

УДК 634.836:631.532:631.544

DOI <https://doi.org/10.32851/2226-0099.2020.116.1.8>

## РОЗРОБКА СТРУКТУРОВАНОГО ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ АДАПТАЦІЇ ВЕГЕТАТИВНОЇ МАСИ І КОРЕНЕВОЇ СИСТЕМИ МІКРОКЛОНІВ ВИНОГРАДУ ДО УМОВ *IN VIVO*

**Зеленянська Н.М.** – д.с.-г.н., заступник директора з науково-інноваційної діяльності, Національний науковий центр «Інститут виноградарства і виноробства імені В.Є. Таїрова» Національної академії аграрних наук України

**Теслюк Н.І.** – к.с.-г.н., с.н.с.,

Біотехнологічний науково-навчальний центр

Одеського національного університету імені І.І. Мечникова

**Гоголінська О.І.** – к.с.-г.н., с.н.с.,

Національний науковий центр «Інститут виноградарства і виноробства

імені В.Є. Таїрова» Національної академії аграрних наук України

**Подуст Н.В.** – к.с.-г.н., с.н.с.,

Національний науковий центр «Інститут виноградарства і виноробства

імені В.Є. Таїрова» Національної академії аграрних наук України

У статті наведено результати досліджень щодо створення структурованого, модифікованого за сольовим складом, поживного середовища для культивування винограду *in vitro*, рекомендованого для укорінення ініціальних експлантів винограду в культурі тканин і органів *in vitro* та подальшої їх адаптації до умов *in vivo*. За основу було взято поживне середовище Мурашіге і Скуга (МС) (згідно з прописом). Доведено, що за показниками приживлюваності експлантів, інтенсивності проліферації пазушних бруньок, ризогенезу, біометричними показниками розвитку вегетативної маси і кореневої системи мікроклонів винограду найкращі результати було отримано на поживному середовищі такого складу (відносно сольового складу МС):  $\frac{1}{2}$  макросолей,  $\frac{1}{2}$  хелату заліза, агроперліт (у співвідношенні поживне середовище: агроперліт як 2:1), агар – 6 г/л. Через 30 діб культивування мікропагонів винограду на вказаному поживному середовищі їх приживлюваність знаходилась на рівні 100%. Через 60 діб культивування висота мікроклонів зменшувалась на 2,0–5,8 см, кількість листкових пластинок знаходилась в межах 5,8–7,3 шт. (при 8,5 шт. – у рослин контролю). Проте площа листкових пластинок достовірно перевищувала контрольні значення і збільшувалась на 8,34–18,11 см<sup>2</sup>.

Аналіз розвитку кореневої системи мікроклонів винограду засвідчив позитивний вплив представленого поживного середовища на формування, ріст та градацію коренів. У рослин утворювалося 14,0–15,0 шт. коренів I порядку з загальною довжиною 47,2–54,3 см та 23,5–31,5 шт. коренів II порядку з загальною довжиною 57,3–63,8 см. Коренева система характеризувалась накопиченням більшої кількості сухих речовин та зменшенням загального обводнення їхніх тканин. Усі вищенаведені переваги в розвитку мікроклонів винограду на вказаному поживному середовищі сприяли кращій їх підготовці до переведення в неконтрольовані умови *ex vitro*.

**Ключові слова:** виноград, *in vitro*, ініціальні експланти, мікроклони, поживне середовище, агроперліт, вермикуліт, сольовий склад, *in vivo*.

**Zelenyanskaya N.N., Teslyuk N.I., Gogulinskaya E.I., Podust N.V. Development of a structured nutrient medium for adaptation of vegetative mass and root system of grape microclones to *in vivo* conditions**

The article presents the results of research on the creation of a structured, salt-modified nutrient medium for grape cultivation *in vitro*, recommended for rooting initial explants of grapes in tissue and organ culture *in vitro* and their subsequent adaptation to *in vivo* conditions. The nutrient medium Murashige and Skuga (MS) was taken as a basis (according to the recipe). It is proved that the best results were obtained on the nutrient medium of the following composition (relative to the salt composition of MS) in terms of survival of explants, intensity of axillary bud proliferation, rhizogenesis, biometric indicators of vegetative mass development and root

*system of grape microclones: ½ macrosalt, ½ iron chelate, agroperlite (in the ratio of nutrient medium: agroperlite as 2: 1), agar – 6 g/l. After 30 days of cultivation of grape microshoots on the specified nutrient medium, their survival was at the level of 100%. After 60 days of cultivation, the height of the microclones decreased by 2.0–5.8 cm, the number of leaf blades was in the range of 5.8–7.3 pieces (at 8.5 pcs. – in control plants). However, the area of leaf blades significantly exceeded the control values and increased by 8.34–18.11 cm<sup>2</sup>.*

*Analysis of the development of the root system of grape microclones showed a positive effect of the presented nutrient medium on the formation, growth and gradation of roots. The plants formed 14.0–15.0 pcs. roots of the first order with a total length of 47.2–54.3 cm and 23.5–31.5 pcs. second-order roots with a total length of 57.3–63.8 cm. The root system was characterized by the accumulation of more dry matter and a decrease in the total watering of their tissues. All the above advantages in the development of grape microclones on the specified nutrient medium contributed to their better preparation for conversion to uncontrolled ex vitro conditions.*

**Key words:** grapes, in vitro, initial explants, microclones, nutrient medium, agroperlite, vermiculite, salt composition, in vivo.

