

УДК 634.8:631.532:631.544

Н. І. Теслюк, канд. с-г. наук
Національний науковий центр
«Інститут виноградарства та виноробства ім. В.Є. Таїрова»

В. Б. Барабаш, учитель хім. та біол.
А. А. Клачун, учениця
Таїровська ЗОШ І-ІІІ ступенів,
Україна

ВИКОРИСТАННЯ КУЛЬТУРИ IN VITRO У ВИНОГРАДАРСТВІ

Вивчено вплив різних желюючих агентів, складу поживного середовища на приживлюваність, ріст і розвиток ініціальних експлантів винограду на первинних етапах клонального мікророзмноження винограду. Розроблено оптимальне поживне середовище

Мурасіге-Скуга модифіковане із кукурудзяним крохмалем та впроваджено для прискореного розмноження винограду сорту Кобзар в культурі in vitro. Досягнуто зниження собівартості мікроклону на первинних етапах клонального мікророзмноження. Розроблені прийоми перевірені в практичній роботі

Ключові слова: культура in vitro, ініціальні експланти, клональне мікророзмноження, мікроклони, фітогормони, поживні середовища.

Головним завданням біотехнології в агросфері є використання біологічних процесів, систем та організмів в сільському господарстві, які сприяють його інтенсифікації і перетворенню у високоефективну, конкурентоздатну, екологічно безпечну галузь. Першочергового значення при цьому набувають питання покращення біотехнологічними методами існуючих і створення нових високопродуктивних сортів культурних рослин та одержання корисних штамів мікроорганізмів [1].

Біотехнологія у сільському господарстві полегшує традиційні методи селекції рослин і розробляє нові технології, що дозволяють підвищити ефективність сільського господарства. У багатьох країнах методами генетичної і клітинної інженерії створені високопродуктивні і стійкі до шкідників, хвороб, гербіцидів сорти сільськогосподарських рослин [1]. Розроблено техніку оздоровлення рослин від накопичених інфекцій, що особливо важливо для культур, які розмножуються вегетативно. Досліджується поліпшення амінокислотного складу рослинних білків. Розробляються нові регулятори росту рослин, мікробіологічні засоби захисту рослин від хвороб і шкідників, бактеріальні добрива. Використання калюсних клітин рослин у біотехнології пов'язане з їх здатністю продукувати при культивуванні in vitro біологічно активні речовини, які утворюються цілими рослинами. Це має важливе значення для медицини, парфумерії, харчової промисловості. Клітини рослин in vitro використовують для отримання алкалоїдів, стероїдів, глікозидів, гормонів, ефірних олій. Незамінною культура рослинних клітин in vitro є для збереження видів рослин, що знаходяться на межі вимирання. Клітини рослин при цьому можуть зберігатися як в живій колекції (яка потребує постійних пересівів), так і в замороженому стані (кріоконсервація в рідкому азоті).

Важливим напрямом використання культури ізольованих тканин рослин є розмноження і, головне, оздоровлення посадкового матеріалу. Цей метод отримав назву **клонального мікророзмноження рослин**. Метод дозволяє отримувати з однієї меристеми сотні тисяч рослин на рік і в наш час він став комерційним [2].

Розмноження є мікроклональним, коли отримані паростки (клони) є ідентичні вихідній рослині і між собою. Успішно цей процес відбувається, якщо в якості експлантатів використовують апекси та пазушні бруньки органів стеблового походження, тому що вони є генетично стабільні і їх меристемні тканини, організовані у вигляді множинних дискретних зон, підтримуються протягом тривалого росту рослин у активному стані.

Перевагами методу клонального мікророзмноження рослин порівняно з традиційними методами розмноження є :

- високий коефіцієнт розмноження рослин;
- можливість проведення робіт впродовж всього року;
- економія необхідних площ для вирощування посадкового матеріалу;
- отримання генетично однорідного посадкового матеріалу;
- отримання рослин, що важко розмножуються традиційними методами;
- розмноження культур з тривалим життєвим циклом (деревні породи);
- звільнення рослин від вірусної інфекції за рахунок використання методу меристемної культури та інше.

