

**ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ПРИ
КЛОНАЛЬНОМ МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ ВИНОГРАДА****И.М.АЛИМАМЕДЗАДЕ, Т.Г.КАРАГЕЗОВ***Институт Ботаники Национальной Академии Наук*

В исследованиях по клональному микроразмножению растений важным этапом является не только определение генетически детерминированной компетентности к гормональным индукторам морфогенеза, но и преодоление или максимальное снижение влияния абиотических факторов в культуре.

Факторы, индуцирующие формирование культурального фенотипа, как правило, вызывают признаки витрификации, которые могут развиваться и под влиянием высоких концентраций фитогормонов. Результативность и успех клонального размножения определяются в конечном итоге правильно подобранной схемой технологического подхода.

Целью данной работы явилось сравнительное изучение эффективности питательных сред при использовании трехступенчатой схемы клонального размножения.

Данный технологический подход относительно питательных сред рекомендован для всего семейства *Vitaceae*, и столь широкий систематический диапазон уже изначально позволял предполагать различную эффективность рекомендуемых питательных сред для многих видов и сортов данного семейства. Кроме того, трехэтапность стадий культивирования, различающихся между собой, также должна быть специфически связана с генотипическими особенностями размножаемых сортов.

Известно, что стадия 1 применяется для получения стерильных, хорошо растущих пробирочных растений в условиях *in vitro*, используемых для дальнейшего клонирования. Растения, растущие на этой стадии, лишены корневой системы, но обладают скоростью развития вегетативной части, обеспечивающей достижения высоты 10-12 см в течение 6 недель, тогда как размножение с одновременным укоренением занимает не менее 7 недель, причем подобные временные показатели относят к быстрому клональному микроразмножению.

Анализ полученных результатов показал, что уже на первом этапе (стадия 1) культивирования в присутствии 0,1 мг/л БАП происходило не только формирование побега, но и образование корневой системы.

Полученные результаты показали, что у всех изученных генотипов появление первого листа из пазушных почек произошло за одно и то же время и отмечено на 6 сутки после перенесения первичного эксплантата на питательную среду.

Время появления второго листа у всех генотипов винограда отражает продолжение пролиферации пазушных почек и характеризовало особенности этого процесса.

Динамика и характер побегообразования у каждого генотипа были специфичны, что отчетливо прослеживается на всем протяжении развития растений в пробирочной культуре. Начало развития побега, после одновременного появления первого листа у изученных сортов происходило в различное время.

Материалы и методы исследования

Объектами служили следующие генотипы столовых сортов винограда: Маранди, Аг Кишмиш и Аг Шаны. Донорские растения получали по разработанному нами способу (1) и культивировали в условиях камеры искусственного климата. В качестве первичного эксплантата использовались отрезки побегов с одной пазушной почкой, стерильные эксплантаты (5) высаживались на питательные среды, основу которых составляла базовая среда МС (10).

Культивирование *in vitro* проводили в пробирках различного свободного объема: 90; 60; 30 м³. Индукцию морфогенеза осуществляли на средах, содержащих бензиламинпурин (БАП) в различных концентрациях, в зависимости от этапов размножения. За основу брался трехэтапный метод микроклонального размножения (9).

Результаты и их обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что морфогенетические способности могут быть не связаны с интенсивностью их протекания во времени, как это отмечается в наших исследованиях, однако, по нашему мнению, значительные коррективы в подобную взаимосвязь вносит степень внутренней инфицированности исходного материала, в первую очередь, влияющая на эффективность морфогенеза и развития в условиях *in vitro*.

Отношение длины вегетативной части пробирочной культуры к длине основного корня, были различны и зависели от особенностей интенсивности протекания ростовых процессов. Динамика развития корневой системы у исследованных генотипов была различна.

Несмотря на то, что пролиферация пазушных почек является первичной по отношению к процессу индукции корнеобразования, дальнейшее развитие побегов, после одновременного появления первого листа, у всех генотипов протекало по-разному.

