УДК 634.8.03: 581.143.6
DOI: 10.36718/1819-4036-2020-7-31-37

В. И. Соболев, Н. Е. Носкова,
М. А. Носкова, М. А. Аксиненко

ПРОЯВЛЕНИЕ СОРТОВОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ В КУЛЬТУРЕ АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ ВИНОГРАДА, АДАПТИРОВАННОГО НА ЮГЕ КРАСНОЯРСКОГО КРАЯ*

V. I. Sobolev, N. E. Noskova,
M. A. Noskova, M. A. Aksinenko

VARIETY SPECIFICITY OF MORPHOGENESIS IN THE CULTURE OF APICAL MERISTES OF GRAPES ADAPTED IN THE SOUTH OF KRASNOYARSK REGION

Соболев Вадим Игоревич – асп. каф. растениеводства, селекции и семеноводства Красноярского государственного аграрного университета, г. Красноярск. E-mail: vadsob14@gmail.com
Носкова Наталья Евгеньевна – канд. биол. наук, зав. лаб. биотехнологии сельскохозяйственных и лесных культур Красноярского государственного аграрного университета, г. Красноярск. E-mail: noscova62@mail.ru
Носкова Мария Александровна – лаборант лаб. биотехнологии сельскохозяйственных и лесных культур Красноярского государственного аграрного университета, г. Красноярск. E-mail: masha_nosk@mail.ru
Аксиненко Михаил Андреевич – лаборант лаб. биотехнологии сельскохозяйственных и лесных культур, студ. 4-го курса Красноярского государственного аграрного университета, г. Красноярск. E-mail: aksn2008@gmail.ru

Sobolev Vadim Igorevich – Post-Graduate Student, Chair of Plant Growing, Selection and Seed Farming, Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk. E-mail: vadsob14@gmail.com
Noskova Natalya Evgenyevna – Cand. Biol. Sci., Head, Lab. of Biotechnologies of Agricultural and Forest Cultures, Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk. E-mail: noscova62@mail.ru
Noskova Maria Alexandrovna – Laboratory Assistant, Lab. of Biotechnologies of Agricultural and Forest Cultures, Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk. E-mail: masha_nosk@mail.ru
Aksinenko Mikhail Andreevich – Laboratory Assistant, Lab. of Biotechnologies of Agricultural and Forest Cultures, 4-Year Student, Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk. E-mail: aksn2008@gmail.ru

Цель исследования – изучение сортовой специфичности в культуре апикальных меристем у четырех сортов винограда, адаптированных в условиях юга Красноярского края. Задачи исследования – ввести апикальные меристемы в культуру in vitro и изучить показатели роста и развития эксплантов на разных этапах микроразмножения (приживаемость эксплантов; количество, длина и динамика роста побегов; количество и динамика образования узлов на побеге; коэффициент размножения). В качестве объектов исследования использовали сорта винограда столового назначения: Памяти Домбковской, Алешенькин, Юбилей Новочеркасска, Амирхан. Стерильные побеги получали культивированием in vitro апикальных меристем, извлеченных из пазушных почек побегов, и размножали микрочеренкованием. Культивирование проходило на твердых питательных средах Мурасиге-Скуга (MS), оптимизированных для культуры винограда в условиях фотопериода 16/8 и температуры 22–24 °С. Жизнеспособность меристем в ходе инициации составила 27,7 %. Экспланты сорта Памяти Домбковской формировали наиболее длинные побеги – 30 мм. На этапе собственно микроразмножения у эксплантов сорта Амирхан формировался каллус; экспланты остальных сортов формировали нормальные побеги. К концу пассажа длина побегов составила: 15,79 мм – у сорта Памяти Домбковской; 12,06 – у сорта Алешенькин; 10,29 мм – у сорта Юбилей Новочеркасска. Наиболее часто два и более побега из одного

** Исследование выполнено при поддержке Красноярского краевого фонда науки в рамках участия в прохождении стажировки «Микроклональное размножение садовых культур».*

узла формировались у сорта Алешенькин (56 % случаев). Коэффициент размножения составил для сорта Алешенькин – 58,5; Памяти Домбковской – 37; Юбилей Новочеркасска – 34,3. Однофакторный дисперсионный анализ выявил сортоспецифичность исследуемых показателей. Полученные данные могут служить основой для дальнейших исследований по усовершенствованию клонального микроразмножения сортов винограда, адаптированных в условиях Красноярского края, что имеет несомненную ценность для развития виноградарства в Сибири.