Успішне мікроклональне розмноження, його коефіцієнт залежать від генотипу донорської рослини, її фізіологічного стану (стадії розвитку), від розміру експлантату і його компетентності. Вихід повноцінних рослин, отримуваних із меристеми, залежить від складу

поживного середовища, умов культивування та укорінення. Для отримання життєздатних клонів на всіх етапах процесу велике значення мають співвідношення гормонів та умов освітлення. Ці чинники широко варіюють і визначаються для кожного виду і сорту дослідним шляхом.

На сьогодні технологія мікророзмноження відпрацьована для понад 500 видів рослин. Для клонування багатьох рослин розроблено і оптимізовано умови для всіх етапів процесу, що зумовлює його високу відтворюваність та результативність і дає змогу створювати комерційні підприємства для масового отримання посадкового матеріалу.

В зв'язку із цим, розробка, удосконалення методів та прийомів культури винограду *in vitro*, пошук особливостей та закономірностей у процесах росту і розвитку, калюсогенезу та ембріогенезу, підвищення регенераційної здатності ініціальних експлантів є актуальними і надають широкі можливості їх використання в селекції винограду і в системі виробництва садивного матеріалу винограду високих селекційних категорій якості.

Разом з тим в культурі тканин та органів винограду *in vitro* багато проблем та питань залишаються ще не вирішеними. Для широкого використання в практичній роботі методів клонального мікророзмноження винограду окремі етапи потребують суттєвих доробок та нових підходів. Зокрема, середовища та умови культивування, що були розроблені для одних форм, клонів та сортів не завжди можуть бути використаними для інших. Для широкого використання в практичній роботі методів клонального мікророзмноження винограду окремі етапи потребують суттєвих доробок та нових підходів.

Мета роботи – удосконалення методів культури *in vitro* для прискореного розмноження винограду.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі **задачі**:

- визначити оптимальне поживне середовище та умови культивування;
- провести пошук нових желюючих речовин та визначити оптимальний склад поживного середовища для підвищення ефективності клонального мікророзмноження столового сорту винограду Кобзар в культурі *in vitro*.

Матеріали і методи досліджень

Для вирішення поставлених задач було проведено ряд досліджень по застосуванню кукурудзяного крохмалю та різних поживних середовищ для прискореного та економічно-вигідного розмноження рослинного матеріалу цінних сортів винограду *in vitro*. Дослідження проводили на сорті Кобзар. Заготівлю лози проводили на виділених кущах винограду, перевірених на відсутність бактеріальних та вірусних хвороб. Лозу пророщували для одержання зелених пагонів, після чого відбирали апекси та одновічкові вузли розміром 0,5-1 см, і вводили в культуру *in vitro*. Для культивування готували поживні середовища Гамборга, Ніча і Ніч, Мурасіге та Скуга (МС) модифіковане нами [3]. Для желювання середовищ використовували агар (6-7 г/л), картопляний та кукурудзяний крохмаль (70 г/л) [4]. Приготування середовищ вимагало ретельного перемішування при розчиненні агару та крохмалів.

Для культури винограду *in vitro* поживне середовище повинно бути оптимально щільним, забезпечувати вертикальне положення експланту, утримуючи його. При цьому поживне середовище високої щільності ускладнює введення ініціальних експлантів, а також дуже швидко пересихає. Експериментальним шляхом були встановлені концентрації таких крохмалів – 70 г/л. Встановлено, що при концентрації 70 г/л кукурудзяного крохмалю поживне середовище було біло-молочного кольору, мало рівну, щільну, желеподібну консистенцію. Клейстер кукурудзяного крохмалю характеризувався помірною в'язкістю (1100), температурою клейстеризації 75 °С та короткою структурою. Поживне середовище із картопляним крохмалем було сіро-білого кольору, ледь прозоре. Картопляний крохмаль характеризувався високою в'язкістю (3200), температурою клейстеризації 65 °С та середньою структурою. Контролем слугувало поживне середовище з концентрацією агару 8 г/л ("Difco", США). Стерилізацію поживних середовищ здійснювали автоклавуванням (тиск 1 атм.) 20 хвилин. Введення експлантів в культуру *in vitro* проводили

у ламінар-боксі в стерильних умовах.

