Методы in vitro для размножения оздоровленного посадочного материала винограда

В.А. ЗЛЕНКО, И.В. КОТИКОВ, Л.П. ТРОШИН
Институт винограда и вина «Магарач»

Результаты научно-исследовательской работы получены в период работы авторов в ИВиВ «Магарач».

Виноград поражают вирусные, вирусоподобные и микоплазменные болезни [1] и болезни, вызываемые бактериями и грибами, которые распространяются при размножении посадочного материала винограда вызревшей лозой [2]. Для производства марочных вин высокого качества необходимо провести фитосанитарную и клоновую селекцию среди как традиционных, так и новых сортов [3]. Важнейшее достоинство метода размножения растений in vitro — возможность за короткое время получить много растений от одного исходного клона (O. Silvestroni, 1981; R.E. Harris, J.H. Stevenson, 1982 A, 1982 B, П.Я. Голодрига, В.А. Зленко, Л.А. Чекмарев, Р.Г. Бутенко, Б.А. Левенко, И.П. Панкин, 1985; П.Я. Голодрига, В.А. Зленко, Л.А. Чекмарев, Р.Г. Бутенко, Б.А. Левенко, Н.М. Пивень, 1986), [4, 5].

Но это достоинство может стать опасным, если вводимый в культуру исходный материал не будет надежно проверен на отсутствие вирусов или оздоровлен от них.

Содержание вирусов в больном растении снижается по направлению к интенсивно растущей верхушке побега, а собственно апикальная меристема может быть совершенно свободной от вирусной инфекции (H. Limasset, P. Cornuet, 1949). Даже при термотерапии 36...38 °С без применения метода in vitro необходим довольно быстрый рост верхушки побега, так как угнетение его прироста высокой температурой в течение длительного времени (180 сут и более) снижает выход оздоровленных растений по сравнению с меньшей продолжительностью (50-80 сут) воздействия высокой температуры (соответственно 21,5 и 70 %) [6].

Первые работы по оздоровлению винограда термотерапией in vitro провели в 60-х годах (E.M. Gifford, W.B. Hewitt, 1961). К концу прошлого века успешно оздоровили различные сорта винограда от неповирусов и большинства клостерных вирусов комбинированием термотерапии в течение 4, 6 и 8 недель и меристемной культуры in vitro [7]. Под действием непродолжительной термотерапии и меристемной культуры растения легко проходили оздоровление от неповирусов и значительно труднее — от клостерных вирусов, при этом размер выделяемых меристем играет очень важную роль.

Методика выращивания побегов из меристем с листовыми зачатками при 38 °С. В качестве исходных эксплантов мы использовали верхушки побегов подвоя Riparia x Rupestris 101-14 и сортов Бианка, Подарок Магарача, Антей магарачский (меристемы с листовыми зачатками) размером 0,5-1 мм, отчлененные от растений с корнями, выросших in vitro на среде PG (plants growth medium), или от побегов, образовавшихся на твердой среде ShG (shoots growth medium), содержащей 0,5 мг/л бензиламинопурина.

В связи с тем, что при высокой температуре (38 °С) могут быть другие физиологические потребности в содержании компонентов питательной среды, в опытах использовали минеральные вещества (T. Murashige, 1962; J.P. Nitsch,C. Nitsch, 1969), витамины (0,5; 5 и 10 мг/л тиамина, пиридоксина и никотиновой кислоты), регуляторы роста (0,2; 0,5 и 1,5 мг/л бензиламинопурина, 0,2 и 0,5 мг/л индолилуксусной кислоты, перед автоклавированием добавляли 2 мг/л гиббереллина A_3). Оптимальной оказалась модифицированная среда Мурасига и

Скуга для роста побегов из меристем с листовыми зачатками (MG-medium) с концентрацией 0,5 мг/л бензиламинопурина. Проверяли влияние повышенного осмотического давления в среде под воздействием сахарозы и маннита: 10, 30 и 60 г/л сахарозы; совместного добавления в среду 10 г/л сахарозы и 14 г/л маннита; 20 г/л сахарозы и 20 г/л маннита. Оптимальная среда — 30 г/л сахарозы. Испытывали различные режимы температуры: высаженные на среду экспланты сразу же переносили в термостат при 38 °С; в течение 7 сут (через день) постепенно повышали температуру — 28, 30, 32, 34, 36, 37 и 38 °С; меристемы с листовыми зачатками предварительно культивировали в течение 7 сут при 28 °С, а затем сосуды с ними переносили в термостат при 38 °С. Оптимальные для роста побегов при 38 °С — постепенное повышение температуры от 28 до 38 °С и 7-дневное культивирование меристем при 28 °С с последующей установкой в термостат при 38 °С. Уровень значимости этих вариантов $P < 0,05$. Между этими режимами достоверные различия не установлены.

Сначала термотерапию (38 °С) проводили при культивировании меристем на агаризованной (50 сут) среде MG-medium (с 0,5 мг/л бензиламинопурина) до развития побегов длиной 10-15 мм, затем вычленяли из них верхушки (апексы) размером 0,5-1 мм и повторяли термотерапию на твердой среде MG-medium (0,5 мг/л бензиламинопурина) в течение 48 сут. От побегов длиной 10-15 мм отрезали апексы размером 0,5-1 мм и культивировали их в жидкой среде MG-medium с 0,5 г/л бензиламинопурина. Побеги укореняли, растения размножали в культуре in vitro и пересаживали их на адаптацию в условиях in vivo в теплицу по методикам, разработанным В.А. Зленко, Л.П. Трошиным и И.В. Котиковым (1995, 2001).