***Ключевые слова**: виноградарство, виноград, клональное микроразмножение, эксплант, пазушные почки, культура апикальных меристем, стерильные побеги, микрочеренки, сорт.*

The aim of the research was to study varietal specificity in the shoot apical meristems culture of four grape sorts, adapted in the south of Krasnoyarsk Region. The tasks of the research included introduction of the culture of apical meristems and exploring the growth and development of explants at different stages of micropropagation (meristems survival; the number, length and growth dynamics of sterile shoots; the number and dynamics of the formation of nodes on the shoot; multiplication factor). Table grape sorts Pamyati Dombkovskoy, Aleshenkin, Yubiley Novocherkasska, Amirkhan were the objects of the study. Sterile cuttings with nodes were obtained by cultivation in vitro of apical meristems taken from axillary buds and were propagated by microcutting. The cultivation was performed on solid Murasige-Skuga nutrition media (MS), optimized for grape cultures at photoperiod 16/8 and the temperature 22–24 degrees Centigrade for 30 days exposition. The viability of meristems during initiation made 27.7 %. The explants of Pamyati Dombkovskoy formed the longest shoots – 30 mm. During propagation the explants of Amrikhan formed calluses and explants of other sorts formed normal shoots. By the end of the passage the shoots length made 15.79 mm in Pamyati Dombkovskoy, 12.06 mm in Aleshenkin, 10.29 mm in Yubiley Novocherkasska. Aleshenkin explants most often formed two or more shoots from one node in (56 % of the cases). Propagation factor made 58.5 % for Aleshenkin, 37 % for Pamyati Dombkovskoy, 34.3 % for Yubiley Novocherkasska. Univariate analysis of variance revealed the variety-specificity of the studied parameters. The data will serve as the basis for further research on improving microclonal propagation technology of grape varieties adapted in the Krasnoyarsk Region, which is of undoubted value for the development of viticulture in Siberia.

***Keywords**: viticulture, grapes, microclonal propagation, explant, auxiliary buds, apical meristem culture, sterile shoots, cuttings with nodes, variety.*

Введение. Культура винограда – одна из древнейших и важнейших ветвей садоводства, которая активно развивается в условиях современной России. Благодаря появлению множества ранних ценных сортов с высокой морозоустойчивостью и постоянному совершенствованию укрывной технологии, культура винограда уже значительно продвинулась на север, в районы, где летнего тепла достаточно для вызревания раннеспелых сортов [1, 2]. В последние годы виноградарство становится все более популярной отраслью садоводства в Красноярском крае и привлекает внимание красноярских исследователей [3, 4].

Характерных для винограда вредителей в Сибири нет. Однако интродуцированные сорта могут быть заражены карантинными патогенами и вредителями [3]. Одной из наиболее перспективных технологий по оздоровлению посадочного материала является метод клонального микроразмножения на основе культуры апикальных меристем, позволяющий не просто получить оздоровленный посадочный материал, но и благодаря высокому коэффициенту размножения быстро его размножить в необходимом объеме [5, 6]. Регенерационный потенциал в культуре *in vitro* в значительной степени зависит от видовой и сортовой специфичности материнского растения [7–9]. Изучение сортовой специфичности в культуре апикальных меристем винограда может внести существенный вклад в микроклональное размножение данного вида.

Цель исследования: изучить сортовую специфичность в культуре апикальных меристем у четырех сортов винограда, адаптированных в условиях юга Красноярского края.

Задачи исследования: ввести апикальные меристемы в культуру *in vitro* и изучить показатели роста и развития эксплантов на разных этапах микроразмножения (приживаемость эксплантов; количество, длина и динамика роста побегов; количество и динамика формирования узлов на побеге; коэффициент размножения).

Объекты и методы исследования. Исследование было выполнено в лаборатории биотехнологии сельскохозяйственных и лесных культур (ЛБ СХиЛК) ФГБОУ ВО Красноярский ГАУ, г. Красноярск, Красноярский край.

В качестве объектов исследования использовали сорта винограда столового назначения, адаптированные в условиях юга Красноярского края: Памяти Домбковской, Алешенькин, Юбилей Новочеркасска, Амирхан. Побеги винограда указанных сортов отбирали в частных садоводческих хозяйствах.