**Постановка проблеми.** Сьогодні технологія мікроклонального розмноження рослин широко використовується в сільськогосподарській практиці для прискореного одержання цінних генотипів. Фінальним і необхідним кроком у цій технології є етап адаптації рослин до умов теплиці або поля (ex vitro). Саме на цьому етапі гине чи ушкоджується найбільша кількість рослин in vitro, і тому вдосконаленню цього етапу присвячено багато наукових праць [1, с. 29; 2, с. 24–26].

Для того щоб рослини in vitro успішно приживалися в нестерильних умовах ex vitro, вони повинні бути готові подолати стрес, якому піддаються в процесі адаптації. Насамперед це вплив водного стресу, який затримує ріст або викликає загибель рослин і є основною причиною низької приживлюваності рослин ex vitro. За деякими оцінками лише 25% регенерованих in vitro мікропагонів можна успішно пересадити в тепличні, і ще менше – у польові умови. Цьому є низка причин, які пов'язані з недосконалими анатомічними та фізіологічними характеристиками мікроклонів: недорозвинена воскова кутикула листка, пошкоджений продишовий апарат, слабка фотосинтетична активність, вітрифікація мікропагонів, слабкий судинний зв'язок між коренем і пагоном, недорозвинені або відсутні кореневі волоски, зневоднення і вплив патогенної інфекції [3, с. 299–304; 4, с. 152–159; 5, с. 29–35]. Ще одним важливим фактором, який створює проблеми під час переведення рослин з умов in vitro в умови ex vitro, є недостатньо функціонуюча коренева система, яка не в змозі поглинути необхідну кількість води і поживних речовин, щоб компенсувати їх втрати в процесі транспірації та забезпечити інтенсивний ріст рослин. Корені рослин, отриманих in vitro, не мають корневих волосків, часто розвиваються з калуса [3, с. 300–302].

Згідно з даними окремих наукових праць ріст і розвиток коренів рослин in vitro залежить від аерації поживного середовища, яка у свою чергу залежить від концентрації агару. Як наслідок – укорінення пагонів на твердому поживному середовищі ускладнюється, розвиток коренів другого порядку не відбувається. Зменшення концентрації агару суттєво покращує ці показники. Встановлено, що на поживних середовищах, які містять навіть невелику кількість агару, кореневі волоски не розвиваються, що свідчить про недостатню кількість кисню. Разом із тим можна спостерігати, що коли корені ростуть на поверхні поживних середовищ або в розколі середовища, то в них розвивається велика кількість корневих волосків. Не викликає сумніву той факт, що після висаджування мікроклональних рослин у нестерильні, неконтрольовані умови кращими показниками росту будуть відрізнятися генотипи, які мають добре облиств'яні пагони та розвинену кореневу систему [3, с. 300–302].

Тому на останньому етапі технології розмноження рослин *in vitro* необхідно створювати такі умови культивування, які забезпечать отримання мікроклональних рослин, здатних переносити стрес у процесі адаптації до змінних умов.

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** Загалом технологія розмноження винограду із застосуванням методів культури тканин і органів *in vitro* відома. Вона складається з етапів: відбір і стерилізація первинних експлантів, введення первинних експлантів у культуру *in vitro*, власне мікророзмноження, адаптація мікроклонів до умов *in vivo*, вирощування мікроклональних саджанців у шкільці. Для розмноження винограду *in vitro* так само дуже важливим і відповідальним є етап адаптації. На нашу думку, для успішного його перебігу дуже важливо ще на етапі укорінення мікроклонів винограду створювати такі умови, які би сприяли формуванню добре розвиненого приросту та розгалуженої кореневої системи з вагомою поглинальною здатністю. Цим питанням у різні часи займалися багато науковців. Так, було показано, що адаптацію мікроклонів винограду можна проводити в умовах *in vitro* та *in vivo*. У першому випадку мікроклони винограду можуть проходити адаптацію до умов *in vivo* в культуральних ємностях, в яких проводили їх укорінення. Але для цього необхідно через 35–40 діб культивування та протягом ще 15–20 діб поступово змінювати газообмін рослин *in vitro* (шляхом поетапного відкривання кришечок культуральних ємностей). Щоб досягти бажаного результату, а саме отримати високий вихід адаптованих мікроклонів, необхідно додатково вживати заходів щодо попередження ураження поверхні середовища грибовою інфекцією [6, с. 55–58]. І незважаючи на це рослини все ж таки проявляють ознаки в'янення вже через дві години після зняття покриття [7, с. 1705–1710; 8, с. 269; 9, с. 25–27].

R. Rohr, S. Mederos-Molina, V.A. Zlenko та ін. на етапі розвитку рослин в умовах *in vitro* рекомендують також замінювати покриття культуральних ємностей із фольги на целофанову плівку, яка забезпечує оптимальний газообмін. На думку авторів, щоб зменшити вологість повітря в пробірках, слід наносити тонкий шар стерильної ланолінової пасти, олії чи парафіну на поживне середовище для укорінення. Ця методика дозволяє знизити вологість повітря до 70%. Але при цьому дослідні рослини відрізняються слабким розвитком та, відповідно, низьким потенціалом адаптації [8, с. 265–270; 10, с. 66; 11, с. 126].

За даними В.О. Висоцького, Т.А. Медведєвої, R.E. Harris можна зменшити втрати води за пересаджування рослин в умови *in vivo* завдяки застосуванню анти-транспірантів, зміні концентрації та типу ауксинів, агару [3; 9; 12]. Інші автори, навпаки, показали, що якщо мікропагони вдається укорінити без впливу ауксинів, то вони приживаються в нестерильних умовах краще [13, с. 295–300].

