УДК 634.8

Радько В.Г.,
Шудренко І.В.

ВИРОЩУВАННЯ ЕКОЛОГІЧНО ЧИСТОГО САДИВНОГО МАТЕРІАЛУ ВИНОГРАДУ

Важлива роль при вирощуванні екологічно чистого садивного матеріалу винограду методом in vitro відводиться розмірам ініціальних експлантантів. Для введення у стерильну культуру in vitro відбирались експлантанти із зелених пагонів на живцях визрілої лози, заготовленої у зимовий період, а також із зелених пагонів вегетуючих рослин безпосередньо у полі в літній період. Встановлена залежність між розмірами експлантантів та їх приживлюваністю.

Дослідження, що були проведені у 1950-1960 роках у Житомирському сільськогосподарському інституті (Барановський А. О.), а також практичний досвід аматорів-виноградарів у нинішній час, підтвердили можливість успішного вирощування морозостійкого винограду в умовах Центрального Полісся України.

Протягом останніх років селекціонерами виведено багато нових комплексностійких перспективних сортів винограду, що мають підвищену морозостійкість, індивідуальну або групову стійкість проти грибкових хвороб. Існують також випробувані практикою сорти з хорошими технологічними якостями. Але садивного матеріалу не вистачає в достатній кількості, так як існуючі методи вегетативного розмноження забезпечують невисокий вихід саджанців.

Більш перспективним в цьому відношенні є клональне мікророзмноження рослин методом in vitro з дуже високим коефіцієнтом розмноження ($1*10^{-5}$) та екологічною чистотою вихідного матеріалу. Даний метод має ще цілий ряд переваг у порівнянні з традиційними, а саме: дозволяє вирощувати екологічно чистий безвірусний, безбактеріальний, безраковий генетично однорідний садивний матеріал; можна розмножувати сорти, що погано вкорінюються звичайним способом; при розмноженні виключається можливість перезараження рослин; дозволяє отримати максимальну кількість рослин з одиниці площі та довгий час зберігати пробірочні рослини при відповідних умовах [1].

При клональному мікророзмноженні рослин існує декілька головних моделей, які характеризуються різним ступенем надійності у відношенні генетичної стабільності організму, високим коефіцієнтом розмноження та універсальністю. До таких моделей відносяться: 1) отримання калусної тканини з наступною індикацією органогенезу; 2) індукція розвитку пагонів безпосередньо із тканини експлантанта; 3) проліферація пазушних пагонів.

Найбільше розповсюдження на практиці отримала третя модель розмноження- проліферація пазушних пагонів, що базується

на знятті апікального домінування. Даний метод є найбільш надійним при виробництві садивного матеріалу не тільки винограду, але й інших сільськогосподарських культур- плодових, ягідних, декоративних. Зняття апікального домінування може здійснюватись двома шляхами: 1) отримання пагонів наступним їх діленням на одновічкові мікроживці, які використовуються як вторинні експлантанти для повторення циклу розмноження. Теоретична можливість такого способу складає щонайменше 100 тис. пагонів у рік при умові, що за два місяці можна отримати один пагін з 8-10 мікроживцями; 2) зняття апікального домінування шляхом введення у поживний розчин цитокініну, що призводить до формування пагонів з відносно вкороченими міжвузлями, а пазушні бруньки і меристематичні клітини дають початок для нових пагонів. Експлантанти на таких середовищах набувають вигляд пучків невеликих пагонів, кожен з яких може бути розклонований. На практиці найбільш розповсюджений перший спосіб.

Метод зняття апікального домінування відносно універсальний і має мінімальний ступінь ризику отримання неоднорідного потомства, а частка мутантних рослин, як правило, не перевищує їх кількості при розмноженні традиційно прийнятими методами.

Більшість рослин піддаються переведенню у стерильну культуру під час вегетації у фазі активного росту, але відбір експлантанта залежить від його розміру, пори року, фази розвитку материнської рослини та його розміру [2]. Відомо, що кращим строком для введення експлантантів у стерильну культуру є фаза виходу рослини із стану спокою - це початок активного росту та активний її ріст. Експлантанти в цей час найменше піддаються негативним впливам, які пов'язані із процесами окислення і поліконденсації фенольних сполук. Нами були проведені дослідження з визначення оптимальних розмірів ініціальних експлантантів для введення у стерильну культуру in vitro сортів Трамінер рожевий, Рислінг італійський, Кардинал, Р*Р-101-14. Оздоровлені маточні рослини одержані від НВО "Віерул". Вихідний матеріал довжиною 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 см відбирався із зелених пагонів вегетуючих маточних оздоровлених рослин безпосередньо у полі в травні-липні та із зелених пагонів визрілої лози, заготовленої у грудні-лютому. Заготовлену взимку лозу нарізали на 3-4 вічкові живці розміром 15-20 см із визрілими бруньками, які протягом 2-3 діб вимочували при кімнатній температурі в розчині індолілоцтової кислоти (2мг /л) і ставили на пророщування при температурі 18-22^{0}С. Через 25-30 діб на черенках розвивались зелені пагони, з яких відбирались експлантанти і висаджувались по одному в кожну лабораторну пробірку з попередньою їх стерилізацією. Стерилізація є однією із головних умов успішного культивування ізольованих органів, тканин і клітин. Необхідність ретельної стерілізації обумовлена тим, що на штучних поживних середовищах одночасно із експлантантами добре розвиваються і мікроорганізми. У результаті життєдіяльності мікро-