В качестве эксплантов при введении в культуру *in vitro* использовали апикальные меристемы, выделенные из пазушных почек винограда. Для этого побеги винограда разделяли на фрагменты с одной пазушной почкой, которые помещали в мыльный раствор на 30 мин и промывали под струей холодной проточной воды (30 мин). Материал обрабатывали 15 % раствором перекиси водорода в течение 15 мин, а затем промывали в трех сменах дистиллированной воды по 15 мин. Введение в культуру проходило в стерильных условиях ламинарного бокса. Под стереомикроскопом фрагменты апикальных меристем с одним-двумя листовыми примордиями вычленяли из почек и помещали на культуральные среды. Манипуляции проводили в чашках Петри на подложках из фильтровальной бумаги в растворе антиоксиданта (800 мг/л аскорбиновой кислоты).

Сформировавшиеся из апикальной меристемы стерильные побеги разделяли на микрочеренки и помещали на среду для микроразмножения.

Культивирование проходило на твердой питательной среде Мурасиге-Скуга (MS), оптимизированной для клонального микроразмножения винограда в соответствии с рекомендациями Н.И. Медведевой [9]. Для введения апикальных меристем в культуру *in vitro* использовали среду M_1 с пониженным содержанием макросолей и измененной концентрацией витаминов по сравнению с базовой MS: KNO_3 1425 мг/л, NH_4NO_3 1237 мг/л, $MgSO_4 \times 7H_2O$ 277,5 мг/л, никотиновая кислота 4 мг/л, тиамин HCl – 10 мг/л, мезоинозит 100 мг/л, и в присутствии 1 мг/л цитокинина 6-БАП. На стадии микроразмножения использовали базовый состав среды MS с добавлением 2 мг/л 6-БАП. Культуры помещали в ростовую комнату с фотопериодом 16/8 и температурой 22–24 °С. Экспозиция на индукционной среде, а также время пассажа на этапе размножения составили 30 сут.

В ходе эксперимента учитывали приживаемость эксплантов, регулярно отслеживали показатели роста и развития эксплантов: количество, длину и динамику роста побегов; количество и динамику образования узлов на побеге. Коэффициент размножения рассчитывали по формуле

$$\text{Кр} = {}^{n}/_{N},$$

где n – количество микропобегов, шт; N – количество эксплантов, шт.

Статистический анализ проводили согласно принятым методам на базе ПК с использованием стандартного пакета анализа данных MS Excel 2007. Описательную статистику проводили по параметрам выборки: среднее, дисперсия, ошибка, доверительный интервал. Достоверность различий средних для показателей «количество узлов», «количество сформированных побегов», «скорость роста побегов», «длина побегов» и силу влияния фактора «сорт» определяли, используя однофакторный дисперсионный анализ.

Результаты исследования. Для инициации побегообразования было выделено и инокулировано на индукционную среду 112 апикальных меристем у четырех сортов винограда. Из них прижились, начали развиваться и в течение 4 недель сформировали побеги 27,7 % эксплантов. В 2,7 % случаях экспланты формировали по два побега (табл. 1).

Таблица 1

Результаты введения в культуру меристем винограда

Сорт	Эксплантов, шт.		Кол-во побегов, шт.	Отклик, %
	инокулировано	прижилось		
Памяти Домбковской	9	4	4	44,4
Алешенькин	33	10	12	30,3
Юбилей Новочеркасска	27	8	9	29,6
Амирхан	43	9	9	20,9

Анализ биометрических характеристик на этапе инициации показал, что экспланты сорта Памяти Домбковской формировали наиболее длинные побеги (30,8 ± 1,75 мм), которые несли по 5–7 шт. узлов (рис. 1, *в*, *г*). У сорта Алешенькин длина побегов составила 9,3 ± 0,86 мм, а количество узлов – 2–3 шт/побег (рис. 1, *а*, *б*). Сорта Амирхан и Юбилей Новочеркасска показали близкие значения длины стерильных побегов (соответственно, 9,0 ± 0,45 и 6,8 ± 0,91 мм), и количества узлов – по 1–2 шт/побег.

