

УДК 581.085 : 576.5 : 634.1

Л.С. Ерболова^{1,2}, Н.А. Рябушкина¹, К.П. Аубакирова^{1,2}, С.Н. Олейченко², Н.Н. Галиакбаров^{1,2}МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ВИНОГРАДА
НА РАЗЛИЧНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ⁽¹ Институт биологии и биотехнологии растений МОН РК,² Казахский национальный аграрный университет)

Изучено влияние двух сред: среды инициации и поддержания меристематической массы (ИМ), и МС, содержащих 4,4 мкмоль бензиламинопурина (БАП) и 0,05 мкмоль нафталенуксусной кислоты (НУК), на различные количества солей азота, на эффективность микроклонального размножения нескольких европейских сортов винограда. Для эксперимента в качестве эксплантов использовались осенние покоящиеся почки винограда сортов: Саперави, Каберне Фран и Гевюрцтраминер. В первоначальных экспериментах на среде ИМ для всех исследуемых сортов выживание при переносе из in vitro в ex vitro было в несколько раз выше, чем на МС среде. Сорт Саперави на среде ИМ проявил максимальную способность образования микропобегов из спящих почек, а также способность к адаптации в почвенном субстрате по сравнению с Каберне Фран и Гевюрцтраминер. На среде МС Саперави дал минимальное количество растений in vitro по сравнению с двумя другими сортами, а адаптация в субстрате была минимальна у Гевюрцтраминер. После удаления апекса и последующего развития аксилярных микропобегов на среде ИМ из отдельных эксплантов было получено от 3 до 10 укорененных растений в зависимости от сорта. Более 600 укорененных растений винограда были высажены на экспериментальный участок для перезимовки.

Виноград (*Vitis spp.*) – одна из наиболее возделываемых и экономически значимых плодово-ягодных культур в мире и самых древних используемых растений, остатки которых археологи обнаруживают во многих местах в Западной Азии и в Европе. Использование виноградной продукции человечеством датируется 3500-2900 гг. до н.э [1]. *Vitis vinifera* L по сравнению с другими видами рода *Vitis* является наиболее культивируемым, поскольку он используется в производстве вина [2]. Хотя к настоящему времени *V. vinifera* распространился на все континенты, но вид успешно культивируется только в климатических районах с достаточным количеством осадков, теплым и сухим летом и относительно мягкой зимой.

Ягоды винограда являются богатым источником витаминов А, С, В₆, РР и фолатов (производных фолиевой кислоты), а также важных минералов: калия, кальция, железа, фосфора, магния и селена, необходимых для здоровья человека. Виноград содержит флавоноиды, которые являются мощными антиоксидантами, замедляющими процесс старения, снижающими повреждающий эффект, наносимый свободными радикалами [3].

В Казахстане развитие промышленного виноградарства началось с организации в конце 50-х – начале 60-х годов сети специализированных плодово-виноградских хозяйств на юге и юго-востоке республики. Наиболее благоприятные агроклиматические условия для возделывания данной культуры в Казахстане являются такие области, как Южно-Казахстанская, Жамбылская, Алматинская и Кызылординская. В 70-80-е годы в республике сбор винограда составлял в среднем около 150-200 тыс. тонн в год. Принятая Правительством

«Программа восстановления и развития виноградарства в Казахстане» (постановление Правительства от 12 декабря 2001 года N 1621) предусматривала восстановление площадей виноградников до размеров 70-80-х годов с достижением уровня валового производства 200-220 тыс. тонн. Согласно сельскохозяйственной переписи, площадь виноградников в 2007 году составила лишь 9,8 тыс. га. В связи с этим чрезвычайно возросла потребность в качественном посадочном материале. Для получения высококачественного посадочного материала необходимо получать безвирусный и безбактериальный посадочный материал высоких селекционно-санитарных категорий. Клональное микроразмножение в культуре in vitro является приоритетным направлением для получения оздоровленного посадочного материала. Этот метод характеризуется высоким коэффициентом размножения, что позволяет также значительно ускорять селекционный процесс и внедрять новые сорта в производство.

Полученные с помощью микроклонального размножения растения винограда являются предбазовым посадочным материалом класса А, предназначенным для закладки суперэлитных маточников, являющихся основой для производства сертифицированного посадочного материала [4].