Культивування ініціальних експлантів здійснювали в культуральному боксі при температурі 25-27 С°, перший тиждень при освітленні 800-1000 люкс, в подальшому освітлення збільшували до 2000-5000 люкс, при 16-годинному фотоперіоді та вологості повітря 60-70%. У процесі досліджень проводились спостереження за експлантами. Визначали приживлюваність ініціальних експлантів на 10-20 день від початку культивування (шт., %), початок проліферації (день розпускання пазушної бруньки), період ризогенезу (початок утворення коренів, дні) та проводили біометричні обліки розвитку експлантів.

В подальшому експланти пересаджували на середовища 2-го етапу клонального мікророзмноження із додаванням 0,2-0,3 мг/л ІОК. Розмноження потрібної кількості рослин *in vitro* проводили за розробленою в ННЦ "ІВіВ ім. В. Є. Таїрова" технологією [5]. Адаптовані до умов *in vivo* рослини висаджували в теплиці Лабораторно-тепличного комплексу інституту.

Результати досліджень

Використання нових желюючих речовин при розмноженні винограду в культурі *in vitro*

Основою методу культури *in vitro* є індукція органогенезу із ініціальної бруньки на штучних поживних середовищах в умовах культуральних приміщень. Ефективність клонального мікророзмноження в більшості випадків обумовлена правильним підбором поживних середовищ. Кількісний та якісний склад середовища впливає на приживлюваність ініціальних експлантів, обумовлює початок проліферації пазухових бруньок та процесів коренеутворення.

Зазвичай в культурі винограду *in vitro* використовують тверді поживні середовища виготовлені на основі агару, який являє собою складну суміш полісахаридів, що отримують при переробці червоних та бурих водоростей. Виготовляють агар за кордоном, а із країн близького 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. Агароїд, що виробляється в Україні, суттєво відрізняється від агару за хімічним складом і не придатний для застосування в культурі винограду *in vitro* [6].

Виходячи із вищесказаного, було проведено пошук заміни дорогого агару більш доступним компонентом для желювання середовища, а також була проведена оцінка впливу замінювача агару на ефективність процесів мікроклонального розмноження (позитивний вплив на ріст та розвиток винограду *in vitro*). В результаті були апробовані нативні, харчові картопляний та кукурудзяний крохмалі в різних концентраціях.

На первинних етапах наших досліджень ми досліджували вплив різних желюючих речовин на середовищі Мурасіге-Скуга. При порівнянні приживлюваності ініціальних експлантів на різних поживних середовищах виявилось, що найбільш високі показники приживлюваності були на середовищі із кукурудзяним крохмалем. При однакових умовах культивування приживлюваність ініціале на цьому середовищі була на 12-20% вищою в порівнянні із агаровим середовищем (контроль).

Подальші спостереження за рослинами, які прижилися, показали, що проліферація пазухових бруньок на поживному середовищі із кукурудзяним крохмалем наступала на 3-4 день, а в середньому по сортах – на 3,7 день, в той час як на агаровому поживному середовищі – на 5-7 день, в середньому по сортах – 6,3 день. В процесі спостережень за мікроклонами, вирощеними на середовищі із кукурудзяним крохмалем, виявилось, що вони не підлягали явищу вітрифікації, нормально росли та розвивались.

Спостереження за ростом та розвитком ініціальних експлантів на середовищі із картопляним крохмалем показали, що перші 6-9 днів експланти розвивались нормально, але більш повільно, ніж на інших середовищах. Проліферація пазухових бруньок починалась

тільки на 7-8 день. Але таке середовище було нестабільне, через декілька днів культивування рослини на ній не завжди утримувались у вертикальному положенні. В процесі культивування середовище розріджувалося, розширювалося, перешкоджувало ризогенезу ініціалі та їх подальшому розвитку. Встановлено, що поживні середовища із картопляним крохмалем не підходять для мікроклонального розмноження винограду. В подальших дослідженнях картопляний крохмаль не використовували.