Различное начало морфогенетических процессов и дальнейший рост и развитие пробирочных растений винограда, несомненно, генотипически детерминировано и зависит от компетентности каждого сорта, в первую очередь, к гормональному фактору, присутствующему в среде и от его взаимодействия с эндогенным балансом фитогормонов. Различия могут быть также связаны с особенностями генотипов относительно их поведения и требовательности к элементам минерального питания, исходя из состава питательной среды.

Немаловажную, а может быть и определяющую роль, видимо, играют и адаптивные способности генотипов, так как условия нахождения в культуре яв-

ляются по многим причинам стрессовыми и требуется различное время для реализации морфогенетических потенциалов каждым генотипом.

Вторая стадия микроразмножения характеризовалась изменениями в питательной среде – увеличенным содержанием БАП до 2,0 мг/л, включением в состав среды солей аденина и фосфата натрия.

Все генотипы положительно реагировали на увеличение цитокинина в среде и изменение состава среды.

Несмотря на то, что нами не были отмечены такие нежелательные эффекты как образование каллуса, утолщение базальной части черенков, утолщение корней, необходимо осторожно относиться к использованию рекомендованных высоких концентраций цитокининов, отрицательное влияние которых может проявиться при дальнейших субкультивированиях, из-за накопления их в тканях культивируемых растений, причем, в зависимости от генотипа, это может произойти на любых последующих этапах размножения.

Увеличенное содержание в среде БАП, равное 20-кратному, по сравнению с первой стадией размножения, привело к изменению времени пролиферации пазушных почек и образования корней.

Важным результатом проведенных исследований явилось то, что уже на первой стадии размножения стало возможным получать нормальные пробирочные растения с хорошо развитой корневой системой. Эти растения могут черенковаться и использоваться как материал для размножения или же непосредственно переноситься в почвенные условия.

Таким образом, создается возможность ограничиться двумя повторными стадиями без изменения состава питательных сред и, самое главное, без увеличения уровня цитокининов в среде.

Естественно, что скорость развития растений на среде с 0.1мг БАП уступает таковой на среде с БАП 2,0 мг/л. Однако, сравнивая полученные данные видно, что это ускорение; не было столь значительным, если учесть, что БАС увеличивался 20-тикратно, а ускорение развития побегов даже не было двукратным. Но даже, в случае если бы рост стимулировался на стадии 2 в большей степени, это не компенсирует возможность опасности отрицательного действия цитокининов на последующих субкультивированиях, приводящее не только к возможной генетической нестабильности, но и потере всей размножаемой линии.

Согласно технологической схеме варианта клонального микроразмножения, испытанного нами, укоренению должны подвергаться пробирочные растения, полученные на стадии 1 и размноженные на стадии 2. Однако, в связи с тем, что полученные генотипы уже на стадии 1 образовывали корнеспособные пробирочные растения, нами была исключена стадия 2 с высокими концентрациями фитогормона и экспериментам с индукцией ризогенеза по схеме были подвергнуты растения, полученные на стадии 1.

Исходя из полученных результатов, стадия 3 теряет смысл и необходимость проведения, более того, укоренение черенков от корнеспособных растений – это процесс, который будет проходить на несколько измененном гормональном фоне, чем тот, который должен был бы проходить, когда укоренялись бы черенки от растений без корневой системы.

Для полноты проведения экспериментов данной схемы, нами были испытаны два индуктора корнеобразования – ИУК, как рекомендовано и ферруловая кислота.

Предваряя обсуждение результатов по индукции следует отметить, что на этапе укоренения, первичным эксплантатом служит уже не черенок с пазушной почкой, а черенок с одним развитым листом и пазушной почкой.

Среда, используемая для укоренения, отличалась снижением концентрации, фосфорнокислого натрия, мезо-инозита (в 4 раза), сахарозы (в 3 раза) и исключением сернокислого аденина, что приводило к значительному обеднению питательной среды.

При анализе результатов индукции корнеобразования сортов во втором варианте микроразмножения также были получены результаты, свидетельствующие о том, что применение ферруловой кислоты более эффективно во времени индукции образования корней, чем в случае с ИУК. Растения, растущие на среде с ферруловой кислотой, превосходят по длине корневой системы и побегов растения, укорененные на среде с присутствием ИУК.