організмів може істотно змінитись склад поживного середовища і, крім того, вони легко пошкоджують експлантанти. Стерилізують бокс, інструменти, посуд, вихідний рослинний матеріал, поживний розчин та інші матеріали, необхідні для роботи.

У наших дослідженнях стерилізація експлантантів полягала у промивці їх під проточною водою протягом 2 годин із наступною обробкою 70% етанолом та гіпохлоридом натрію. з експозицією, відповідно, 1 хвилина та 4 хвилини у склянках об`ємом 200 мл і наступним витримуванням матеріалу у стерильній дистильованій воді протягом 10-15 хвилин. Всі операції з переведення винограду у стерильну культуру проводились у ламінар-боксі.

Обов`язковою умовою технології мікророзмноження є наявність поживного середовища, але відношення різних рослин до його складу неоднакове [3]. Як правило, для ізольованих клітин і тканин поживне середовище повинно включати всі необхідні рослинам макроелементи: азот, фосфор, калій, сірку, магній, залізо та мікроелементи: бор, цинк, мідь, кобальт, марганець, йод, молібден, а також вітаміни, вуглеводи, фітогормони. Крім того, до складу поживного розчину входить етилендиамінтетраоцтова кислота (ЕДТА) чи її натрієва сіль, які покращують доступність заліза для клітин у широких межах pH.

Вуглеводи є необхідним компонентом поживного розчину для культивування ізольованих клітин і тканин, так як у більшості випадків останні не здатні до автотрофного живлення. Частіше всього як джерело вуглеводів використовують глюкозу в концентраціях 20- 40 г/л.

Регулятори росту необхідні для дедиференціювання клітин та для індукції клітинних ділень. Тому для отримання калусних тканин до складу поживного середовища повинні обов'язково входити ауксини, які викликають клітинне дедиференціювання, та цитокініни, які викликають поділ дедиференційованих клітин. Як джерело ауксинів у поживних середовищах використовують 2,4-дихлорфеноксиоцтову кислоту, індолілоцтову кислоту нафтилоцтову кислоту. Для індукції утворення калуса використовують більш високі концентрації ауксинів, а при наступних пересадках тканина може рости при вмісті ауксинів у декілька разів меншому.

Як джерело цитокінінів у штучних поживних середовищах використовують кінетин, 6 - бензиламінопурин, зеатин, аденін. Зеатин та 6- бензиламінопурин проявляють більш високу активність у підтриманні росту ізольованих тканин і індукції органогенезу в порівнянні з кінетином.

Для приготування твердих поживних розчинів використовують агар-агар, який являє собою полісахарид. Як правило до середовища додають 5-7% агар-агару.

Нами для приживлення експлантантів та вирощування мікроклонів було використане поживне середовище Мурасиге-Скуга із застосуванням цукрів, вітамінів, фітогормонів. Як джерело освітлення використовувались люмінісцентні лампи, що забезпечували освітленість рослин в межах 2-5 тис. люкс із періодом освітлення

16 годин і температурним режимом у культуральному боксі +24 °С.

Дослідженнями встановлено, що розміри експлантантів, відібраних із зелених пагонів визрілої лози, впливали на їх приживлюваність та проліферацію бруньки. Результати досліджень наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Вплив розмірів експлантантів, відібраних із зелених пагонів визрілої лози, на приживлення та час проліферації бруньки

№ пп	Сорт	Фізіологічний стан експлантанта	Розмір експлантанта, см	Час проліферації бруньки, діб	Приживлення, %
1	Рислінг італійський	Одновічкові живці	1,0	10	60
			1,5	10	60
			2,0	10	55
			2,5	12	53
2	Трамінер рожевий	Одновічкові живці	1,0	12	60
			1,5	11	58
			2,0	14	50
			2,5	12	52
3	Кардинал	Одновічкові живці	1,0	8	80
			1,5	8	80
			2,0	10	75
			2,5	10	70
4	Р*Р- 101-14	Одновічкові живці	1,0	9	70
			1,5	9	70
			2,0	10	65
			2,5	10	65
	$НІР_{05}$,%				5,2
	Р,%				4,1