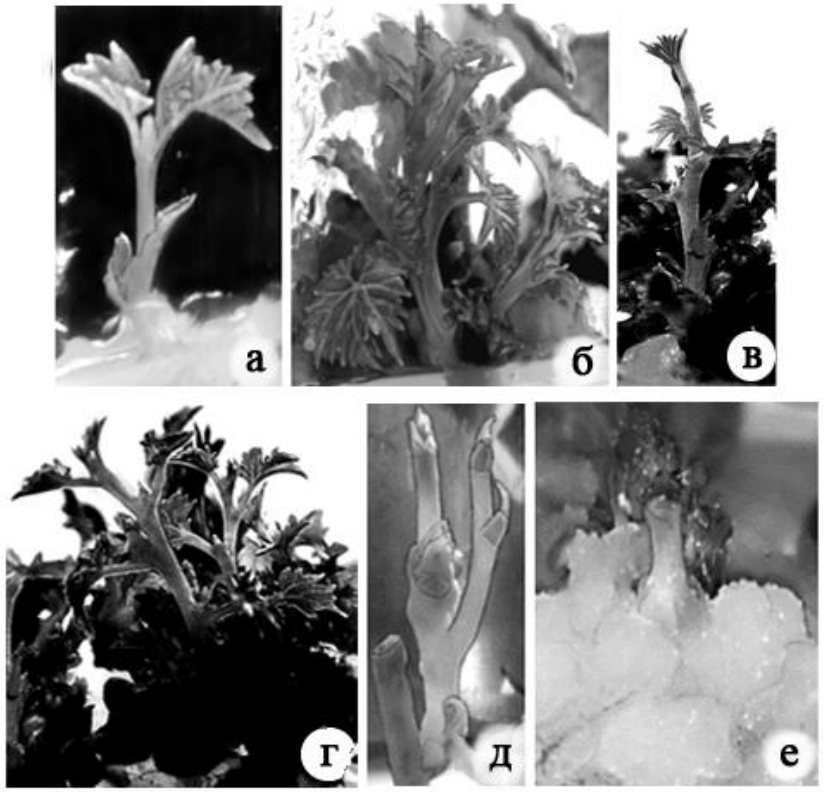

Рис. 1. Инициированные микропобеги винограда, сорта: Алешенькин (а, б) и Памяти Домбковской (в, г); регенерация нормальных побегов микрочеренками, сорт Юбилей Новочеркасска (д); каллусообразование в основании эксплантов, сорт Амирхан (е)

Полученные на этапе инициации микропобеги разделяли на микрочеренки, которые затем инокулировали на среду для размножения. На изменившиеся условия культивирования неожиданно нетипично отреагировали экспланты сорта Амирхан, у которых побеги не формировались, а на 12 сут пассажа в основании микрочеренков было отмечено образование каллуса. Каллусогенез распространялся акропетально и центростремительно и к концу пассажа охватил большую часть микрочеренка (рис. 1, *е*). Экспланты остальных сортов формировали нормальные побеги (рис. 1, *д*).

На этапе микроразмножения исследуемые сорта формировали различное количество микропобегов. У сорта Памяти Домбковской на одном черенке из пазухи листа в 21 % случаев формировалось по два побега и более, у сортов Юбилей Новочеркасска и Алешенькин – в 33 и 56 % случаев соответственно.

Динамика образования узлов на побеге отличалась у разных сортов. Наибольшее количество узлов у сортов Памяти Домбковской и Юбилей Новочеркасска образовалось в первые 12 сут. В последующие дни и до завершения пассажа наблюдалось снижение скорости нарастания числа узлов на побегах соответственно на 38 и 58 %. У сорта Алешенькин скорость образования числа узлов была на 30–50 % ниже по сравнению с другими сортами и сохранялась на одном уровне в течение двух первых декад пассажа; затем скорость увеличилась на 34 % и сохранялась до конца пассажа. На 30-е сут культивирования побеги сорта Памяти Домбковской несли в среднем по 3,3 узла; сорта Алешенькин – по 2,7; сорта Юбилей Новочеркаска – по 2,3 узла (рис. 2, А).

Коэффициент размножения на данном этапе в среднем на пассаж составил для сорта Алешенькин – 14,64; сорта Памяти Домбковской – 9,25; сорта Юбилей Новочеркасска – 8,58.