G.-J. De Klerk, G. Vanilas, M. Barlass, Coberan Gheorghe, B.O. Висоцький рекомендують процес укорінення мікроклонів поєднувати з процесом акліматизації. Укорінення *ex vitro* проводять на субстраті, зволоженому розчином ауксину протягом індукційної фази, а між верхівковою і базальною частинами пагона підтримують необхідний градієнт температури [12; 14–17].

У ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» процес переведення рослин в умови *in vivo* проводили шляхом поєднання мікрочубукування, вирощування й адаптації мікроклонів на суміші іонітних субстратів – Біона і цеоліт у різних співвідношеннях. Це дозволило підвищити приживлюваність мікроклонів винограду до 93–96% і збільшити загальний об'єм вирощування саджанців. Проте іонообмінний субстрат Біона виготовляли в Інституті біоорганічної хімії Національної академії наук Білорусі, й тому її постачання сьогодні викликає неабиякі труднощі [18; 19].

Таким чином, аналізуючи відомості з питання адаптації мікроклонів винограду, доходимо висновку, що окремі прийоми адаптації розроблені та застосовуються на практиці. Але успішне впровадження більшості з них нагепер обмежується низкою економічних (придбання дорогавартісних кліматичних камер, матеріалів) і технологічних (відсутність доступних матеріалів, препаратів, реактивів на ринку України) питань. З ряду питань єдина думка вчених відсутня, а результати досліджень носять суперечливий та дискусійний характер.

**Постановка завдання.** Мета статті – на основі модифікації структури та мінерального складу розробити поживне середовище для успішного укорінення, культивування мікропагонів винограду *in vitro* та подальшої їх акліматизації до умов *in vivo*. Оцінити його вплив на формування, ріст і розвиток вегетативної маси та кореневої системи мікроклонів винограду.

**Матеріали і методи досліджень.** Дослідження проводили протягом 2010–2015, 2018 рр. у відділі розсадництва і розмноження винограду ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова». Об'єктом досліджень були ініціальні експланти та мікроклони винограду сортів Берландієрі х Ріпарія Кречунел 2 (Б.хР. Кречунел 2), Гарант, Кишмиш таїровський.

Усі роботи, пов'язані з розмноженням винограду *in vitro*, здійснювали в асептичних умовах ламінарних та культуральних боксів, обладнаних пілозахисними камерами й ультрафіолетовими опромінювачами. Культивування винограду *in vitro* проводили за загальноприйнятою в ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» технологією в культуральних боксах за температури 24–25°С, 16-годинного фотоперіоду, освітлення 2500–3000 лк., вологості повітря 60–70%.

Роботу проводили у два етапи. На першому етапі створювали структуровані поживні середовища та визначали оптимальний вміст агару для них, на другому – визначали вплив різного сольового складу структурованого поживного середовища на показники росту та розвитку мікроклонів винограду.

Для створення структурованого поживного середовища за основу брали поживне середовище Мурасіге і Скуга (далі – МС), в яке додавали мінеральні субстрати – агроперліт і вермикуліт. Для цього в культуральні ємності вносили 25 мл поживного середовища МС та додавали мінеральні субстрати за умови, що співвідношення поживне середовище : мінеральні субстрати дорівнювало 2:1. Поєднання мінеральних субстратів з агаровим середовищем дозволяє зменшити вміст агару та покращити його аерацію. Після автоклавування й застигання середовищ у культуральних ємностях утворювалось двошарове середовище: для перліту: верхній шар – перліт, просякнений середовищем, нижній – агарове середовище з краплями перліту; для вермикуліту: верхній шар – поживне середовище, нижній – вермикуліт.

І. Схема досліджень з визначення оптимальної консистенції структурованого поживного середовища:

- Варіант 1 – МС + 4,0 г/л агару + агроперліт;
- Варіант 2 – МС + 4,0 г/л агару + вермикуліт;
- Варіант 3 – МС + 5,0 г/л агару + агроперліт;
- Варіант 4 – МС + 5,0 г/л агару + вермикуліт;
- Варіант 5 – МС + 6,0 г/л агару + агроперліт;
- Варіант 6 – МС + 6,0 г/л агару + вермикуліт;
- Варіант 7 – МС + 7,0 г/л агару + агроперліт;
- Варіант 8 – МС + 7,0 г/л агару + вермикуліт;
- Варіант 9 – МС + 7,5 г/л агару + агроперліт;

Варіант 10 – МС + 7,5 г/л агару + вермикуліт;

Варіант 11 – МС стандартне (контроль).

II. Схема досліджень з визначення оптимального сольового складу структурованого поживного середовища:

Варіант 1 – МС +  $\frac{1}{2}$  макросолей + агроперліт;

Варіант 2 – МС +  $\frac{1}{2}$  макросолей + вермикуліт;

Варіант 3 – МС +  $\frac{1}{2}$  хелат заліза + агроперліт;

Варіант 4 – МС +  $\frac{1}{2}$  хелат заліза + вермикуліт;

Варіант 5 – МС +  $\frac{1}{2}$  макросолей +  $\frac{1}{2}$  хелат заліза + агроперліт;

Варіант 6 – МС +  $\frac{1}{2}$  макросолей +  $\frac{1}{2}$  хелат заліза + вермикуліт;

Варіант 7 – МС стандартне (контроль).

