УДК 581.143.6

DOI: 10.21779/2542-0321-2021-36-4-109–116

К.К. Мамедова, К.А. Дамирова, З.М. Алиева

Жизнеспособность и морфогенетический потенциал эксплантов сортов винограда *in vitro* в присутствии фитогормонов и хлорида натрия

Дагестанский государственный университет; Россия, 367000, г. Махачкала, ул. М. Гаджиева, 43а; kalimat.mamedova@mail.ru

Виноградарство является одной из ключевых отраслей экономики Республики Дагестан. При этом ресурсный потенциал винограда в Дагестане зачастую ограничивается широким распространением засоленных почв (до 55 % территории сельскохозяйственных угодий), в особенности хлоридного типа, приводящих к значительному снижению показателей роста, развития и урожайности культуры. В связи с этим актуальность исследования заключается в поиске адекватных методов диагностики солеустойчивости растений и выявлении устойчивых сортов. Среди методов оценки солеустойчивости все больше выделяются биотехнологические, в том числе клональное микроразмножение, основанные на оценке реакции на засоление изолированных клеток, тканей и органов растений.

В статье приведены данные по изучению влияния хлоридного засоления на виноград сортов Агадаи, Молдова, Ркацители и Августин в условиях *in vitro*. Такой подход позволяет в ускоренном темпе изучить их морфогенетический потенциал в среде без стрессового воздействия, в присутствии фитогормонов и при сочетании этих факторов.

Экспланты всех сортов характеризовались в целом высокой жизнеспособностью, в большей (Августин и Молдова) или меньшей степени (Агадаи и Ркацители) зависящей от наличия в среде регуляторов роста. Установлено, что ингибирующее действие NaCl в концентрациях 0,4 и 0,5 % в среде с регуляторами роста более выражено на эксплантах интродуцированных сортов Августин и Молдова.

Ключевые слова: виноград, эксплант, морфогенез, *in vitro*, клональное микроразмножение, NaCl, солеустойчивость.

Виноград (*Vitis vinifera* L.) – ценная культура, имеющая пищевое, лекарственное и техническое значение. Увеличение производства винограда требует как расширения площадей возделывания, так и разработки и совершенствования технологий, обеспечивающих ускоренное размножение перспективных сортов [1–5]. Для этой цели во многих регионах применяют, наряду с традиционными, современные биотехнологические методы, в частности микроразмножение в культуре *in vitro* [6–9]. С другой стороны, ресурсный потенциал винограда в Дагестане, климатические условия которого благоприятны для его выращивания, часто ограничивается широким распространением засоленных почв [10]. Это требует разработки методов оценки солеустойчивости и поиска устойчивых сортов. Для решения этой проблемы перспективно использование различных модельных систем, в т. ч. культивируемых *in vitro* органов растений.

Виноград в целом относят к солеустойчивым культурам. Однако его сорта часто проявляют разную степень устойчивости к различным типам засоления (NaCl и Na₂SO₄), которая может отличаться и в зависимости от типа почв (суглинистые и супесчаные), на которых произрастает виноградное растение. В связи с этим одни и те же сорта винограда разными авторами [11–13] могут быть отнесены к противоположным типам по солеустойчивости. Сведения о солеустойчивости винограда ограничены исследованиями по большей части в полевых условиях и имеют большой срок давности

[14; 15]. Использование модельных биотехнологических систем позволяет нам одновременно разрабатывать технологию введения в культуру *in vitro* и проводить оценку солеустойчивости растений, что приобретает особую актуальность для винограда [16] с точки зрения получения качественного посадочного материала.

Материал и методы исследования

Объектами исследований служили 4 корнесобственных сорта винограда: Агадаи (местный, аборигенный сорт), Молдова, Августин (перспективные интродуцированные сорта), Ркацители (промышленный винный сорт). Согласно литературным данным сорта Агадаи и Ркацители относят к более, а Молдову – к менее солеустойчивым, сведения же об устойчивости сорта Августин ограничены [11; 13]. В наши задачи входила оценка эффективности клонального микроразмножения винограда указанных сортов и его устойчивости к хлоридному засолению в культуре *in vitro*.