Приживлюваність ініціальних експлантів винограду

Для перевірки і впровадження отриманих результатів у 2015 р., нами було проведено ряд досліджень по застосуванню кукурудзяного крохмалю та різних за складом поживних середовищ для прискореного розмноження рослинного матеріалу винограду сорту Кобзар *in vitro* (табл. 1). Ми використовували поживні середовища Мурасіге та Скуга (МС), Ніча і Ніч (НіН) та Гамборга, як найбільш поширені для культури винограду *in vitro*.

Таблиця 1

Приживлюваність ініціальних експлантів винограду сорту Кобзар на різних поживних середовищах (%)

Тип поживного середовища	Приживлюваність, %
Мурасіге і Скуга + агар	73,75
Мурасіге і Скуга модифіковане + кукурудзяний крохмаль	91,25
Ніч і ніч + агар	65,00
Ніч і ніч + кукурудзяний крохмал	73,75
Гамборга + агар	47,50
Гамборга + кукурудзяний крохмаль	60,00

Було встановлено, що кукурудзяний крохмаль позитивно впливає на приживлюваність ініціальних експлантів цього сорту винограду (рис. 1). Завдяки вмісту кукурудзяного крохмалю у всіх застосованих поживних середовищах спостерігалось збільшення відсотку приживлюваності ініціалі. Там, де желуючою речовиною був агар, у всіх варіантах дослідних поживних середовищ спостерігалось зниження відсотку експлантів, що прижилися.



Рис. 1. Розвиток експлантів на різних середовищах. Проліферація (розпускання пазушних бруньок)

Таким чином було встановлено, що для досягнення високого рівня приживлюваності найкращим було поживне середовище МС модифіковане із кукурудзяним крохмалем.

Одним із основних показників розвитку експланту винограду на поживному середовищі є початок проліферації пазушної бруньки. Прискорення початку проліферації призводить до більш швидкого формування та розвитку рослин. В процесі досліджень були проведені спостереження за розвитком експлантів та вивчені процеси проліферації.

Встановлено, що розпускання пазушної бруньки залежало від типу, варіанту поживного середовища, на яке було висаджено ініціальний експлант винограду (табл. 2).

При вивченні впливу типу поживного середовища на початок розпускання пазушних бруньок сорту Кобзар було встановлено, що на середовищах Гамборга проліферація відбувалась найповільнішими темпами.

Застосування поживного середовища Ніча і Ніч сприяло прискоренню проліферації на 1-2 дні в порівнянні з середовищем Гамборга. При цьому виявлена різниця між середовищами Ніча і Ніч з агаром та з кукурудзяним крохмалем.

При аналізі впливу типу поживного середовища на початок проліферації ініціальних експлантів встановлено, що найкращим було поживне середовище МС модифіковане. На цьому середовищі розпускання пазушної бруньки починалось вже на 3-6 день. Слід відмітити значну перевагу модифікованого середовища МС із кукурудзяним крохмалем в порівнянні із агаровим середовищем МС.

Таблиця 2

Початок проліферації ініціальних експлантів сорту Кобзар на різних поживних середовищах в середньому за 2015 р., дні*

Тип поживного середовища	Початок проліферації, дні
Мурасіге і Скуга модифіковане + агар	5,70
Мурасіге і Скуга модифіковане + кукурудзяний крохмал	2,90
Ніч і ніч + агар	7,50
Ніч і ніч + кукурудзяний крохмал	5,80
Гамборга + агар	9,25
Гамборга + кукурудзяний крохмаль	8,30
Середнє по поживним середовищам + агар	7,48
Середнє по поживним середовищам + кукурудзяний крохмаль	5,67

* - кращим є найменше значення

Ризогенез мікроклонів винограду на різних поживних середовищах

В подальшій роботі нами був проведений аналіз процесів коренеутворення (ризогенезу) у експлантів винограду сорту Кобзар *in vitro* (рис. 2). При цьому враховувалось, що прискорення утворення коренів позитивно впливає на силу, швидкість росту рослин та їх життєздатність при культивуванні. Було встановлено, що середовище Гамборга не сприяє прискоренню коренеутворення у ініціальних експлантів винограду.