Вміст агару в структурованому поживному середовищі за всіма дослідними варіантами дорівнював 6 г/л, вміст фітогормонів – 0,1 мг/л 6-БАП, 0,3 мг/л ІОК.

Через 30 діб після висаджування мікропагонів винограду на поживні середовища визначали їх кількість із проліферацією пазушної бруньки (шт.), розвиненими коренями (шт.) та приживлюваність (%). Показники росту і розвитку мікроклонів винограду оцінювали за висотою рослин (см); кількістю листків (шт.); площею листків (см<sup>2</sup>); масою вологого та сухого приросту (г); кількістю коренів I та II порядків (шт.); загальною довжиною коренів та довжиною одного кореня, в т. ч. за градаціями (см); масою вологих і сухих коренів (г). Біометричні показники розвитку визначали через 30 та 60 діб.

Статистичну обробку одержаних експериментальних даних проводили з застосуванням дисперсійного на 95% рівні вірогідності за методикою Б.О. Доспехова [20].

**Виклад основного матеріалу дослідження.** I. *Визначення впливу консистенції структурованого поживного середовища на формування біометричних показників мікроклонів винограду.* Одержані експериментальні результати показали, що приживлюваність мікрочубків винограду сорту Б.хР. Кречунел 2 через 30 діб після висаджування на середовище без мінералів і вмістом агару 7 г/л (контроль) становила 90,0%, тоді як на двошарових поживних середовищах із вмістом агару 4 та 5 г/л + агроперліт цей показник дорівнював 62,0 та 82,0%, а після додавання до поживного середовища вермикуліту він зменшувався на 15,0–17,0% (рис. 1). Візуальні спостереження засвідчили: збільшення вибракуваних рослин було пов'язане з тим, що поживне середовище з вмістом агару 4,0–5,0 г/л було не досить щільним, і складались сприятливі умови для розвитку бактерій. У варіантах із кількістю агару в середовищі 6,0–7,0 г/л приживлюваність експлантів була на рівні контролю – 90,0% на поживному середовищі з агроперлітом та 65,0–69,0% – з вермикулітом [21]. Поживне середовище з вмістом агару 7,5 г/л було дуже щільним, що ускладнювало висаджування мікрочубків і супроводжувалося зменшенням приживлюваності до 84,0% (агроперліт) і 60,0 (вермикуліт). Аналогічну закономірність щодо приживлюваності мікрочубків було відмічено і для сорту Кишмиш таїровський.

Через два місяці культивування мікроклонів винограду сортів Б.хР. Кречунел 2, Кишмиш таїровський визначали їхні біометричні показники росту та розвитку. У контрольному варіанті рослини добре розвивались, висота стебла дорівнювала 12,5 (Б.хР. Кречунел 2) та 10,8 см (Кишмиш таїровський), кількість листків дорівнювала 7,5 і 7,0 шт., а кількість коренів із середньою довжиною 17,0 і 13,0 см – 6,0 – 10,0 шт. (Табл. 1). На двошарових поживних середовищах МС із вмістом агару 4–5 г/л висота мікроклонів обох сортів була у межах 10,0–15,3 см

(агроперліт) та 5,2–7,0 см (вермикуліт), кількість листових пластинок дорівнювала 8,0–14,6 шт. (агроперліт) та 4,0–6,5 шт. (вермикуліт). Кількість коренів була меншою, ніж у контролі, і становила 4,0–6,0 шт. на середовищах з агроперлітом та 2,5–3,0 шт. на середовищах із вермикулітом, але через низький відсоток приживлюваності кількість життєздатних рослин була меншою.

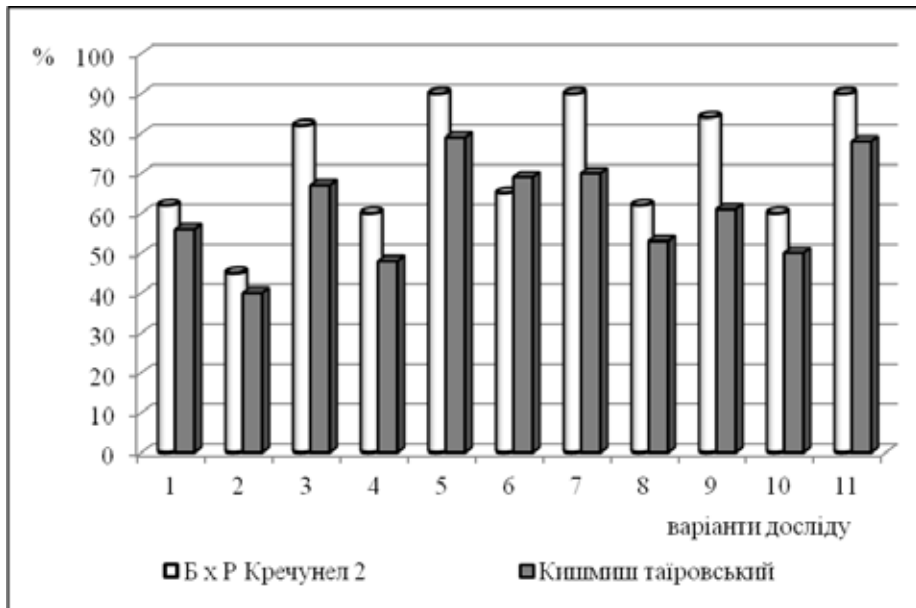


Рис. 1. Приживлюваність мікрочубуків винограду на двошарових поживних середовищах із різним вмістом агару (середнє за 2010–2012, 2018 рр.)

