

Южный филиал Национального университета биоресурсов
и природопользования Украины
«Крымский агротехнологический университет»,
Украина

ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИИ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ И РОСТ АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ ЗИМУЮЩИХ ПОЧЕК ВИНОГРАДА

Установлено, что культивирование апикальных меристем, выделенных из зимующих почек винограда, на этапе введения в культуру *in vitro* лучше осуществлять на питательной среде без хлоридов, йодида калия, со сниженным содержанием сернокислого марганца и измененным соотношением витаминов.

Ключевые слова: трансплантаты винограда, питательная среда, апикальные меристемы, каллус, выживаемость, ризогенез.

Введение. В пазухе листа виноградного растения происходит формирование пасынкковой почки и сложной зимующей (глазка), имеющей наряду с основной (центральной) почкой 2-6 запасных почек, которые пробуждаются в разное время под действием ряда факторов [1-4]. Все эти почки одинаковы по морфологическому строению и представляют собой зародышевый побег, имеющий зачатки вегетативных и генеративных органов будущего растения [4]. Таким образом, они могут послужить хорошим дополнительным материалом для введения в культуру *in vitro* и повысить коэффициент использования инициальных черенков. Однако, в период культивирования было отмечено, что апикальные меристемы, изолированные из почек глазка, характеризовались более медленным ростом. В связи с этим была поставлена цель – оптимизировать состав питательных сред для повышения интенсивности роста эксплантов.

Материалы и методика исследований. Материалом для исследования служили растения винограда *Vitis vinifera* L. сортов Молдова, Сурученский белый, Шевченко, Каберне Совиньон и Фрумоасе албэ. В работе использовались общепринятые биотехнологические методики, для введения использовали апикальные меристемы размером 0,2...0,6 мм с 1-2 листовыми примордиями, которые выделяли из зимующих почек винограда. В качестве базовой питательной среды использовали среду Мурасиге и Скуга (МС), содержащую 2% сахарозы и 0,7 % агара. Условия культивирования: температура 24-26°C, относительная влажность воздуха 60-70%, 16-ти часовой фотопериод и освещенность 2-3 тыс. люкс. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали пакет прикладных программ Excel для Windows 97.

Результаты исследований. В состав питательных сред для культивирования растительных тканей входят, как правило, соединения азота, фосфора, серы, хелат железа и соли K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++} . Все эти соединения выполняют определенные структурные, каталитические и электрохимические функции, взаимодействуют друг с другом в биохимических процессах, обеспечивая нормальное функционирование растительного организма [5]. Однако анализ литературных данных [6, 7] показал, что виноград отрицательно реагирует на ионы хлора, а необходимость в ионах йода для высших растений до сих пор не определена [8].

Модификация питательной среды МС заключалась в изменении соотношения витаминов, добавлении в ее состав ПАБК, исключении из состава макро- и микросолей соединений хлора и йода, а также в снижении количества $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ в 3 раза. Содержание элементов в базовой среде МС и модифицированной (далее МС_а) приведено в табл. 1.

Культивирование апикальных меристем, выделенных из зимующих почек винограда, проводили на питательной среде с эмпирически подобранным нами для каждого исследуемого сорта [9] оптимальным соотношением гормонов (табл. 2).

Таблица 1

**Состав базовой и модифицированной питательной среды для культивирования
апикальных меристем винограда, мг/л**

Вещества	МС	МС _а	Вещества	МС	МС _а
Макросоли			Микросоли		
KNO ₃	1900	1900	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	7,43
NH ₄ NO ₃	1650	1650	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	8,6
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	370	H ₃ BO ₃	6,2	6,2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	-	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025
KH ₂ PO ₄	170	170	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25
FeSO₄·7H₂O	27,8	27,8	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	-
Na₂ЭДТА	37,3	37,3	KJ	0,83	-
Витамины					
Мезоинозит	100	75	Пиридоксин-НСl	0,5	5,8
Тиамин-НСl	0,1	-	Глицин	2,0	-
Никотиновая кислота	0,5	5,3	ПАБК	-	5,0