Поскольку виноград является периклинальным химерным растением, меристема которого состоит, по крайней мере, из двух отдельных слоев клеток (L1, L2), чтобы сохранить признаки материнских растений важно осуществлять микроклональное размножение, используя собственно меристематическую ткань или содержащие

меристему апексы побегов, почки или узлы побегов (с аксиллярными меристемами) [5, 6].

В настоящей работе для введения в культуру *in vitro* использовали спящие почки растений, взятые в самом конце осеннего периода.

Материалы и методы

Для работы использовали зарубежные технические сорта винограда Каберне Фран, Гевюрцтраминер и Саперави. Каберне Фран – французский технический сорт среднепозднего периода созревания. Применяется при изготовлении красных, столовых, крепких, десертных вин и десертного шампанского. Во вкусе ягод ясно выражен специфический «пасленый привкус», что является сортовой особенностью. Гевюрцтраминер – немецкий сорт, дает крепкие, мягкие белые вина, плотно сбитые и имеющие сильный аромат и изысканный вкус. Саперави – грузинский сорт позднего срока созревания, технического направления. Виноград дает красное вино, цвет – гранатовый, рубиновый.

В качестве эксплантов использовали спящие почки: Саперави размером 0,5-0,7 см, Каберне Фран – 0,5-0,6 см и Гевюрцтраминер - 0,3-0,5 см. Для поверхностной стерилизации почки выдерживали в мыльном растворе 30 минут, промывали в проточной воде 30 минут, в 3 % перекиси водорода – 5 мин., затем держали в 10 % хлорсодержащем отбеливателе 8 минут, после чего промывали 5 раз автоклавированной водой. Спящие почки после стерилизации очищали от покровных чешуй в ламинарном боксе в условиях активного потока воздуха и сажали на две среды: ИМ и МС.

Культивирование эксплантов осуществляли на двух питательных средах: ИМ [7] и МС [8], содержащих 0,6 % агар (Sigma), 4,4 мкмоль БАП и 0,05 мкмоль НУК, 30 г/л сахарозы, но разные количества (мг/л) макроэлементов ИМ/МС, соответственно: KNO_3 (1050/1900), NH_4NO_3 (400/1650), K_2HPO_4 (200/170), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (400/370), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0/320); и 2 мг/л глицина в МС. Как видно из приведенных показателей, в среде МС содержание солей азота было существенно выше.

До автоклавирования pH среды доводили до $5,7 \pm 0,1$, автоклавировали при 120°C , 1 атм. в течение 20 мин. Культивирование *in vitro* проводили при 16-ти часовом световом периоде ($25 \pm 2^\circ\text{C}/18 \pm 2^\circ\text{C}$) при световом потоке флуоресцентного освещения $40-45 \mu\text{Es}/\text{m}^2\text{сек}$.

Продолжительность каждого субкультивирования от 25 до 30 дней. После

второго субкультивирования у развившегося микропобега удаляли апекс для снятия апикального доминирования и развития пазушных микропобегов. Образовавшиеся в следующем пассаже микропобеги разделяли и переносили на свежую среду. После достижения микропобегами высоты 6-7 см их перенесли на среду укоренения, содержащую $\frac{1}{2}$ МС, 20 г сахарозы, 0,6 % агара, 5,7 мкмоль ИУК.

Важным этапом при использовании микроклонального размножения является перевод полученных *in vitro* растений в нестерильные условия. Через 25-30 дней культивирования на среде укоренения получали укорененные растеньица высотой до 9-10 см. После чего баночки открывали и в таком виде растеньица держали 7-9 дней. Адаптированные таким образом к условиям *ex vitro* растеньица переносили на почвенный предварительно стерилизованный субстрат: дерновая земля/торф/цеолит (1/1/1).

Для лучшей приживаемости периодически высаженные в субстрат растения подкармливали раствором комплексного удобрения (Yara Suomi Oy, Финляндия). Растения, адаптированные и активно растущие в почвенном субстрате, высаживались на экспериментальный участок.

Результаты и их обсуждение

В предварительных экспериментах испытывали среды ИМ, МС и СУП (среда удлинения побегов). В последней питательной среде по сравнению с ИМ и МС бензиладенина было в 2 раза меньше, НУК отсутствовала, а тиамин - в 50 раз больше, пиридоксин в 10 раз больше; дополнительно в среде СУП присутствовал глицин 10 мг/л и парааминобензойная кислота 5 мг/л. Однако поскольку уровень образования микропобегов культивированных в среде СУП оказался неудовлетворительным, в дальнейших экспериментах отказались от ее использования.

