye stolovye sorta vinograda v Anapskoj ampelograficheskoj kollekcii // Nauchnaya zhizn'. 2018. № 10. S. 126-133.

14. F.K. Pilatti, T. Aguiar, T. Simões, et al. In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant 47, 82-98 (2011). <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9302-y>.

15. Reed B.M., Sarasan V., Kane M., Bunn E., Pence V.C. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools // *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. – 2011. – Vol. 47. – № 1. – R. 1-4.

16. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. – 2011. – Vol. 47. R. 5-16.

17. Deepa A.V., Thomas T.D. In vitro strategies for the conservation of Indian medicinal climbers // *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. – 2020 – № 56. – R. 784–802. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10084-x>.

18. Barnicoat H., Cripps R., Kendon J., Sarasan V. Conservation in vitro of rare and threatened ferns—case studies of biodiversity hotspot and island species // *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant*. – 2011. – № 47. –R. 37–45. <http://doi.org/10.1007/s11627-010-9303-x>.

19. Rafael de Carvalho Silva, Zanderluce Gomes Luis and Jonny Everson Scherwinski-Pereira. Short-term storage in vitro and large-scale propagation of grapevine genotypes // *Pesq. agropec. Bras.* – 2012. – 47. – №.3. R. 344-350. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000300005>.

20. Doroshenko N. and Puzirnova V. Biotechnological methods of preservation of the grape gene pool in the in vitro collection // *BIO Web Conf.* – 2020. – № 25. 04001. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20202504001>.

21. El-Hawaz R.F., Adelberg J., Naylor-Adelberg J. et al., The effect of slow-growth strategy on a production of *Petunia × hybrida* Vilm. Microcuttings // *In Vitro Cell.Dev.Biol. Plant*. – 2019. – 55. R. 433–441 <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09996-0>.

22. Alzubi H., Yepes L.M. & Fuchs M. In vitro storage of micropropagated grapevine rootstocks at low temperature // *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. – 2019. –№ 55.–R. 334–341 <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09980-8>.

23. Sabah A. Hassanen, A.I.A. Abido, M.A.M. Aly and G.A. Rayan, *In vitro* Preservation of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Muscat of Alexandria and Black Monukka Cultivars as Genetic Resource // *African Journal of Basic & Applied Sciences*. –2013. –№ 5 (2). –R. 55–63.

24. Uajt F.R. Kul'tura rastitel'nyh tkanej. M.: Inostrannaya literatura, 1949. 160 s.

25. Butenko R.G. Kul'tura izolirovannyh tkanej i fiziologiya morfogeneza rastenij. M.: Nauka, 1964. 272 s.

26. Metodicheskie rekomendacii po klonal'nomu mikrorazmnozheniyu vinograda / Golodriga P.Ya. [i dr.] // VNIIViPP «Magarach». Yalta, 1986. 56 s.

27. Doroshenko N.P. Klonal'noe mikrorazmnozhenie i ozdorovlenie posadochnogo materiala vinograda dlya sozdaniya iz nego sortovyh matochnikov intensivnogo tipa (rekomendacii) / Ministerstvo sel'skogo hozyajstva i prodovol'stviya RSFSR. Moskva, 1992.

28. Dospexhov B.A. Metodika polevogo opyta (s osnovami statisticheskoy obrabotki rezul'tatov issledovanij). M.: Kolos, 1965. 424 s.