На среде с ферруловой кислотой формирование пробирочных растений происходило в более короткие сроки, чем на среде с ИУК. Для некоторых сортов разница во времени полного формирования растений на разных средах, может достигать 11-12 дней.

Проведенные эксперименты и полученные результаты приводят к выводу о более предпочтительном использовании для укоренения варианта, испытанного нами, с использованием ферруловой кислоты. Таким образом, проведенные исследования дали возможность модифицировать использованную методику и предложить следующий подход, заключающийся в следующем:

1. В совмещении стадии введения в культуру и стадии укоренения в присутствии минимальных количеств цитокинина (0,1 мг/л БАП), что позволяет минимизировать его накопление в тканях растения.

2. В использовании ферруловой кислоты вместо ИУК, что позволяет использовать эндогенный пул ауксина при индукции корнеобразования.

Практически, и первая, и третья стадии равноценны в своих эффектах и результатах, и это дает возможность чередовать использование БАП и использование ферруловой кислоты в технологической схеме микрклонального размножения растений винограда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Qaragözov T.H., Məmmədova M.H., Əsədova S.Ş., Əliməmmədşadə İ.M, Nəsnov F.E. Üzümün tezləşdirilmiş çoxaldılması. Bakı, 2004, s. 25-40
2. Бургуни А.Б., Бутенко Р.Г., Катаева Н.В., Блодрига П. Быстрое клональное размножение виноградного растения. С/х биология. №7, 1983, с. 48-50
3. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964, 272 с.
4. Голодрига П., Зленко В.А., Чекмарев Л.А. и др. Методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда. Ялта:1986, 56 с.
5. Карагезов Т.Г., Махмудова И.М., Луканина Н.Н. Генотипические особенности морфогенеза винограда при микрклональном размножении в условиях *in vitro*. Изв. АН Азерб ССР. Серия биологических наук, №5, 1988, с. 14-20.
6. Катаева И.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. М.: Наука,

- 1983, 96 с.
7. Марченко А.О., Голодрига Н., Клименко В.П., Пивень Н.М. Соматический эмбриогенез в культуре ткани винограда. Физиология и биохимия культур растений. т.19, 1987, с. 408-411.
 8. Самедов А.Н., Могилевская М.И., Карагезов Т.Г., Худавердиев С.Р., Алиев Л.А. Обнаружение возбудителей бактериозов винограда на территории Абшерона. Изв. АН Азерб ССР. Серия биологических наук, №6, 1988, с. 18-23.
 9. Lydi Kytel In Plants from Test tubes in introduction to micropropagation. Timber Press. Portland Oregon. 1990, p. 125-126.
 10. Murshige T., Skood F.A. A resived medium for rapid growth and bioassays. Physiol. Plant v.15, 1962, p. 473-477

ÜZÜMÜN MİKROKLONAL ÇOXALDILMASI ZAMANI TEXNOLOJİ YANAŞMANIN XÜSUSİYYƏTLƏRİ

İ.M.ƏLİMƏMMƏDZADƏ, T.H.QARAGÖZOV

XÜLASƏ

Ferrul turşusunun mərhələlərdə istifadəsi onların hər ikisinin də yaxşı nəticə effektivinə malik olmalarını göstərir. BAP-ın minimal istifadəsi onun toxumalarda toplanmasını azaldır, ferrul turşusunun istifadəsi (İST əvəzinə), rizogenezin, induksiyası zamanı endogen auksin pulunun istifadəsinə imkan yaradır.

CHARACTERISTICS OF TECHNOLOGICAL APPROACH DURING MICROCLONAL PROPAGATION OF GRAPE

I.M.ALIMAMEDZADE, T.G.GARAGOZOV

SUMMARY

A special technology is put into practice in this work. In this case both BAP and Ferrul Acid are used in different stages and this shows that both of them have the effect of result. Minimum use of BAP reduces its gathering in tissues. The use of Ferrul Acid (instead of IAA) helps the use of endogenous auxin "money" during the induction of rhizogenes.