Таблица 2

**Влияние модификации питательной среды МС на рост и развитие побегов винограда в
культуре *in vitro* (60 сут. культивирования)**

Содержание и концентрация гормонов, мг/л	Частота регенерации, %		Высота побегов, мм		Количество побегов, шт.	
	МС	МС _а	МС	МС _а	МС	МС _а
Сорт Молдова						
БАП 1,0 Кинетин 1,0	52,5±7,5	55,0±2,5	3,38±0,16	5,32±0,45 ^{***}	1,28±0,12	1,67±0,04 ^{***}
БАП 1,0 Кинетин 1,0 ИУК 1,0	50,0±5,0	52,5±5,0	2,98±0,36	5,10±0,48 ^{***}	1,23±0,13	1,44±0,15
Сорт Сурученский белый						
БАП 1,0 ГК 0,5	32,5±2,5	42,5±0,0 ^{***}	3,41±0,15	5,61±0,43 ^{***}	1,27±0,24	1,28±0,10
БАП 1,0 Кинетин 1,0 ИУК 1,0	35,0±5,0	40,0±2,5	3,49±0,27	4,82±0,33 ^{**}	1,20±0,12	1,25±0,09
Сорт Шевченко						
БАП 2,0 ГК 0,5	45,0±0,0	45,0±2,5	3,31±0,38	4,06±0,27 [*]	1,20±0,12	1,4±0,08 [*]
Сорт Фрумоаса албэ						
БАП 1,0 ГК 0,5	72,5±7,5	75,0±2,5	5,08±0,21	5,43±0,42	1,27±0,07	1,84±0,19 ^{**}
Сорт Каберне Совиньон						
БАП 0,5	35,0±2,5	37,5±0,0	3,77±0,18	5,26±0,36 ^{***}	1,27±0,08	1,35±0,17
БАП 1,0 ГК 0,5	32,5±2,5	42,5±5,0 [*]	3,59±0,29	5,11±0,45 ^{**}	1,31±0,13	1,33±0,14

Примечание. Разница между вариантами достоверна при *P=0,05, **P=0,01, ***P=0,001.

Полученные нами данные показали, что регенерационные потенции большинства исследуемых сортов на модифицированной нами среде МС_а выше на 2,5-10,0 %. Частота регенерации апикальных меристем сорта Молдова при модификации гормонального состава питательной среды не имела существенных различий и оставалась на уровне 50-55 %. Однако, исключение из состава питательной среды указанных выше соединений способствовало достоверному повышению

показателей роста эксплантов. Высота побегов за период культивирования на среде МС_а была выше на 2,18-2,59 мм, т. е. почти в два раза. Также наблюдалось увеличение количества и частоты формирования дополнительных побегов на 20-40 %. При этом отмечено, что добавление ИУК в среду оказало ингибирующее действие на формирование и рост побегов. Аналогичные данные по высоте побегов были получены у эксплантов сорта Сурученский белый, культивируемых на среде МС_а. Модификация минерального состава питательной среды способствовала существенному увеличению высоты основного побега, при этом максимальное значение этого показателя (5,61±0,43 мм) отмечено на среде с добавлением БАП и ГК.

У сорта Шевченко влияние минерального состава питательной среды на уровень регенерации и биометрические показатели эксплантов проявилось в меньшей степени, чем у других исследуемых сортов. Высота побегов при культивировании на среде МС_а была существенно выше, чем на базовой среде МС, а частота регенерации в обоих вариантах была одинаковой. Сорт Фрумоаса албэ является наиболее отзывчивым на культивирование в условиях *in vitro* – 72,5-75,0 % эксплантов регенерировали на искусственной питательной среде и дали начало новым растениям, независимо от модификации среды. В то же время при культивировании на среде МС_а количество дополнительных побегов было выше на 30 %. Культивирование апикальных меристем сорта Каберне Совиньон на питательной среде МС_а способствовало некоторому повышению уровня регенерации эксплантов, но различия были достоверны лишь в варианте с добавлением БАП и ГК. Высота побегов была достоверно выше на среде МС_а и составляла от 5,11±0,45 до 5,26±0,36 мм. Анализ полученных данных показал, что повышение концентрации БАП до 1 мг/л в сочетании с ГК не способствовало существенному увеличению биометрических показателей. Таким образом, оптимальной средой для культивирования апикальных меристем сорта Каберне Совиньон является среда МС_а, дополненная БАП в концентрации 0,5 мг/л.