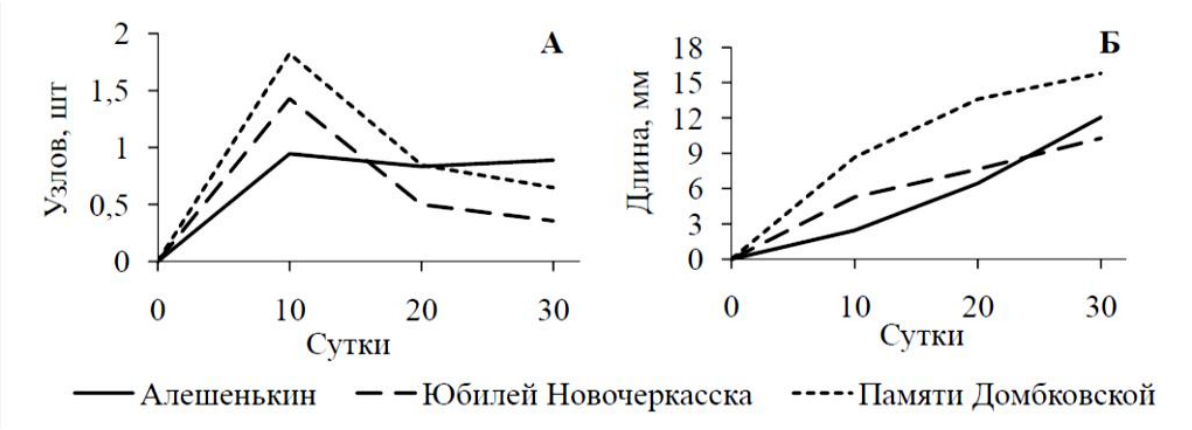

Рис. 2. Динамика образования узлов на побеге (А) и роста побегов (Б)

По динамике роста на этапе собственно микроразмножения, как и на первом этапе, экспланты сорта Памяти Домбоковской сохранили лидирующее положение в сравнении с другими сортами (рис.2, Б). В первые 12 сут скорость роста побегов данного сорта составила в среднем 0,72 мм/сут. Далее динамика шла на понижение: в следующие 10 сут скорость роста снизилась на 32 % (0,49 мм/сут), и в последнюю декаду пассажа – еще на 43 % (0,28 мм/сут). Сорт Юбилей Новочеркасска также показал максимальную скорость роста побегов в первые 12 сут пассажа – 0,44 мм/сут, и в следующую декаду скорость роста снизилась почти в два раза – 0,24 мм/сут. Однако в последние 8 сут произошло некоторое увеличение темпа роста, и скорость возросла до 0,33 мм/сут. Динамика роста побегов у сорта Алешенькин заметно отличалась от остальных сортов и характеризовалась устойчивым, примерно двукратным увеличением скорости роста каждые 10 дней до самого конца пассажа. Так, в первые 12 сут скорость роста побегов составила в среднем 0,2 мм/сут, в последующие 10 сут – 0,4 мм/сут, а в последние 8 сут – 0,7 мм/сут. В результате к концу пассажа сорт Алешенькин занимал промежуточное положение по интенсивности роста побегов, опережая на 15 % сорт Юбилей Новочеркасска и уступая на 24 % сорту Памяти Домбковской. Длина побегов составила: у сорта Памяти Домбковской – 15,8 ± 2,15 мм; у сорта Алешенькин – 12,06 ± 1,91; у сорта Юбилей Новочеркасска – 10,29 ± 1,75 мм (рис. 2, Б).

Однофакторный дисперсионный анализ показал, что в опыте исследуемые показатели у разных сортов значимо различались и что эти различия имели сортоспецифический характер (табл. 2).

Таблица 2

Результаты однофакторного дисперсионного анализа

Показатель	Сила влияния фактора «сорт», %	Уровень достоверности различий
Количество узлов	10,9	$p < 0,05$
Количество сформированных побегов	14,3	$p < 0,05$
Скорость роста побегов	8,9	$p < 0,05$
Длина побегов	24,8	$p < 0,001$

Выводы. Таким образом, в ходе настоящего исследования впервые введены в культуру *in vitro* сорта винограда, адаптированные в условиях юга Красноярского края. В культуре апикальных меристем получены стерильные побеги и затем размножены микрочеренкованием. Установлено, что реакция сортов на условия культивирования имеют сортоспецифический характер. Так, экспланты сорта Памяти Домбковской по скорости роста и длине побега, количеству вновь сформировавшихся узлов превосходили экспланты других сортов, участвовавших в эксперименте. Экспланты сорта Алешенькин выделялись стабильной положительной динамикой роста побегов и высоким коэффициентом размножения. Экспланты сорта Юбилей Новочеркасска занимали среднюю позицию по исследуемым показателям, а по характеру отклика были близки сорту Памяти Домбковской. У сорта Амирхан реакция на условия культивирования на этапе микроразмножения проявилась в виде каллусогенеза.

Полученные данные могут служить основой для дальнейших исследований по клональному микроразмножению сортов винограда, адаптированных в условиях Красноярского края, что имеет несомненную ценность для развития виноградарства в Сибири.