Эксперименты в условиях *in vitro* проводили по стандартной методике [17]. Для получения узловых эксплантов в асептических условиях изолировали верхушечные и пазушные почки, которые культивировали на агаризованной питательной среде Мурасиге–Скуга (МС) (далее – безгормональная, или минимальная среда МС). В качестве регуляторов роста (РР) были взяты 6-бензиламинопурин (БАП, 2,5 мг/л) и индолил-3 масляная кислота (ИМК, 0,5 мг/л) (далее – МС + РР, гормональная среда). Условия засоления моделировали добавлением в гормональную среду NaCl в концентрациях 0,4 и 0,5 %. Каждый вариант опыта включал 20 биологических повторностей. Культивирование эксплантов проводили в пенициллиновых пробирках в условиях климатической камеры (Sanyo MLR-352H) при температуре 24–25 °С и освещении 5 тыс. люкс при 16-часовом фотопериоде.

Состояние эксплантов в условиях *in vitro* оценивали по выживаемости, росту и количеству новообразованных листьев и почек. Подсчет количества почек и листьев проводили индивидуально на каждом экспланте и в каждом варианте рассчитывали среднее значение на эксплант. В таблицах приведены средние значения и их средняя арифметическая ошибка.

Результаты исследования

Проведенные исследования показали, что экспланты всех изученных сортов обладали высокой жизнеспособностью в культуре *in vitro*. Так, на 7-е сутки у всех сортов во всех вариантах наблюдалась высокая выживаемость (на уровне 100 %). На 28-е сутки на среде, содержащей регуляторы роста (ИМК и БАП), она варьировала в диапазоне 89–100 %. На минимальной (безгормональной) среде этот показатель также был высоким, за исключением сорта Агадаи, у которого он снизился до 40 % (табл. 1).

В условиях засоления на 7-е сутки опыта экспланты всех сортов также имели максимальные значения выживаемости (100 %). Видимое проявление эффекта засоления на изолированные структуры было отмечено только на 28-е сутки. Засоление среды хлоридом натрия в концентрациях 0,4–0,5 % не оказывало ингибирующего действия на экспланты сортов Агадаи и Ркацители, у которых выживаемость варьировала в этих условиях в диапазоне 90–100 %. У сорта Молдова в этих условиях отмечены самые высокие (100 %), а у Августин – самые низкие (63–67 %) показатели выживаемости.

В целом наиболее высокие показатели выживаемости эксплантов (100 %) по всем вариантам культивирования, как контрольным (без засоления), так и опытным (с засолением), отмечены у сорта Молдова. Наиболее чувствительным к изученным концентрациям соли оказался сорт Августин.

Таблица 1. Показатель выживаемости эксплантов представленных сортов на 7-е (а) и 28-е (б) сутки опыта

Сорта Варианты сред	Агадаи		Ркацители		Августин		Молдова	
	а	б	а	б	а	б	а	б
МС	100±10	40±10	100±0	100±0	100±0	90±10	100±10	100±0
МС + PP	100±10	90±5	100±10	100±0	100±0	100±10	100±10	100±0
МС + PP + NaCl 0,4 %	100±0	90±10	100±0	90±10	100±10	70±0	100±0	100±10
МС + PP + NaCl 0,5 %	100±5	90±0	100±0	90±10	100±10	60±10	100±10	100±10

Активность морфогенеза эксплантов изучаемых сортов оценивалась нами по закладке почек и количеству листьев на побегах. Эти процессы визуально фиксировались на 10–15-й день опыта. Данные по новообразовавшимся структурам на 28-е сутки культивирования в питательных средах приведены в табл. 2. Введение в минимальную среду регуляторов роста, которое незначительно влияло на общую выживаемость эксплантов [18], существенно повышало количество новообразовавшихся структур. Наиболее высоким морфогенетическим потенциалом в благоприятных условиях обладал сорт Августин, у которого формировалось 4 почки на один эксплант. У сорта Агадаи на среде с регуляторами роста количество почек на один эксплант составляло 2,9. Количество новообразовавшихся листьев также варьировалось в зависимости от варианта питательной среды. Количество листьев у сорта Агадаи составило от 2,3 до 2,6 на эксплант.

Таблица 2. Количество новообразованных структур на 28-е сутки

Варианты		МС	МС + PP	МС + PP + NaCl 0,4 %	МС + PP + NaCl 0,5 %
Сорта					
Агадаи	количество почек	2,5±0,7	2,9±0,7	4,3±0,7	3,8±0,7
	количество листьев	2,3±0,3	2,6±0,4	5,2±1,3	4,0±0,8
Ркацители	количество почек	2,0±0	2,2±0,3	3,0±1,3	2,5±0,5
	количество листьев	1,5±0,5	2,3±0,4	3,2±0,6	2,0±0,6
Августин	количество почек	1,0±0	4,0±0	2,3±0,4	3,3±0,7
	количество листьев	1,6±0,2	3,0±0	2,4±0,4	2,3±0,3
Молдова	количество почек	1,0±0	3,5±0,6	2,5±0,2	2,0±1,0
	количество листьев	1,0±0	2,7±0,3	2,2±0,3	1,7±0,7