Більш оптимальними для росту і розвитку рослин були поживні середовища з мінеральними субстратами та вмістом агару 6–7 г/л. Порівняно з контролем висота рослин на середовищі з агроперлітом зменшувалась у середньому на 12,8–19,2% (Б.х.Р. Кречунел 2) і на 24,0–25,9% (Кишмиш таїровський); кількість сформованих листків, навпаки, збільшувалась на 5,8–40,0% (Б.х.Р. Кречунел 2) або була на рівні контролю в мікроклонів сорту Кишмиш таїровський, що свідчить про кращу облистяність рослин. На середовищі з вермикулітом висота рослин зменшувалась на 37,6–40,0% (Б.х.Р. Кречунел 2) та 44,0–49,0% (Кишмиш таїровський) відповідно, а кількість листків – на 30%.

У рослин на поживному середовищі з агроперлітом та вмістом агару 6–7 г/л активніше формувалися та розвивалися корені. У мікроклонів Б.х.Р. Кречунел 2 їх кількість дорівнювала 12,5 та 15,3 шт., довжина порівняно з контролем зменшувалася на 7–8 см або на 25,0–53,0%. У мікроклонів сорту Кишмиш таїровський кількість коренів дорівнювала 7,5 і 9,5 шт., їхня довжина зменшувалась по відношенню до контролю на 8,0–9,6 см або на 10,7–23,0%.

Після додавання до поживного середовища вермикуліту кількість коренів була майже на половину меншою, як у порівнянні з контролем, так і з варіантами середовищ з агроперлітом, при цьому їхня середня довжина збільшувалась або знаходилась на рівні контролю.

Визначення вологості та сухої маси приросту та коренів свідчить про накопичення більшої кількості сухих речовин у мікроклонів на двошарових поживних середовищах з агроперлітом та вмістом агару 6 і 7 г/л (табл. 1). Загальне обводнення приросту мікроклонів сорту Б.хР. Кречунел 2 дорівнювало 85,4–86,2%, коренів – 88,0–88,1%, у контролі ці показники відповідали 89,0 і 92,0%. Загальне обводнення приросту мікроклонів винограду сорту Кишмиш таїровський дорівнювало 83,7–84,5%, коренів – 87,8–89,0%, у контролі ці показники відповідали 90,0 і 92,8%.

Таблиця 1

**Біометричні показники розвитку мікроклонів винограду  
на двошарових поживних середовищах із різним вмістом агару  
(середнє за 2010–2012, 2018 рр.)**

Варіанти дослідів	Висота рослин, см	Кількість листків, шт.	Маса вологого приросту, г	Маса сухого приросту, г	Кількість коренів, шт.	Довжина кореня, см	Маса вологих коренів, г	Маса сухих коренів, г
Б.хР. Кречунел 2								
1	12,1*	11,4	0,8413*	0,1052*	5,9*	9,9	0,1414*	0,0111*
2	6,3	6,1*	0,4521*	0,0590*	2,6*	12,6	0,0914*	0,0084*
3	15,4*	14,6	0,9535	0,1279	6,0*	17,9	0,4823	0,0440
4	7,2	6,6*	0,5025*	0,0705*	2,6*	18,6	0,3255*	0,0326*
5	10,8	9,2	0,8833	0,1220	12,5	9,1	0,4706	0,0560
6	7,6	5,1*	0,4420*	0,0620*	6,6*	15,5	0,3736*	0,0467
7	10,2	9,3	0,9044	0,1323	15,3	10,6	0,5052	0,0608
8	7,9	6,8*	0,5720*	0,0859*	5,2*	13,2	0,3415*	0,0438
9	8,6	7,3*	0,5110*	0,0804*	9,0*	8,2	0,3795*	0,0531
10	5,2	4,9*	0,3013*	0,0476*	6,1*	9,2	0,2900*	0,0406*
11	12,5	7,5	0,8094	0,0903	10,1	17,2	0,4230	0,0340
НІР <sub>05</sub>	0,5	0,6	0,08	0,03	0,5	0,9	0,04	0,01
Кишмиш таїровський								
1	10,4	8,3	0,7017*	0,0912*	4,2*	10,1	0,1140*	0,0081*
2	5,3	4,1*	0,3878*	0,0516*	2,5*	12,1	0,0858*	0,0070*
3	13,1*	10,0	0,8432	0,1146	5,2*	12,8*	0,3914	0,0307*
4	6,5	4,2*	0,4015*	0,0559*	3,1*	13,5*	0,2801*	0,0242*
5	8,1	7,0*	0,7033	0,1090	9,5	10,2	0,4093	0,0452
6	6,2	4,6*	0,3256*	0,0523*	5,2*	13,1*	0,3219*	0,0376
7	8,2	7,1*	0,7855	0,1252	7,5	11,6	0,3990	0,0464
8	5,5	3,8*	0,4414*	0,0742*	4,5*	14,1*	0,2300*	0,0388
9	7,2	6,0*	0,4914*	0,0837*	5,5*	10,0*	0,3085*	0,0418
10	4,3	3,2*	0,2799*	0,0475*	5,2*	11,1*	0,2520*	0,0347*
11	10,8	7,0	0,6712	0,0670	6,0	13,0	0,3615	0,0260
НІР <sub>05</sub>	0,4	0,5	0,04	0,03	0,4	0,8	0,03	0,01

Примітка: дані вірогідні по відношенню до контролю ( $P < 0,05$ ), крім позначених \*

У варіантах, де вміст агару в поживному середовищі дорівнював 7,5 г/л, відмічали гірший розвиток мікроклонів, що проявлялося в меншій висоті стебла (7,0–8,4 см), кількості листків (6,0–7,2 шт.) та коренів (5,5–9,0 шт.).