Выводы.

1. При выделении апикальных меристем из почек глазка оптимальной на этапе введения в культуру *in vitro* является модифицированная питательная среда МС_а, которая содержит (мг/л): KNO₃ – 1900; NH₄NO₃ – 1650; MgSO₄·7H₂O – 370; KH₂PO₄ – 170; FeSO₄·7H₂O – 27,8; Na₂ЭДТА – 37,3; MnSO₄·4H₂O – 7,43; ZnSO₄·7H₂O – 8,6; H₃BO₃ – 6,2; CuSO₄·5H₂O – 0,025; Na₂MoO₄·2H₂O – 0,25; мезоинозит – 75; никотиновую кислоту – 5,3; пиридоксин-HCl – 5,8; ПАБК – 5,0; сахарозу – 20 г/л, агар – 7 г/л.

2. Биометрические показатели эксплантов исследуемых сортов, независимо от гормональных добавок в среду, были выше при культивировании на модифицированной питательной среде МС_а.

Литература

1. Стоев К. Д. Формирование почек и соцветий / К. Д. Стоев // Физиология винограда и основы его возделывания. – София, 1983. – Т. 2. – С. 131-186.
2. Дикань А. П. Нераспускание почек при возделывании винограда / А. П. Дикань // Потенциальная плодоносность и урожай винограда. – Симферополь, 1996. – Разд. 2-3. – С. 74-80.
3. Мишуренко А. Г. Виноградный питомник / Мишуренко А. Г., Красюк М. М. – [4-е изд.]. – М.: Агропромиздат, 1987. – 268 с.
4. Смирнов К. В. Виноградарство / К. В. Смирнов, Т. И. Калмыкова, Г. С. Морозова; под ред. К. В. Смирнова. – М.: Агропромиздат, 1987. – 367 с.
5. Физиология растений с основами биохимии / Н. М. Макрушин, Е. М. Макрушина, Н. В. Петерсон, М. М. Мельников. – Симферополь: Таврия, 2005. – 544 с.
6. Виноградарство Крыма / [Дикань А. П., Вильчинский В. Ф., Верновский Э. А., Заяц И. Я.]. – Симферополь, 2001. – 405 с.
7. Анкудинов В. И. Лаборатория выращивания оздоровленного посадочного материала ВНИИС им. Мичурина при ЭПХ «Мир» Крымской области / В. И. Анкудинов. – 1975-1985 гг.
8. Зитте П. Ботаника: учебник для вузов: в 4 т. / [П. Зитте, Э.В. Вайлер, Й.В. Кадерайт]; на основе учебника Э. Страсбургера [и др.]. – М.: Издат. центр «Академия», 2007. – Т. 2: Физиология растений. – 496 с.
9. Бугаенко Л. А. Особенности морфогенеза апикальных меристем винограда в культуре *in vitro*

Иванова-Ханина Л. В.

Вплив модифікації живильного середовища на регенерацію та ріст апікальних меристем зимуючих бруньок винограду

Встановлено, що культивування апікальних меристем, що відселені з зимуючих бруньок винограду, на етапі введення в культуру *in vitro* краще здійснювати на живильному середовищі без хлоридів, йодиду калію, зі зниженим вмістом сірчаноокислого марганцю та зі зміненим співвідношенням вітамінів.

L. V. Ivanova-Khanina

Influence of modification the nutrient medium on the regeneration and growth the apical meristems of winter grape buds

Found that the cultivation of the apical meristems isolated from winter grape buds on the step of introduction in culture *in vitro* is better to implement on a nutrient medium without chlorides, potassium iodide, with reduced content of manganese sulfate, and changed ratio of vitamins.

Keywords: grape grafts, growing medium, apical meristem, callus, survival rate, rhizogenesis.