

*Н. Н. Зеленинская,  
Л. В. Джабурия,  
Н. И. Теслюк,  
Н. В. Подуст,  
Е. И. Гоголинская*

Национальный научный центр  
«Институт виноградарства и виноделия им. В. Е. Таирова»,  
Украина

## МЕТОДЫ ХРАНЕНИЯ КОЛЛЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА ВИНОГРАДА В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

*Приведены результаты исследований хранения ценных генотипов винограда в медленнорастущей коллекции in vitro. С целью минимализации ростовых процессов к питательной среде MS добавляли гидроабсорбент теравет и осмотические ингибиторы - маннит, сорбит. Выделены оптимальные питательные среды, содержащие сорбит и маннит в количестве 60 мг/л. Показана целесообразность культивирования медленнорастущей коллекции винограда поочередно в условиях культурального бокса и при сниженной температуре.*

**Ключевые слова:** in vitro, медленнорастущая коллекция, гидроабсорбент, маннит, сорбит, условия культивирования.

**Вступление.** В основе хранения ценного растительного материала лежит создание разнообразных коллекций. Чаще всего с этой целью для большинства растений создают банки семян. Но для вегетативно размножаемых растений и растений, семена которых не переносят подсушивание, такой метод хранения неприемлем [1]. Конечно, тогда можно создать биосферные заповедники или заложить коллекционные насаждения. Но эти мероприятия, кроме того, что являются достаточно дорогими, требуют больших земельных участков, постоянного ухода, они еще и не обеспечивают надежного хранения уникальных генотипов (может наблюдаться потеря материала через неблагоприятное влияние биотических и абиотических факторов). Поэтому, для решения этой проблемы применяют методы культуры изолированных тканей и органов in vitro [1, 2, 3].

На сегодняшний день рассматривается три основных направления хранения растительного материала в культуре in vitro: хранение культур в условиях, которые способствуют нормальной скорости роста; хранение культур в условиях минимального роста; хранение культур в условиях прекращения роста. Каждый из выше названных способов характеризуется определенными особенностями. Хранение в условиях нормального роста ничем не отличается от обычного культивирования и поэтому нуждается в постоянном внимании и частых пересадках растений на новые питательные среды [4]. Метод хранения в замороженном состоянии наиболее сложен, так как требует специального оборудования, подготовки растительного материала и способов замораживания. В результате чего риск потери коллекции достаточно высок. Хранение коллекции в условиях минимального роста имеет ряд преимуществ, поскольку материал, который хранится, всегда готовый для последующего размножения и использования [5, 6].

**Целью нашей работы было** разработать оптимальные способы хранения ценного материала винограда в коллекции in vitro.

**Материал и методы исследований.** Работа была выполнена в группе культуры тканей и органов in vitro отдела питомниководства и размножения винограда ННЦ „ИВиВ им. В.Е.Таирова”. Исследования проводили на столовом сорте винограда Кардишах и подвойном сорте - Добрыня. Для введения в коллекцию in vitro использовали одноглазковые черенки одинаковые по размеру и пассажу. За основу была взята питательная среда Мурасиге и Скуга (MS).

Схема опыта включала следующие варианты: 1 - MS по прописи (контроль 1); 2 - MS безгормональная (контроль 2); 3 - MS + маннит 40 мг/л; 4 - MS + маннит 60 мг/л; 5 - MS + сорбит 40 мг/л; 6 - MS + сорбит 60 мг/л; 7 - MS + теравет 2 г/л; 8 - MS + сорбит 40 мг/л + теравет 2 г/л; 9 - MS + сорбит 60 мг/л + теравет 2 г/л; 10 - MS + маннит 40 мг/л + теравет 2 г/л; 11 - MS + маннит 60 мг/л + теравет 2 г/л.