После помещения на среды культивирования в течение нескольких дней экспланты выдерживали в темноте для адаптации и избегания стресса действия света на почку сразу после выделения. При перенесении эксплантов в условия освещения уровень потока света повышали постепенно в течение последующих нескольких дней до $40-45 \text{ мкмоль м}^2\text{сек}^{-2}$. На рисунке 1 (а, в, с) показаны этапы развития микропобега из спящих почек, на рисунке 2 – растеньица на среде укоренения, на рисунке 3 – растения, адаптированные *ex vitro* и в почве.



а) через 24 часа



в) через 3 недели



с) через 4 недели

Рисунок 1 - Прорастание почки с образованием микропобега



Рисунок 2 - Растеньица на среде укоренения

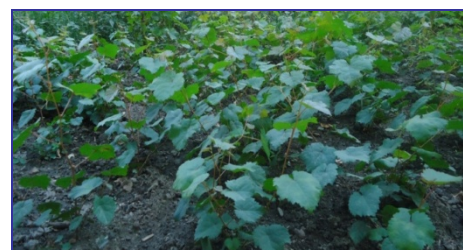


Рисунок 3 - Этапы адаптации растеньиц

На среде ИМ для всех исследуемых сортов выживание при адаптации *ex vitro* было более в пять раз выше, чем на МС среде. Сорт Саперави на среде ИМ проявил максимальную способность образования микропобегов из спящих почек, а также способность к

адаптации *ex vitro* по сравнению сортами с Каберне Фран и Гевюрцтраминер. На среде МС Саперави дал минимальное количество побегов по сравнению с двумя другими сортами. А адаптируемость *ex vitro* была минимальна у Гевюрцтраминер.

Таблица 1

Влияние двух сред на образование микропобегов винограда и количество укорененных растений

№	Название сортов (изначально по 30 эксплантов)	ИМ (Mezzetti B <i>et al.</i> , 2002)			МС (Murashige T., Skoog F., 1962)		
		<i>in vitro</i> (шт)	<i>ex vitro</i> (шт)	выживаемость	<i>in vitro</i> (шт)	<i>ex vitro</i> (шт)	выживаемость
1	Саперави	240	123	51 %	68	25	38 %
2	Каберне Фран	226	93	41 %	97	35	37 %
3	Гевюрцтраминер	212	82	39 %	78	24	32 %

Из-за низкой выживаемости растений далее обрабатывались условия адаптации при переходе из *in vitro* в *ex vitro*. После того как побеги достигли высоты 9-10 см и развили достаточную корневую систему баночки открывали и в таком виде держали 7-9 дней при 16-ти часовом световом режиме, освещенность около 45 микроль м⁻²сек⁻². После чего

растеньица из открытых баночек переносили в почвенный субстрат. По сравнению с результатами, представленными в таблице 1, в последующем эксперименте у растений Саперави и Каберне Фран выживаемость повысилась на треть, а у Гевюрцтраминер на четверть (сравни таблицу 1 и таблицу 2).

Таблица 2

Выживаемость растений винограда из *in vitro* в *ex vitro*

№	Название сортов (изначально по 10 эксплантов)	ИМ (Mezzetti B <i>et al.</i> , 2002)			МС (Murasige T and Skoog F, 1962)		
		<i>in vitro</i> (шт)	<i>ex vitro</i> (шт)	выживаемость	<i>in vitro</i> (шт)	<i>ex vitro</i> (шт)	выживаемость
1	Саперави	140	114	81 %	23	16	69 %
2	Каберне Фран	105	76	72 %	15	10	67 %
3	Гевюрцтраминер	81	52	64 %	12	6	50 %

В результате удаления апекса и последующего разделения микропобегов на среде ИМ из отдельных эксплантов данных сортов было получено до 10 укорененных растений. Все растения, адаптированные в почвенном субстрате (более 600), были высажены на экспериментальный участок. В начале следующего сезона будет оценена способность растений, полученных и размноженных *in vitro*, к перезимовке в естественных условиях. Далее все выжившие растения будут использованы для сравнительного генотипирования с исходными сортами.

1. Bowers J., Boursiquot J.M., This P., Chu K., Johansson H., Meredith C. Historical genetics: the parentage of Chardonnay, Gamay, and other wine grapes of north-eastern France // *Science*-1999.- 285. P. 1562-1565.