В условиях засоления максимальное число почек отмечено у сорта Агадаи (рис. 1), при этом оно даже превышало показатели контрольного варианта (среды с регуляторами роста, но без соли), где составило в среднем 2,9 на эксплант. В варианте с NaCl 0,4 % показатель составил 4,3, при повышении концентрации соли в среде до 0,5 % снизился незначительно – до 3,8. Это говорит о некотором стимулирующем действии засоления на экспланты данного сорта и может свидетельствовать о его относительной солеустойчивости. Снижение количества листьев на эксплантах сорта Агадаи при повышении уровня засоления было более выраженным – в варианте с 0,4 % NaCl оно составило 5,2, а при увеличении концентрации соли – сокращалось до 4. Это объясняется неполной активностью в распускании почек, т. е. почки не формировали нормально развитые листья. У сорта Ркацители не отмечено достоверного снижения морфогенетических показателей на питательных средах с добавлением хлорида натрия. Некоторое снижение активности процессов закладки почек и листьев отмечено у сортов Молдова и Августин.

Рис. 1. Состояние эксплантов винограда (28-е сутки), культивированных на среде MC + PP + NaCl 0,4 %

У сорта Ркацители на 28-е сутки формировалось в среднем 2 почки на эксплант на безгормональной среде и 2,2 – на среде с PP. Наименьшее количество листьев (1,5 на эксплант) у этого сорта наблюдалось на среде MC без регуляторов роста, а на среде MC с введением ИМК и БАП оно несколько возрастало. Достоверных изменений указанных показателей в условиях засоления отмечено не было.

Существенные различия между вариантами MC и MC + PP отмечены у эксплантов сорта Августин. Так, количество почек возрастало здесь с 1 на эксплант на безгормональной среде до 4 почек на гормональной среде, а количество листьев – с 1,6 до 3, что является максимальным показателем на данной среде по всем изученным нами сортам. В условиях засоления среды хлоридом натрия число почек снижалось до 2,3–3,3, а листьев – до 2,3–2,4 на эксплант. Таким образом, хлорид натрия немного снизил ростовые показатели у сорта Августин.

Количество почек на эксплант у сорта Молдова на 28-е сутки культивирования варьировало от 1 на минимальной среде (MC) до 3,5 на среде MC + PP, количество листьев – соответственно от 1 до 2,7. В вариантах сред MC + PP + NaCl 0,4 % и MC + PP + NaCl 0,5 % число почек снижалось до 2,5 и 2 соответственно, а число листьев – до 2,2 и 1,7.

Ростовые показатели эксплантов изучаемых нами сортов отличались по вариантам (табл. 3). У сорта Агадаи в вариантах МС и МС + РР на 7-е сутки формировались побеги размером 1,1–1,3 см, на 28-е сутки они достигали размеров 2,1–2,5 см. Засоление не приводило к подавлению роста побегов у эксплантов этого сорта: на среде с 0,4 % NaCl рост побега увеличивался с 0,6 см на 7-е сутки опыта до 3,1 – на 28-е, а в варианте с 0,5 % NaCl – с 1 до 2,4 см.

Побеги, формирующиеся на эксплантах сорта Ркацители, несколько уступали по мощности развития побегам сорта Агадаи. Так, их размеры на 7-е сутки на минимальной среде составляли 0,4 см, а на гормональной – 1,1. На 28-е сутки эти показатели выросли до 0,7 и 1,5 см соответственно. Отмечено снижение роста побегов у эксплантов на среде с более высокой из испытанных концентраций соли. Так, на 28-е сутки опыта в варианте 0,4 % NaCl длина побега достоверно не отличалась от безсолевой среды, а в варианте 0,5 % NaCl – снижалась по сравнению с ней в 2 раза (с 1,5 до 0,7 см).

Уже на начальных сроках культивирования проявлялись различия между вариантами гормональной и безгормональной сред у эксплантов сорта Августин: при введении в среду гормонов размеры побегов возрастали в 3 раза – с 0,4 до 1,2 см. На 28-е сутки размеры побегов увеличились вдвое – 0,8 и 2,5 см соответственно. Длина побега эксплантов, культивируемых в условиях засоления в течение 7 суток в условиях менее интенсивного засоления (0,4 % NaCl), не отличаясь от безсолевых условий, составила 1,2 см. При повышении уровня засоления до 0,5 % NaCl размеры побегов существенно снижались (в 3 раза). Однако при более длительном культивировании различия между вариантами сглаживались.