Культивирование коллекции проводили: 1) в условиях культурального бокса при температуре +24 - +25 °С, освещении –2300-2500 лк., с фотопериодом –16 часов в сутки; 2) в хладотермостате при

температуре 10 °С, без освещения и с минимальным освещением 500-700 лк.; 3) путем чередования условий культивирования. В процессе исследований определяли: приживаемость растений (%), длину побегов (см), количество узлов, количество листьев, количество корней (шт.). Через 6 и 8 месяцев культивирования в коллекции *in vitro* устанавливали процент жизнеспособных растений.

**Результаты исследований.** Работа выполнялась в два этапа. На первом этапе изучали влияние осмотических ингибиторов и гидроабсорбентов в составе питательных сред на минимализацию ростовых процессов и увеличение периода между пересадками в условиях культурального бокса. Через 25 дней культивирования было установлено, что по сравнению с контролем 1, приживаемость инициальных эксплантов на всех опытных питательных средах было ниже в среднем на 10-19 % для сорта Добрыня и на 6-25 % для сорта Кардишах (Рис. 1).

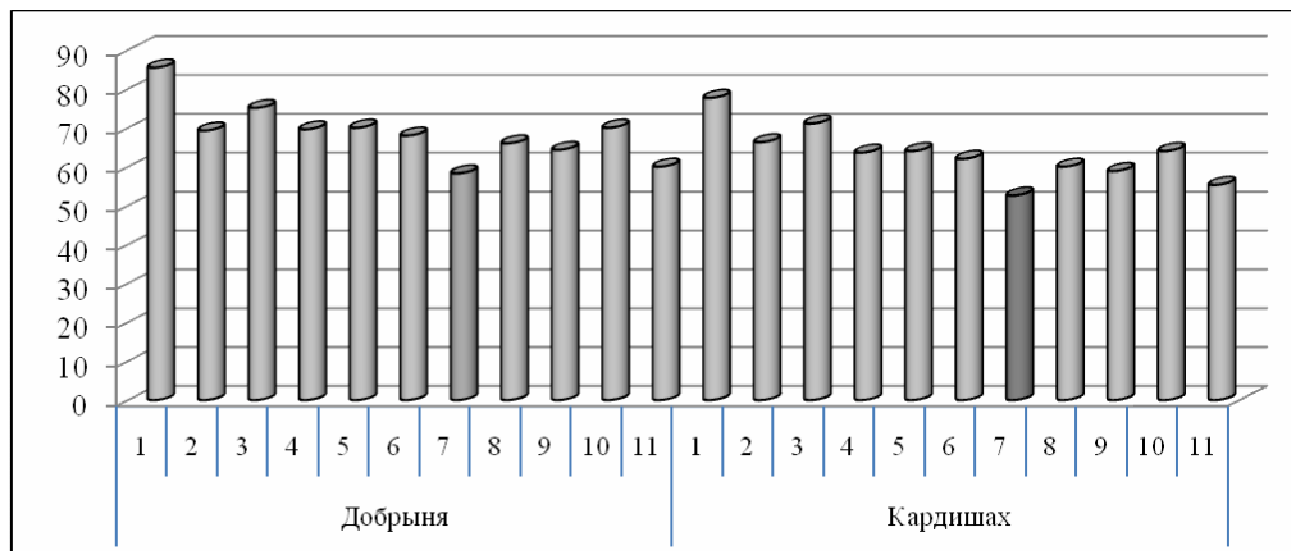


Рис. 1 Приживаемость инициальных эксплантов винограда в коллекции *in vitro*, %

Количество эксплантов, у которых наблюдали развитие пазушной почки, в контрольных вариантах составляло 87 % (сорт Добрыня) и 79 % (сорт Кардишах), от общего количества высаженных эксплантов (Табл. 1).