При введенні у стерильну культуру винограду приживлюваність експлантантіа, відібраних із зелених пагонів визрілої лози довжиною 1,0-1,5 см, була кращою, ніж довжиною 2,0-2,5 см, і для сортів Рислінг італійський та Трамінер рожевий складала 58-60%, а для підщепи Р*Р-101-14 близько 70%. Найвища їх приживлюваність при довжині 1,0-1,5 см отримана в цілому в дослідах для сорту Кардинал-80%. Очевидно, гібридні сорти, до яких відноситься Кардинал, краще реагують на умови вирощування in vitro.

Час проліферації бруньки залежно від сорту коливався в межах 8-12 днів.

Із збільшенням довжини експлантантів до 2,0-2,5 см їх приживлення зменшувалось до 50-75%. Кращий результат для цього розміру отримано, як і в попередньому випадку, для сорту Кардинал, де їх приживлюваність складала 70-75% від загальної кількості висаджених.

Час проліферації бруньки був дещо довший, ніж при розмірі експлантантів 1,0-1,5 см і складав 8-14 діб. Виявленно, що із збільшенням розміру експлантанта збільшується і період проліферації бруньки. Аналогічні дані отримані і для експлантантів, відібраних із зелених пагонів рослин безпосередньо у полі в період вегетації рослин. Дані досліджень наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

Вплив розмірів експлантантів відібраних із зелених пагонів вегетуючих кущів у полі на приживлення та час проліферації бруньки

№ п/п	Сорт	Фізіологічний стан експлантанта	Розмір експлантанта, см	Час проліферації бруньки, діб	Приживлення, %
1	2	3	4	5	6
1	Рислінг італійський	Одновічкові живці	1,0	8	60
			1,5	8	60
			2,0	9	50
			2,5	9	50
2	Трамінер рожевий	Одновічкові живці	1,0	9	65
			1,5	9	60
			2,0	10	55
			2,5	10	53
3	Кардинал	Одновічкові живці	1,0	8	75
			1,5	8	70
			2,0	9	60
			2,5	10	55
4	Р*Р 101-14	Одновічкові живці	1,0	8	70
			1,5	8	70
			2,0	10	65
			2,5	11	65
	НІР $_{05}$,%				4,7
	Р,%				4,3

Приживлення експлантантів довжиною 1,0-1,5 см відбувалося краще, ніж експлантантів довжиною 2,0-2,5 см. Загальний відсоток приживлюваності для розміру 1,0-1,5 см знаходився в межах 60-75%, а для розміру 2,0-2,5 см, відповідно, до 50-60%. Найвища приживлюваність отримана для сорту Кардинал і складала 70-75% при довжині експлантантів 1,0-1,5 см та 55-60% при довжині 2,0-2,5 см.

Час проліферації бруньки був дещо коротший, ніж у експлантантів, відібраних із зелених пагонів визрілої лози, і коливався в межах 8-11 днів в залежності від сорту та довжини.

Таким чином, для експлантантів, відібраних із зелених пагонів визрілої лози, заготовленої в зимовий період, або відібраних із вегетуючих рослин безпосередньо в полі під час вегетації в літній період, при введенні у стерильну культуру in vitro кращий розмір їх був 1,0-1,5 см. На поживному середовищі Мурасиге-Скуга приживлюваність експлантантів при такій довжині коливалась в межах 58-80%, а із збільшенням розміру до 2,0-2,5 см зменшувалась до 50-75%. В порівнянні з існуючими методами вегетативного розмноження такий відсоток приживлення, безперечно, значно вищий, а враховуючи високий коефіцієнт розмноження методом in vitro можна значно прискорити забезпечення споживачів екологічно чистим садивним матеріалом винограду.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Бутенко Р.Г., Катаева И.В.* Клональное микро-размножение растений.- М.: Наука, 1983. -96с.

2. *Высоцкий В.А.* Клональное микроразмножение растений.- М.:Наука, 1986.-101с.

3. *Дорошенко Н.П.* Испытание питательных сред при клональном микроразмножении винограда// Виноградарство и виноделие СССР.-1990.- №3. - С. 61.

Радько В.Г. - кандидат сільськогосподарських наук, доцент.
Шудренко І.В. - кандидат сільськогосподарських наук, доцент.