Для максимального прискорення утворення коренів у експлантів найкращим було модифіковане середовище МС із кукурудзяним крохмалем (табл. 3). На середовищі МС із агаром процеси ризогенезу починались на 9-11 день. А ось на середовищі МС модифікованому із кукурудзяним крохмалем процеси ризогенезу починались вже на 7-й

день. Заміна агару кукурудзяним крохмалем в середовищі МС модифіковане прискорило процеси ризогенезу на 2,5 дні.

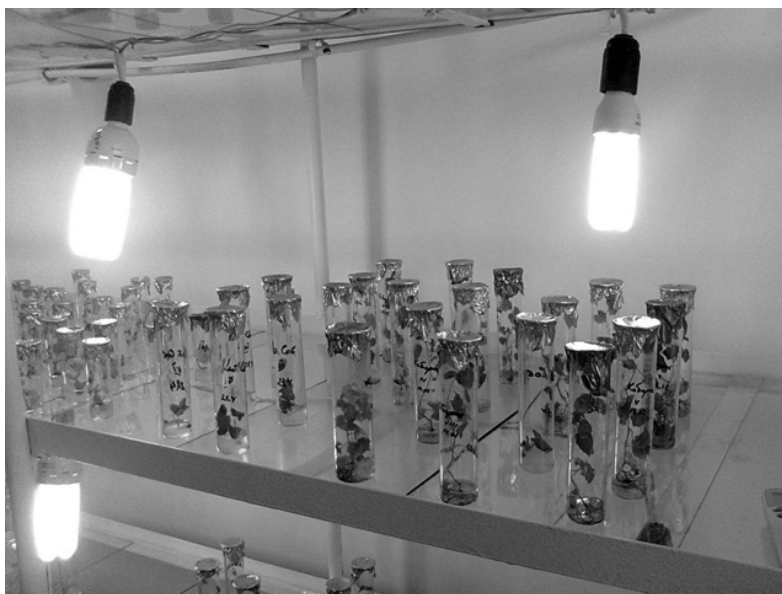


Рис. 2. Стадії розвитку експлантів

Таблиця 3

Початок ризогенезу ініціальних експлантів винограду сорту Кобзар на різних поживних середовищах (середнє за 2015 р., дні) *

Тип поживного середовища	Початок ризогенезу, дні
Мурасіге і Скуга модифіковане + агар	9,60
Мурасіге і Скуга модифіковане + кукурудзяний крохмал	7,10
Ніч і ніч + агар	10,70
Ніч і ніч + кукурудзяний крохмал	9,45
Гамборга + агар	13,00
Гамборга + кукурудзяний крохмаль	10,90
Середнє по поживним середовищам + агар	11,10
Середнє по поживним середовищам + кукурудзяний крохмаль	9,15

* - кращим є найменше значення

Економічна ефективність. Вагомим аргументом на користь використання кукурудзяного крохмалю при введенні експлантів винограду в культуру *in vitro* є його вартість – 12-13 грн. за 1 кг, а вартість 1 кг агару на сьогоднішній день коливається в межах 1300-1500 грн.

Економічна ефективність застосування розробленого поживного середовища із кукурудзяним крохмалем досягала за рахунок зменшення витрат на придбання агару, підвищення приживлюваності ініціальних експлантів в порівнянні з базовим варіантом на 18%, скорочення строків культивування на 5 днів, а, отже, і енерго- та трудовитрат у розробленому варіанті. Собівартість вирощеного стандартного кореневласного саджанця винограду при використанні базового варіанту клонального мікророзмноження становила 11,9 грн., а при використанні наших розробок – 9,0 грн. Додатковий прибуток на

одиницю продукції становив 2,9 грн., рівень рентабельності вирощування саджанців збільшувався до 67%.