Таблица 1

**Развитие инициальных эксплантов винограда на модифицированных питательных средах в медленнорастущей коллекции, %**

Вариант опыта	Добрыня		Кардишах	
	пролиферация	ризогенез	пролиферация	ризогенез
MS по прописи	87,5	90,1	79,5	80,0
MS безгормональная	63,3	73,3	55,3	60,6
MS + маннит 40 мг/л	60,0	63,0	50,8	59,2
MS + маннит 60 мг/л	50,0	55,2	46,0	53,0
MS + сорбит 40 мг/л	55,3	62,6	48,9	56,8
MS + сорбит 60 мг/л	46,6	55,6	44,0	51,9
MS + теравет 2 г/л	24,3	34,6	20,0	15,0
MS + сорбит 40 мг/л + теравет 2 г/л	41,9	52,6	35,5	38,8
MS + сорбит 60 мг/л + теравет 2 г/л	37,6	40,0	20,6	36,6
MS + маннит 40 мг/л + теравет 2 г/л	54,8	60,6	44,6	54,0
MS + маннит 60 мг/л + теравет 2 г/л	46,0	56,6	37,1	50,1

Наименьшее количество эксплантов с пролиферацией было на питательной среде с добавлением гидроабсорбента теравет и составляло, например, у подвойного сорта Добрыня 24 %. Несколько большим был этот показатель в вариантах с питательными средами, в состав которых входил теравет и сорбит или маннит наибольших рабочих концентраций. Так, в варианте сорбит

60 мг/л + теравет 2 г/л по сравнению с вариантом 7, где использовали чистый теравет этот показатель увеличивался на 13-21 % и достигал 37 %, в варианте маннит 60 мг/л + теравет 2 г/л - на 46 %. Это на 40-42% меньше чем в контрольном варианте на ростовой среде и на 20-25 % - чем на безгормональной питательной среде.

Проведение учета образования корней у эксплантов и микроклонов винограда в медленнорастущей коллекции показало, что процесс ризогенеза начинался намного раньше в контрольном варианте на ростовой MS. Так, например, у сорта Кардишах на 25 день исследований в этом варианте 80 % черенков имели корни или их зачатки. От 52 % до 60 % черенков с корнями было в вариантах на безгормональной питательной среде и на средах с маннитом и сорбитом. В вариантах с добавлением теравета и теравета с сорбитом или маннитом количество черенков, которые имели корни было в пределах от 40 до 15 %. Следует отметить, что на питательных средах с добавлением осмотических ингибиторов и гидроабсорбента отмечали формирование разветвленной корневой системы, которая характеризовалась большим количеством корней II порядка.

Таким образом, приведенные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что в опытных вариантах начальные процессы развития инициальных эксплантов начинаются намного позже, что особенно характерно для вариантов 7,8,9,10,11. Соответственно период культивирования в этих вариантах был более продолжительным.

В дальнейшем исходя из биометрических показателей развития растений на разных питательных средах было установлено, что на обычной ростовой среде (контроль) первую и последующие пересадки проводили через 2,5-3,0 месяца, так как высота растений достигала 10-12 см. Благодаря наличию в питательной среде (опытные варианты) осмотически активных веществ первую пересадку растений осуществляли через 4-6 месяцев культивирования. Медленнее всего развивались растения в вариантах с добавлением к питательным средам таких веществ как теравет и сорбит в количестве 60 г/л, смесь теравета с сорбитом и маннитом. С учетом того, что среднемесячный прирост побегов микроклонов в этих вариантах составлял от 0,6 см до 2,5 см, то первую пересадку осуществляли через 6 мес. культивирования.

На втором этапе работы мы учитывали не только влияние осмотически активных веществ, которые входили в состав питательной среды, но и влияние сниженной положительной температуры. Культивирование медленнорастущей коллекции *in vitro* проводили: - при температуре 10 °С без освещения; - при температуре 10 °С с минимальным освещением и - чередовали условия: 15 суток в условиях культурального бокса, 15 суток в условиях хладотермостата при температуре 10 °С.

В процессе работы была показана нецелесообразность применения первых двух приемов для винограда, что совпадает с литературными данными [7]. Поэтому дальнейшее культивирование коллекции мы проводили поочередно в культуральном боксе и при сниженной температуре в хладотермостате. Такой способ поддержания коллекции винограда в условиях *in vitro* позволял увеличить период между пересадками растений до 8-8,5 месяцев (Рис. 3).