Отже, для забезпечення оптимальних умов розвитку вегетативної маси і кореневої системи в передадаптаційний період доцільним є висаджування мікрочубуків винограду на двошарове поживне середовище, переважно з агроперлітом, яке містить 6–7 г/л агару. На таких поживних середовищах після 60 діб культивування мікроклони мали добре розвинену кореневу систему, облиств'яний пагін з високим умістом сухих речовин.

*II. Визначення впливу різного сольового складу структурованого поживного середовища на формування біометричних показників мікроклонів винограду.* Оскільки нами раніше було встановлено [22, с. 64–66], що для успішного укорінення мікроклонів винограду з одночасним активним ростом і розвитком рослин можна використовувати поживне середовище Мурасіге і Скуга з половинним умістом макросолей, хелату заліза та двошарове поживне середовище з агроперлітом чи вермикулітом, то наступним етапом стало проведення досліджень з культивування мікроклонів винограду в передадаптаційний період на комплексному поживному середовищі МС, до складу якого входили: 0,1 мг/л 6-БАП, 0,3 мг/л ІОК,  $\frac{1}{2}$  макросолей,  $\frac{1}{2}$  хелату заліза, 6 г/л агару, агроперліт чи вермикуліт. Дослідження проводили на мікрочубуках і мікроклонах підщепного сорту винограду Гарант.

Отримані результати показали, що через 30 діб після висаджування одновічкових мікрочубуків на модифіковане двошарове поживне середовище МС у контролі та на поживних середовищах із  $\frac{1}{2}$  макросолей і мінеральними субстратами та  $\frac{1}{2}$  хелату заліза і агроперлітом приживлюваність мікрочубуків була 100%. В інших дослідних варіантах вона зменшувалась на 10,0–20,0%. У контролі за вказаний період культивування проліферацію пазушної бруньки відмічали лише у 28,0% експлантів, а ризогенез – у 82,0%. У варіантах, де експланти культивували на поживних середовищах із мінеральними субстратами, кількість експлантів із проліферацією, навпаки, була більшою, а кількість експлантів, для яких були характерні ознаки ризогенезу, – меншою. Так, у варіантах середовищ, що містили  $\frac{1}{2}$  макросолей та агроперліт, проліферація була характерна для 50,0% експлантів, а ризогенез – для 70,0%, у варіантах середовищ, що містили  $\frac{1}{2}$  макросолей та вермикуліт, ці показники дорівнювали 60,0 та 62,0%. У варіантах середовищ, що містили  $\frac{1}{2}$  хелату заліза та агроперліт і вермикуліт, проліферація була характерна для 50,0% експлантів, але за інтенсивністю ризогенезу мікрочубуки суттєво відрізнялися – агроперліт у складі поживного середовища сприяв утворенню коренів у 70,0% експлантів, вермикуліт – тільки у 24,0%.

Через 60 діб культивування провели обліки розвитку вегетативної маси і кореневої системи, оскільки останні є важливими показниками підготовки мікроклонів винограду до адаптації в неконтрольованих умовах. На основі біометричних показників росту і розвитку вегетативної маси мікроклонів можна відмітити таке. Порівняно з контролем, у варіантах з  $\frac{1}{2}$  макросолей та  $\frac{1}{2}$  макросолей +  $\frac{1}{2}$  хелату заліза висота рослин зменшувалась на 2,0–5,8 см (середовище з агроперлітом) і 5,0–5,6 см (середовище з вермикулітом), у варіантах з  $\frac{1}{2}$  хелату заліза цей показник був або ж на рівні контролю (середовище з вермикулітом), або суттєво його перевищував (середовище з агроперлітом) (табл. 2). Мікроклони дослідних варіантів, за виключенням третього та четвертого, мали меншу кількість листків, яка знаходилася в межах 5,8–7,3 шт. за 8,5 шт. у рослин контролю та 8,0–9,0 шт. у рослин третього і четвертого варіантів. Проте площа листових пластинок



у рослин усіх дослідних варіантів достовірно перевищувала контрольні значення. У рослин, які культивували на поживних середовищах з половинним вмістом макросолей, вона збільшувалася на 8,51–10,37 см<sup>2</sup>, у рослин, які культивували на поживних середовищах з половинним вмістом макросолей та хелату заліза, – на 8,34–8,92 см<sup>2</sup>, у рослин, які культивували на поживних середовищах, що містили повний комплекс макроелементів і ½ хелату заліза, площа листків була більшою за контрольні значення на 8,34–18,11 см<sup>2</sup>.