Литература

1. *Бопп В.Л., Кузьмина Е.М., Мистратова Н.А.* Плодоводство Сибири: учеб. пособие / Краснояр. гос. аграр. ун-т. 2-е изд., перераб. и доп. Красноярск, 2020. 390 с.
2. *Воронцова Т.Ф., Воронцов А.Н.* Виноград. Сибирская агротехника. Новосибирск, 2004. 72 с.
3. *Соболев В.И., Мистратова Н.А., Демина Н.А., Носкова М.А., Носкова Н.Е.* Перспективы развития виноградарства в Красноярском крае в свете использования современных технологий // Инновационные тенденции развития Российской науки: матлы XI Междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых. Ч. 2 / Краснояр. гос. аграр. ун-т. Красноярск, 2018. С. 199–201.
4. *Сутугина К.А., Величко Н.А., Смольникова Я.В.* Механический состав винограда Сибирских сортов // Вестник КрасГАУ. 2018. № 4. С. 145–150.
5. *Батукаев А.А.* Совершенствование технологии ускоренного размножения винограда методом *in vitro* и применение регуляторов роста в условиях *in vitro* и *in vivo*: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.01.08 / Всерос. НИИ виноградарства и виноделия им. Я.И. Потапенко. М., 1999. 59 с.
6. *Тимофеева О.А., Невмержицкая Ю.Ю.* Клональное микроразмножение растений: учеб.-метод. пособие / Казан. федер. ун-т. Казань, 2012. 56 с.
7. *Челяев Д.Н.* Регенерационный потенциал элитных форм малины в культуре *in vitro*: дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.05. Брянск, 2012. 118 с.
8. *Арестова Н.О., Рябчун И.О.* Особенности продуктивной регенерации подвойных сортов винограда при клональном микроразмножении // Магарач. Виноградарство и виноделие. 2018. № 3. С. 7–9.
9. *Медведева Н.И., Поливара Н.В., Трошин Л.П.* Методические рекомендации по микроклональному размножению винограда *in vitro* // Научный журнал КубГАУ. 2010. № 62 (08). С. 314–326.

Literatura

1. *Bopp V.L., Kuz'mina E.M., Mistratova N.A*. Plodovodstvo Sibiri: ucheb. posobie / Krasnojar. gos. agrar. un-t. 2-e izd., pererab. i dop. Krasnojarsk, 2020. 390 s.
2. *Voroncova T.F., Voroncov A.N*. Vinograd. Sibirskaja agrotehnika. Novosibirsk,2004. 72 s.
3. *Sobolev V.I., Mistratova N.A., Demina N.A., Noskova M.A., Noskova N.E.* Perspektivy razvitija vinogradarstva v Krasnojarskom krae v svete ispol'zovanija sovremennyh tehnologij // Innovacionnye tendencii razvitija Rossijskoj nauki: mat-ly XI Mezhdunar. nauch.-prakt. konf. molodyh uchenyh. Ch. 2 / Krasnojar. gos. agrar. un-t. Krasnojarsk, 2018. S. 199–201.
4. *Sutugina K.A., Velichko N.A., Smol'nikova Ja.V.* Mehanicheskij sostav vinograda Sibirskih sortov // Vestnik KrasGAU. 2018. № 4. C. 145–150.
5. *Batukaev A.A.* Sovershenstvovanie tehno-logii uskorennogo razmnozhenija vinograda metodom in vitro i primenenie reguljatorov rosta v uslovijah in vitro i in vivo: avtoref. dis. ... d-ra s.-h. nauk: 06.01.08 / Vseros. NII vinogradarstva i vinodelija im. Ja. I. Potapenko. M., 1999. 59 s.
6. *Timofeeva O.A., Nevmerzhickaja Ju.Ju*. Klonal'noe mikrorazmnozhenie rastenij: ucheb.-metod. posobie / Kazan. feder. un-t. Kazan', 2012. 56 s.
7. *Cheljaev D.N.* Regeneracionnyj potencial jelitnyh form maliny v kul'ture in vitro: dis. ... kand. s.-h. nauk: 06.01.05. Brjansk, 2012. 118 s.
8. *Arestova N.O., Rjabchun I.O.* Osobennosti produktivnoj regeneracii podvojnyh sortov vinograda pri klonal'nom mikrorazmnozhenii // Magarach. Vinogradarstvo i vinodelie. 2018. № 3. S. 7–9.
9. *Medvedeva N.I., Polivara N.V., Troshin L.P*. Metodicheskie rekomendacii po mikro-klonal'nomu razmnozheniju vinograda in vitro // Nauchnyj zhurnal KubGAU. 2010. № 62 (08). S. 314–326.