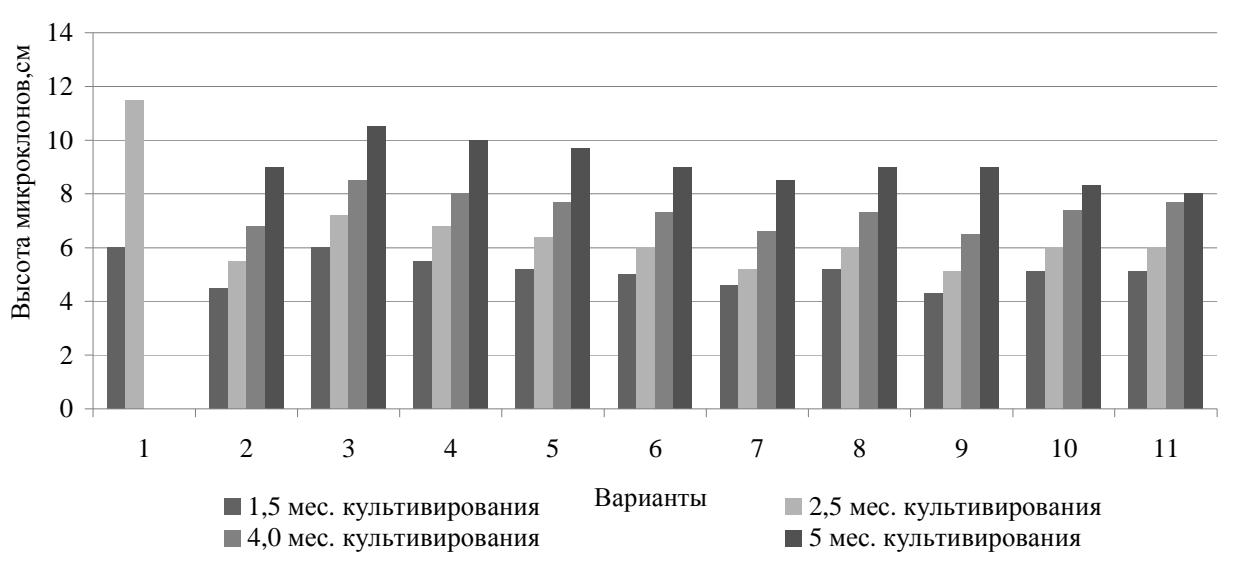


Рис. 3. Изменение высоты микроклонов винограда при хранении *in vitro*, см

В период до 5 – 6 месяцев культивирования высота растений увеличивалась у всех сортов, в среднем на 1-2 см. Начиная с 5,0-5,5 месяцев культивирования высота растений уменьшилась за счет усыхания верхушки основного побега. Но это не сопровождалось гибелью растений так, как начинался процесс пролиферации боковых почек и образования новых побегов, которые успешно развивались и позволяли содержать необходимый материал до 8-8,5 месяцев без пересадок. В аналогичной зависимости от сроков культивирования находились и такие показатели как количество листьев и количество междоузлий (Табл. 2).

Таблица 2

**Развитие микроклонов винограда на питательных средах для долгосрочного хранения в культуре *in vitro***

Тип питательной среды	Количество жизнеспособных растений, %	Высота растений, см	Количество узлов на основном побеге, шт.	Длина корней, см	Количество корней, шт.
MS(контроль)	10	10,5	9,0	13,5	2,0
MS + сорбит	20	14,6	9,8	22,1	2,2
MS + маннит	25	15,9	8,7	19,2	2,4
MS + теравет	35	16,5	10,7	16,6	4,0

При изучении жизнеспособности микроклонов винограда опытных сортов было установлено, что через 8 месяцев беспересадочного культивирования на безгормональной среде MS оставалось в среднем всего 10 % растений, пригодных к последующему размножению в культуре *in vitro*. На средах с сорбитом и маннитом этот показатель составлял 20-25 %, а на средах из тераветом в среднем 35-40 %. Следует отметить, что среда с абсорбентом воды теравет в отличие от других питательных сред почти не расслаивалась, менее интенсивно усыхала, долго сохраняла свои питательные свойства.