Для выращивания побегов из меристем с листовыми зачатками размером 0,5-1 мм при высокой температуре (38 °С) мы не брали заведомо пораженный вирусами исходный материал, но данное исследование может представлять интерес в методическом плане.

Прививка зеленых глазков с листом растений, выращенных in vitro, на стандартные вызревшие черенки подвоя. На зеленые побеги подвоя высотой около 45 см, произраставшие в теплице, прививали латеральные или апикальные почки, выросшие in vitro. Разработали способ прививки одноглазковых черенков с листом, полученных при разделении растений, выращенных in vitro, на стандартные вызревшие черенки подвоя длиной 40-45 см. После образования кругового каллуса на поперечных срезах привитые черенки высаживали в теплицу для получения стандартных привитых саженцев. После начала развития зеленой почки привоя с прививок снимали влагоудерживающие полиэтиленовые чехлики, а еще через 10-14 сут убирали затеняющую пленку. Выход привитых саженцев формы Магарач № 65-74-30 на подвое Берландиери х Рипариа Кобер 5ББ и сорта Таврия на подвое Рипариа х Рупестрис 101-14 составил соответственно 61 и 74 % (С.Ю. Дженеев, К.А. Барабальчук, В.А. Зленко, 1988).

Получение растений винограда с вызревшей лозой in vitro в состоянии зимнего покоя. При необходимости размножения большого количества растений in vitro важное значение имеет сохранение жизнеспособности размноженных растений в летне-осенне-зимний период до их массовой высадки весной в почву в условиях in vivo.

Для долгосрочного хранения генотипов винограда, повышения приживаемости растений после их высадки в почву и упрощения процесса их адаптации к условиям in vivo разработан способ получения растений in vitro с вызревшей лозой. Вызревание побегов у растений in vitro отражало генетическую предрасположенность сортов к этому физиологическому процессу. Так, у сорта Подарок Магарача очень хорошо вызревает лоза как в полевых условиях, так и у растений in vitro (большее количество глазков) по сравнению, например, с сортом Интервитис Магарача (С.Ю. Дженеев, В.А. Зленко, С.Ж. Губарь, 1991).

Растения с вызревшей лозой in vitro (микросаженцы) можно долго (в течение

нескольких лет) хранить плотно упакованными в ящиках без освещения при температуре -1...-7 °С, перевозить на большие расстояния в зоны, закрытые по карантинным объектам, и таким образом создавать коллекцию сортов in vitro, не требующую повторных пересадок. При необходимости растения с вызревшей лозой могут быть разрезаны на одноглазковые экспланты, пересаженные на свежую среду PG или MG-medium с 0,5 мг/л бензиламинопурина, для развития зеленых побегов на них при 27 °С, 16-часовом освещении в сутки и их дальнейшего размножения.

Весной растения in vitro с вызревшей лозой высаживали в почву в условия in vivo, как и обычные саженцы небольших размеров, без создания для них каких-либо комфортных условий, аналогичных тепличным при повышенной влажности воздуха на особым образом приготовленном субстрате. По степени вызревания лозы и способности вызревших глазков к прорастанию после промораживания при низкой температуре (-15...-30 °С) можно судить о морозоустойчивости сортов и сеянцев винограда. Использование полноценных глазков для прививки на стандартные вызревшие черенки длиной около 45 см повышает выход привитого посадочного материала и упрощает этот процесс по сравнению с прививкой зеленых глазков с листом.

Применение оздоровления и размножения посадочного материала винограда методами in vitro позволит ускорить внедрение в производство новых устойчивых сортов и высокопродуктивных клонов с хорошим качеством урожая.

ЛИТЕРАТУРА

1. Martelli G.P., Walter B. Virus certification of grapevines (in: Hadidi A., Khetarpal R.K., Koganezawa H. (Eds.): Plant Virus Disease Control). — 1998. - P. 261-276.
2. Krake L.R., Steele Scott N., Rezaian M.A., Taylor R.H. Graft-transmitted Diseases of grapevines / CSIRO Publishing. — 1999.
3. Audeguin L, Boidron P., Bloy P., Grenan S., Leclair P., Boursiguot J.M. L'Experimentation des clones de vigne en France. Etats des lieux, methodologie et perspectives / Progres Agricole et Viticole. — Montpellier, 1999. — 116 (22). — P. 486-491.
4. Zlenko V.A., Troshin L.P., Kotikov I.V. An optimized medium for clonal micropropagation of grapevines / Vine, 1995. — 34. — P. 125-126.
5. Zlenko V.A., Troshin L.P., Kotikov I.V. Der Einfluss der Nahrmedienzusammensetzung bei der in vitro-Vermehrung verschiedener Rebgenotypen / Mitteilungen Klosterneuburg. — 2001. — 51. - P. 15-26.
6. Kuniyuki H., Betti J.A., Costa A.S. Prolongated heat-treatment reduces the obtention of virus-free grapevines by means by means of shoot tip propagation / Fitopatologia Brasileira. -1994. — 19. — P. 209-213.
7. Regner F., Brandt S., Romann H., Stadlhuber A. In vitro-Virusseliminierung bei Reben (Vitis sp.). — Mitteilungen Klosterneuburg. — 1995. – 45 (3). — P. 67-74.

Опубликовано в журнале:

ВИНОДЕЛИЕ И ВИНОГРАДАРСТВО. – 2003. - № 3. – С. 38-39.