Таблиця 2

**Показники розвитку вегетативної маси мікроклонів винограду сорту Гарант після культивування на комплексному поживному середовищі (середнє за 2012–2015, 2018 рр.)**

Варіанти дослідів	Висота рослин, см	Кількість листків, шт.	Площа листків, см <sup>2</sup>	Маса вологого приросту, г	Маса сухого приросту, г	Вміст сухих речовин, %	Вміст води, %
1	10,4	7,3	27,42	0,6610	0,1034	15,6	84,5
2	6,8	5,8	25,57	0,3782*	0,0550	14,3	85,7
3	14,2*	9,1*	35,16	0,6496	0,0998	15,2	84,8
4	11,9	8,2*	25,39	0,4285*	0,0654	13,7	86,3
5	7,5	6,1	25,97	0,4070*	0,0619	15,7	85,3
6	6,7	5,9	25,08	0,4474*	0,0755	13,3	86,7
7	12,4	8,5	17,05	0,4487	0,0437	9,9	90,1
НІР05	1,05	0,96	1,04	0,0189	0,0030	0,85	0,85

*Примітка: дані вірогідні по відношенню до контролю (P<0,05), крім позначених \**

Для підготовки мікроклонів винограду до переведення в нестерильні умови важливе значення має структура тканин як вегетативної маси, так і кореневої системи, останню прийнято оцінювати по накопиченню сухої речовини або загального обводнення тканин. Визначення маси вологого і сухого приросту з подальшим визначенням вмісту сухих речовин показало, що найбільше їх синтезувалося в пагонах та листках мікроклонів, які культивували на поживних середовищах з агроперлітом – 15,2–15,7%, дещо менше – 13,3–14,3% – на поживних середовищах з вермикулітом і найменше – у контрольних рослин – 9,9%. В аналогічній залежності був і показник загального обводнення тканин (табл. 2).

Проведення аналізу розвитку кореневої системи мікроклонів винограду, які протягом 60 діб культивували на поживних середовищах з різним мінеральним складом, показало, що вони суттєво впливали на біометричні та якісні показники розвитку і кореневої системи (табл. 3). Так, можна стверджувати про позитивний вплив поживного середовища з агроперлітом та ½ макросолей (перший варіант) і ½ макросолей + ½ хелат заліза (п'ятий варіант) на формування кореневої системи. Такі поживні середовища забезпечували утворення 14,0–15,0 шт. коренів I порядку із загальною їхньою довжиною до 47,2–54,3 см, при цьому довжина одного кореня I порядку дорівнювала 3,3–3,6 см. У мікроклонів винограду на поживних середовищах аналогічного сольового та мінерального складу з додаванням вермикуліту утворювалося менше коренів I порядку, в середньому 1,4–5,5 шт., що менше, ніж у контрольних рослин, на 15,3–78,4%. Їхня загальна довжина та довжина одного кореня I порядку також достовірно від контролю не відрізнялись.

Таблиця 3

**Вплив комплексного поживного середовища на біометричні показники розвитку кореневої системи мікроклонів винограду сорту Гарант (середнє за 2012–2015, 2018 рр.)**

Варіанти дослідів	Кількість коренів I порядку, шт.	Довжина коренів I порядку, см	Довжина одного кореня I порядку, см	Кількість коренів II порядку, шт.	Довжина коренів II порядку, см	Довжина одного кореня II порядку, см
1	15,0	54,4	3,7*	31,6	57,3	1,9*
2	5,4*	32,7*	6,3*	20,4	34,3*	1,2*
3	8,3	57,5	6,9*	25,8*	63,8	2,5
4	3,4*	34,8*	4,9*	8,4*	14,8*	1,9*
5	14,3	47,1*	3,4*	23,5*	46,4*	2,1
6	1,3*	46,5*	3,2	17,0*	46,1*	2,8
7	6,5	46,2	6,8	20,9	47,7	1,8
НІР <sub>05</sub>	0,91	2,19	0,96	2,45	2,25	0,24

*Примітка: дані вірогідні по відношенню до контролю ( $P < 0,05$ ), крім позначених \**

Багато досліджень вітчизняних і зарубіжних учених указують на те, що коренева система більшості мікроклональних рослин не розгалужена, надалі це негативно впливає на їхню приживлюваність в умовах *ex vitro*. Дані, отримані в наших дослідженнях, показують, що інтенсивне утворення коренів II порядку було характерне для мікроклонів у першому, третьому та п'ятому варіантах, в яких поживне середовище містило  $\frac{1}{2}$  макросолей, хелату заліза та агроперліт. На таких середовищах у рослин утворювалося по 23,5–31,5 шт. коренів II порядку із загальною довжиною 57,3–63,8 см (перший і третій варіанти), у п'ятому варіанті цей показник достовірно від контролю не відрізнявся. У контрольних мікроклонів було по 6,5 шт. коренів I порядку довжиною 46,0 см та 20,9 шт. коренів II порядку довжиною 47,7 см.

Половинний вміст макросолей у складі МС та додавання до нього агроперліту супроводжувалося накопиченням у коренях більшої кількості сухих речовин та зменшенням загального обводнення їхніх тканин (табл. 4). У коренях рослин цих варіантів було 10,1–11,9% сухих речовин, загальне обводнення тканин дорівнювало 88,0–89,8%. На повному ростовому середовищі МС (контроль) ці показники дорівнювали 6,7 і 93,3% відповідно. Це пояснюється тим, що агар підвищував дифузю вуглеводів, елементів живлення та регуляторів росту з поживного середовища, а перліт створював сприятливі умови для розвитку кореневої системи.

**Висновки і пропозиції.** Нами вперше створено структуроване двошарове поживне середовище шляхом додавання до поживного середовища Мурасіге і Скуга природних мінералів агроперліту і вермикуліту. За показниками приживлюваності експлантів, інтенсивності проліферації пазушних бруньок, ризогенезу та подальшого розвитку мікроклонів найбільш придатним для практичного застосування було поживне середовище, виготовлене на основі агроперліту в співвід-

ношенні поживне середовище: агроперліт як 2:1 і кількістю агару 6 г/л. Модифікація двошарового поживного середовища з агроперлітом у напрямі зменшення наполовину вмісту макроsoleй, хелату заліза основного складу середовища сприяла кращому розвитку мікроклонів винограду як в умовах *in vitro*, так і їх переведенню в неконтрольовані умови *ex vitro*.