Висновки

Для підвищення ефективності клоного мікророзмноження винограду *in vitro* доцільно використовувати кукурудзяний крохмаль у різних поживних середовищах. Він не тільки прекрасно желує поживне середовище, а й сприяє підвищенню приживлюваності ініціальних експлантів винограду столових сортів при введенні в культуру *in vitro*, покращує показники їх розвитку. Заміна агару кукурудзяним крохмалем прискорювала початок проліферації на 1,57 дня, а початок утворення коренів – на 1,86 дня (середнє по поживних середовищах).

В результаті роботи було встановлено, що поживне середовище МС модифіковане із кукурудзяним крохмалем є найкращим для використання на перших етапах мікрклоного розмноження винограду *in vitro*.

Економічна ефективність застосування розробленого поживного середовища із кукурудзяним крохмалем досягала за рахунок зменшення витрат на придбання агару, підвищення приживлюваності ініціальних експлантів в порівнянні з базовим варіантом на 18%, скорочення строків культивування на 5 днів, а, отже, і енерго- та трудовитрат у розробленому варіанті.

Використані джерела

1. Біотехнологія рослин: практикум / М. Д. Мельничук, І. П. Григорюк, Т. В. Новак, та ін. – К.: ТОВ «Аграр Медіа Груп», 2012. – 215 с.
2. Кушнір В. Мікрклональне розмноження рослин / В. Кушнір, В. Сарнацька. – К.: Наукова думка, 2005. – 528 с.
3. Патент на винахід: № 47417 України 7 А 01 G 31/00, 17/00 Поживне середовище для вирощування мікрклонів винограду / С. А. Стицько, Б. Н. Мілкус, Н. І. Теслюк. - Опубл. 15.07.2002, Бюл. № 7.
4. ТУ У 18.267-95. Крохмаль кукурудзяний модифікований харчовий (желуючий) замість ТУ 10.18 УРСР 443-91. –01.08.95 без обмеженого терміну дій.
5. Зеленянская Н. Н. Технология размножения винограда с использованием методов культуры тканей *in vitro* / Н. Н. Зеленянская, Л. В. Джабурия, Н. И. Теслюк // Виноград. – 2009. – № 3. – С. 50-53.
6. Теслюк Н. І. Використання нового желуючого компонента для винограду в культурі *in vitro* / Н. І. Теслюк // Аграрний вісник Причорномор'я: Біологічні та с.-г. науки. – 2005. – Вип. 29. – С. 141-143.

Теслюк Н. И., Барабаш В. Б., Клачун А. А.

Использование культуры *in vitro* в виноградарстве

*Изучено влияние различных желлирующих компонентов, состав питательной среды на приживаемость, рост и развитие инициальных эксплантов винограда на первичных этапах клоного микро размножения винограда. Разработана оптимальная питательная среда Мурасиге и Скуга модифицированная с добавлением кукурузного крахмала и внедрена для ускоренного размножения винограда сорта Кобзарь в культуре *in vitro*. Достигнуто снижение себестоимости микроклона на первичных этапах клоного микро размножения. Разработанные приемы проверены в практической работе.*

Ключевые слова: культура *in vitro*, инициальные экспланты, клоное микро размножение, микроклоны, фитогормоны, питательные среды.

N. I. Teslyuk, V. B. Barabash, A. A. Klachun

Using in vitro culture in viticulture

The influence of various gelling components, the composition of the nutrient medium on the survival, growth and development of initial grape explants in the primary stages of clonal micropropagation of grapes was investigated. The optimal nutrient medium Murasige and Skoog with the addition of a modified maize starch was developed and implemented to accelerate the breeding of grape variety Kobzar in vitro culture. The cost of microclon on the primary stages of clonal micropropagation has been reduced. The developed methods are tested in practice.

Keywords: in vitro culture, initial explants, clonal micropropagation, microclones, plant hormones, nutrient medium.