2. Lodhi M.A., Reisch B.I. In situ hybridization in *Vitis vinifera* L. // *Theor Appl Genet* – 1995.-90. P.11-16.

3. Kashif A., Federica M., Young H.C., Verpoorte R. Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. // *Phytochem Rev*-2010. – P. 357-378

4. Медведева Н.И. Особенности микроклонального размножения интродуцентов и клонов винограда // Научный журнал КубГАУ, №40(6), 2008.- С.1-17

5. Bertsch C., Kieffer F., Maillot P., Farine S., Butterlin G., Merdinoglu D., Walter B. Genetic chimerism of *Vitis vinifera* cv. Chardonnay 96 is maintained through organogenesis but not somatic embryogenesis // *BMC Plant Biol.*-2005.-V.5.-P.1-7

6. Рябушкина Н.А., Галиакпаров Н.Н. Перспективы генетической трансформации винограда (*Vitis vinifera* L.) с целью улучшения полезных признаков культуры // Биотехнология. Теория и практика. –2006.–№3.–С.16-26.

7. Mezzetti B., Pandolfini T., Navacchi O., Landi L. Genetic transformation of *Vitis vinifera* via organogenesis // *BMC Biotechnology*. –2002.–V.2:18

8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. // *Physiol Plant.*–1962. –V.15. –P.473-497.

Жұмыста кейбір Еуропалық жүзім сорттарына құрамында 4,4 мкмоль бензиламинопурин (БАП), 0,05 мкмоль нафталенуксус қышқылы (НУҚ) және әртүрлі қатынастағы азот тұздары бар екі қоректік ортаның: ИМ және МС әсері зерттелінді. Тәжірибеге эксплант ретінде Саперави, Каберне Фран және Гевюрцтраминер

жүзім сорттарының күздік ұйқыдағы бүршіктері алынды. ИМ қоректік ортасында барлық зерттелетін сорттар үшін *in vitro*-дан *ex vitro*-ға ауыстырған кездегі бейімділігі МС қоректік ортасына қарағанда бірнеше есе жоғары. Саперави сорты ИМ қоректік ортасында бүршіктен микроөркендер қалыптастыру қабілетін максималды көрсетті және де бұл сорттың Каберне Фран мен Гевюрцтраминерге қарағанда топырақ субстратына бейімділігі де жоғары болды. МС қоректік ортасында Саперави басқа сорттарға қарағанда минималды *in vitro* өсімдікшелерін берді, ал субстратқа бейімделуі жағынан Гевюрцтраминер сорты минималды болды.

Содан кейін өсімдікшелер шыны құтыдан топырақ субстратына ауыстырылды. Осындай *ex vitro* бейімдеушіліктен кейін Саперави және Каберне Фран сорттарының өміршеңдігі үштің бір бөлігіне, ал Гевюрцтраминердікі төрттен бір бөлігіне өсті.

Сонымен қатар ИМ қоректік ортасында аксиларлы микроөркендердің әрі қарай дамуынан және апекстің алынып тасталынғаннан кейін, сортқа байланысты әр экспланттан 3-тен 10-ға дейін тамырланған өсімдікшелер алынды. *Ex vitro* жағдайына бейімделген 600-ге жуық өсімдіктер қыстап шығуы үшін тәжірибелік учаскіге отырғызылды.

The present work represents the results of micropropagation of European perspective grapevine cultivars in two media: IM and MS, both supplemented with 4,4 μmol BAP and 0,05 μmol NAA, but with different amounts of KNO_3 and NH_4NO_3 . Dormant buds of Saperavi, Cabernet franc and Gewürztraminer cultivars were used as explants. In experiments the survival for all used cultivars after transfer from IM medium to *ex vitro* was as more as several times compared to those from MS medium.

Saperavi in IM media showed maximum of microshoots formation possibility and adaptation possibility in substrate (soil/peat/zeolite (1/1/1)) compared to Cabernet franc and Gewürztraminer.

The survival of plantlets, after transfer from IM to substrate, increased more than 30% for Saperavi and Cabernet, and 25% for Gewürztraminer. After 3-4 passages, multiplied microshoots were separated and transferred in rooting medium $\frac{1}{2}$ MS with 5,7 μM IAA, 20 g sucrose, 0.6 % agar, 2 ml/l glycine, 50 μl thiamine hydrochloride, 250 μl pyridoxine and 250 μl nicotinic acid. Depending on cultivars in IM medium after apex's excision and following formation of axillary microshoots from 3 to 10 rooted plantlets have been obtained. More than 600 rooted plantlets after acclimatization *ex situ* were transferred to the experimental field for surveillance of overwinter survival.