Наименьшие ростовые показатели на 7-е сутки наблюдались у сорта Молдова. Так, на минимальной среде МС формировались побеги размером лишь 0,2 см, на среде с регуляторами – 0,7 см. На 28-е сутки наибольшее значение показателя (3,1 см) отмечено на среде МС + РР. Существенно тормозился рост побегов у эксплантов этого сорта в условиях засоления. Рост побега через 3 недели культивирования составил: на среде МС + РР + 0,4 % NaCl – 2,4 см, на среде МС + РР + 0,5 % NaCl – 1,1 см, тогда как в безсолевом варианте – 3,1 см.

Таблица 3. Ростовые показатели эксплантов точек роста (длина побега) сортов винограда

Варианты		МС	МС+РР	МС+РР+ NaCl 0,4%	МС+РР+ NaCl 0,5%
Сорта и сутки					
Агадаи	7-е сутки	1,1±0,1	1,3±0,2	0,6±0,4	1,0±0
	28-е сутки	2,1±0,1	2,5±0,4	3,1±0,3	2,4±0,3
Ркацители	7-е сутки	0,4±0,1	1,1±0,1	0,7±0,2	0,3±0,0
	28-е сутки	0,7±0,2	1,5±0,1	1,9±0,5	0,7±0,3

Августин	7-е сутки	0,4±0,1	1,2±0,2	1,2±0,2	0,4±0,1
	28-е сутки	0,8±0,2	2,5±0	2,4±0,4	1,9±0,8
Молдова	7-е сутки	0,2±0,0	0,7±0,3	0,7±0,1	0,4±0,1
	28-е сутки	0,9±0,1	3,1±0,2	2,4±0,6	1,1±0,4

Выводы

Анализ морфогенетического потенциала эксплантов сортов винограда, оцениваемый по количеству заложённых почек, активности роста из них побегов и количеству сформировавшихся листьев, показал более высокий коэффициент размножения на безгормональной среде МС у сортов Агадаи и Ркацители, что позволяет рекомендовать данные сорта как более экономичные при использовании современных методов размножения в культуре тканей. У сортов Молдова и Августин отмечено усиление формообразования при введении в питательную среду дорогостоящих регуляторов роста (ИМК и БАП).

Изучение солеустойчивости эксплантов в условиях *in vitro* показало, что NaCl в концентрациях 0,4 и 0,5 % не оказал существенного воздействия на их выживаемость, но влиял на рост и морфогенез. Показатели роста и развития варьировались в зависимости от сорта. Так, засоление, вызванное введением в среду с регуляторами роста NaCl в концентрациях 0,4–0,5 %, не оказывало отрицательного воздействия на экспланты сортов Агадаи и Ркацители и даже несколько усиливало активность их морфогенеза. Это согласуется с литературными данными о стимулирующем влиянии низких концентраций солей [19] и нуждается в дальнейшем исследовании. Интродуцированные сорта Августин и Молдова проявили более высокую чувствительность к изученным концентрациям хлорида натрия, что вызывает необходимость расширить диапазон концентраций в последующих работах.

Литература

1. Цхурбаева Ф.Х., Гаджинова К.Р., Гугкаева С.С. Экологическое состояние земельных ресурсов Республики Дагестан и их охрана // Известия Горского государственного аграрного университета. – 2015. – № 4 (52). – С. 352–358.
2. Юсуфов А.Г., Мамедова К.К., Сулейманов А.Ш. Специфика связи процессов морфогенеза у черенков винограда при засолении среды // Изв. вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. – 2013. – № 4. С. 67–70.
3. Дорошенко Н.П. Биотехнологические методы в системе производства сертифицированного посадочного материала винограда // Проблемы интенсификации и экологизации земледелия России / ДЗНИИСХ, 2006. – С. 365–369.
4. Рыфф И.И., Борисенко М.Н. Солеустойчивость подвойных сортов винограда в условиях *in vitro* // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2016. – № 4 (60). – С. 198–201.
5. Батукаев М.С., Дадаева Т.А., Этиева Т.Г., Шишхаева М.Г., Батукаев А.А. Биотехнологические методы ускоренного размножения винограда // Садоводство и виноградарство. – 2012. – № 6. – С. 22–26.
6. Лукаткин А.С., Грузнова К.А., Башмаков Д.И., Лукаткин А.А. Влияние регулятора роста эпин-экстра на растения пшеницы при действии тяжелых металлов // Агрохимия. – 2019. – № 2. – С. 81–88.