Таким образом, исходя из результатов исследования, можно сделать вывод о том, что ценные генотипы винограда можно успешно хранить до 8,0 – 8,5 месяцев в медленнорастущей коллекции *in vitro*. Оптимальными питательными средами для такой коллекции является среда MS с добавлением гидроабсорбентов и осмотических ингибиторов – сорбита и маннита в количестве 60 мг/л. Культивирование необходимо проводить поочередно в условиях культурального бокса и сниженной до 10 °С температуры.

**Литература**

1. Высоцкий В. А. Клональное микроразмножение растений / В. А. Высоцкий // Культура клеток растений и биотехнология / под ред. Р. Г. Бутенко. – 1986. – 360 с.
2. Катаева Н. В. Клональное микроразмножение растений / Н. В. Катаева, Р. Г. Бутенко. – М.: Наука, 1983. – 96 с.
3. Бутенко Р. Г. Быстрое клональное размножение виноградного растения / Н. В. Катаева, Р. Г. Бутенко, П. Я. Голодрига // Сельскохозяйственная биология. – 1983. – № 7. – С. 48-50.
4. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. – К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.
5. Дорошенко Н. П. Способ создания коллекции генофонда «*in vitro*» / Н. П. Дорошенко, М. А. Хохлова // Виноград и вино России. – 1993. – № 6. – С. 18-21.
6. Дорошенко Н. П. Длительное сохранение *in vitro* растений винограда» / Н. П. Дорошенко, Г. В. Соколова // Научно-технический прогресс в виноградарстве: матер. межд. науч. симп., посв. 90-летию со дня рождения Л.В. Колесника. – Кишинев, 1998. – С. 33-34.
7. Зеленияньска Н. М. Розробка способів збільшення строків зберігання колекції цінних клонів винограду в культурі *in vitro* / Н. М. Зеленияньска, Л. В. Джабурия, Н. І. Теслюк // Виноградарство і виноробство: міжв. тем. наук. зб. – Одеса, 2009. - Спец. вип. – С. 191-194.

*Зеленянская Н. Н., Джабурия Л. В., Теслюк Н. И., Подуст Н. В., Гоголинская Е. И.*

### **Методи зберігання колекційного матеріалу винограду у культурі *in vitro***

*Наведені результати досліджень зберігання цінних генотипів винограду у повільно зростаючій колекції *in vitro*. З метою мінімізації ростових процесів до поживного середовища MS додавали гідроабсорбент теравет та осмотичні інгібітори – маніт, сорбіт. Виділені оптимальні поживні середовища, які містять сорбіт та маніт у кількості 60 мг/л. Показана доцільність культивування повільнозростаючої колекції винограду почергово в умовах культурального боксу та при зниженій температурі.*

**Ключові слова:** *in vitro*, повільно зростаюча колекція, гідроабсорбент, маніт, сорбіт, умови культивування.

*Zelenianskaya N.N., Djaburis L.V., Tesluk N.I., Podust N.V., Gogulinskaja E.I.*

### **Saving methods of grape collecting material in culture *in vitro***

*The results of researches collecting of valuable grape in slowly growing collection *in vitro* are shown. To minimize growing process to nutritious environment MS hydroabsorbent teravet was added and osmotic inhibitor – manitol, sorbitol. Optimal nutritional environment, which has manitol and sorbitol in the amount of 60 mg/l were allocated. The expediency of slowly growing grape collection cultivating alternately in conditions of cultural box and with reduced temperature is shown .*

**Key words:** *in vitro*, slowly growing collection,hydroabsorbent, manitol, sorbitol.