7. Бунцевич Л.Л., Захарова М.В., Костюк М.А., Данилюк Ю.П., Захарченко Р.С. Вирусные и вирусоподобные болезни плодовых культур и оздоровление растений способом клонального микроразмножения *in vitro* // Проблемы интенсивного садоводства. – Краснодар, 2010. – С. 191–193.
8. Дорошенко Н.П., Арестова Н.О., Соболев А.А. Особенности культивирования *in vitro* некоторых технических сортов винограда // Виноделие и виноградарство. – 2004. – № 4. – С. 34–36.
9. Сегет О.Л., Авдеенко И.А. Использование биологических методов при микроразмножении культурного винограда // Вестник КрасГАУ. – 2021. – № 1 (166). – С. 70–76.
10. Адамадиев К.Р. Оценка и прогноз показателей развития виноградарства Республики Дагестан методами эконометрического моделирования Н.К. Мирзоева // Экономический анализ: теория и практика. – 2009. – № 20 (149). – С. 31–37.
11. Загиров Н.Г., Аличаев М.М. Ампелоэкологическая оценка территории Терско-Сулакской низменности для расширения площадей под культуру винограда // Плодоводство и ягодоводство России. – 2014. – № 1 (40). – С. 134–137.
12. Аджиев А.М., Контаев И.А. Основы возрождения виноградо-винодельческой отрасли Дагестана // Виноград и вино России. – 1997. – № 1. – С. 2–4.
13. Стоев К. Физиология винограда и основы его возделывания. – София: Изд-во Болгарской АН, 2004. – Т. 3. – 255 с.
14. Багдасарашвили З.Г. К вопросу о солеустойчивости виноградной лозы // Почвоведение. – 1952. – № 6. – С. 551–561.
15. Березенко Г.Э. Пути повышения солеустойчивости виноградной лозы // Виноделие и виноградарство СССР. – 1953. – № 2. – С. 12–14.
16. Зеленская Н.Н., Подуст Н.В., Гоголинская Е.И. Влияние засухи *in vitro* на формирование и рост калусной ткани винограда // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2013. – № 1. – С. 62–65.
17. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры изолированных тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наукова думка, 1980. – 489 с.
18. Мамедова К.К., Нухманова П.Ш., Маазова Б.М. Реакция вегетативных структур черенков у сортов винограда на засоление среды // Вестник ДГУ. – 2016. – Вып. 1. – С. 119–126.
19. Бутенко Р.Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений. – М.: Наука, 1975. – 51 с.

Поступила в редакцию 10 сентября 2021 г.

UDC 581.143.6

DOI: 10.21779/2542-0321-2021-36-4-109–116

Viability and Morphogenetic Potential of Explants of Grape Varieties *In vitro* in the Presence of Phytohormones and Sodium Chloride

K.K. Mamedova, K.A. Damirova, Z.M. Alieva

*Dagestan State University; Russia, 367000, Makhachkala, M. Gadzhiev st., 43a;
kalimat.mamedova@mail.ru*

Viticulture is one of the key sectors of the economy of the Republic of Dagestan. At the same time, the resource potential of grapes in Dagestan is often limited by the wide spread of saline soils (up to 55% of the agricultural land), especially of the chloride type, leading to a significant decrease in the growth, development and yield of the crop, is chloride. In this regard, the relevance of the study lies in the search for adequate methods for diagnosing salt resistance of plants and identifying resistant varieties. Biotechnological methods, including clonal micropropagation, based on the assessment of the reaction to salinization of isolated cells, tissues and organs of plants, are increasingly distinguished among the methods for assessing salt resistance.

The article presents data on the study of the effect of chloride salinization on grapes of Agadai, Moldova, Rkatsiteli and Augustine varieties under *in vitro* conditions. This approach allows us to study their morphogenetic potential at an accelerated pace in an environment without stress, in the presence of phytohormones and with a combination of these factors.

Explants of all varieties were characterized by generally high viability, to a greater (Augustine and Moldova) or to a lesser extent (Agadai and Rkatsiteli) depending on the presence of growth regulators in the environment. It was found out that the inhibitory effect of NaCl at concentrations of 0.4 and 0.5% in an environment with growth regulators is more pronounced on explants of introduced varieties Augustine and Moldova.

Keywords: *grapes, explant, morphogenesis, in vitro, clonal micropropagation, NaCl, salt resistance.*

Received 10 September 2021