Таблиця 4

**Показники розвитку кореневої системи мікроклонів винограду сорту Гарант після культивування на комплексному поживному середовищі (середнє за 2012–2015, 2018 рр.)**

Варіанти досліджу	Маса вологих коренів, г	Маса сухих коренів, г	Вміст сухих речовин, %	Вміст води, %
1	0,5919	0,0569	11,91	88,10
2	0,1768*	0,0188*	10,20	89,85
3	0,6946	0,0596	9,45	90,55
4	0,1728*	0,0207*	9,19	90,85
5	0,7999*	0,0598	8,95	91,79
6	0,1620*	0,0221*	9,40	90,62
7	0,4824	0,0296	6,72	93,31
НР <sub>05</sub>	0,0298	0,0060	1,24	1,51

*Примітка: дані вірогідні по відношенню до контролю ( $P < 0,05$ ), крім позначених \**

Щодо пропозицій подальшої роботи в даному напрямі, то доцільно вивчити вплив структурованих, модифікованих поживних середовищ на основні фізіолого-біохімічні показники листків мікроклонів винограду – інтенсивність транспірації, вміст загальної та легкоутримуючої води, листкових пігментів. Це дозволить науково обґрунтувати стан мікроклонів винограду за різних умов культивування та визначити основні фактори, які підвищують їхній адаптаційний потенціал у змінних умовах.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Дорошенко Н.П., Семенова Л.Н. Адаптація оздоровлених пробірочних рослин винограда к нестерильным условиям. *Перспективы внедрения современных биотехнологических разработок для повышения эффективности сельскохозяйственного производства* : Мат. регион. научн.-практ. конф. Ставрополь, 2000. С. 29.
2. Ребров А.Н. Адаптація рослин винограда *in vitro* к условиям нестерильной среды : автореф. дисс. ... канд. биол. наук : 06.01.07. Новочеркасск, 2007. 27 с.
3. Медведсва Т.В. Проблеми акліматизації культивованих *in vitro* рослин. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2008. Т. 40. № 4. С. 299–308.
4. Carvalho L., Amancio S. The effect of *ex vitro* conditions on growth and acquisition of autotrophic behavior during the acclimatization of chestnut regenerated *in vitro*. *Scientia Horticulturae*. 2002. V. 95. P. 151–164.
5. Pospisilova J. Haisel D., Synková H. Acclimation of plantlets to *ex vitro* conditions: effects of air humidity, irradiance, CO<sub>2</sub> concentration and abscisic acid. *Acta Horticulturae*. 2007. V. 748. P. 29–38.
6. Батукаев А.А. Совершенствование технологии ускоренного размножения винограда методом *in vitro* и применение регуляторов роста в условиях *in vitro* и *in vivo* : автореф. дисс. ... докт. с.-х. наук : 06.01.08. Новочеркасск, 1999. 63 с.

7. Hazarika B.N. Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science*. 2003. V. 85 (12). P. 1704–1712.
8. Mederos-Molina S. Culture medium requirements for micropropagation of *Vitis vinifera* L. cv. Listan Blanco. *Acta Horticulturae*. 2007. V. 754 (1). P. 265–271.
9. Harris R.E., Stevenson J.H. In vitro propagation of *Vitis*. *Vitis*. 1982. V. (21). P. 22–32.
10. Rohr R., Iliev I., Scaltsoyiannes A. Acclimatization of micropropagated forest trees. *Acta Horticulturae*. 2003. № 61. P. 59–69.
11. Zlenko V.A., Troshin L.P., Kotikov I.V. An optimized medium for clonal micropropagation of grapevine. *Vitis*. 1995. V. 34 (2). P. 125–126.
12. Высоцкий В.А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала и селекции плодовых и ягодных растений : дисс. ... доктора с.-х. наук : 06.01.07, 03.00.12. Москва, 1998. 321 с.
13. Galzy R., Haffner V., Compan D. Influence of three factors on the growth and nutrition of grapevine microcuttings. *Journal of Experimental Botany*. 1990. V. 41. P. 295–301.
14. De Klerk G-J. Rooting of microcuttings: Theory and practice. *In vitro Cellular & Development Biology – Plant*. 2002. V. 38. P. 415–422.
15. Banilas G., Korkas E. Rapid micropropagation of grapevine CV: Agiorgitiko through lateral bud development. *Journal of Science & Technology*. 2007. V. 3. P. 31–38.
16. Barlass M, Skene K.G.M. In vitro propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices. *Vitis*. 1978. V. 17. P. 335–340.
17. Coberan G. New technologies for producing grapevine planting material, in Tarnave Vineyard. *Sumaru of PhD Thesis: University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca*. 2011. P. 65–70.
18. Черевата Т.М. Розробка і оптимізація прийомів клонального мікророзмноження для виробництва садивного матеріалу винограду : автореф. дис. ... канд. с.-г. наук : 06.01.08. Одеса, 2006. 22 с.
19. Теслюк Н.І. Удосконалення методів культури in vitro для селекції та розмноження винограду: автореф. дис. ... канд. с.-г. наук : 06.01.08. Одеса, 2009. 20 с.
20. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). 5-е изд., доп. и перераб. Москва : Агропромиздат, 1985. 351 с.
21. Спосіб введення, культивування та розмноження винограду in vitro : пат. 85875 Україна : МПКА01G17/00, № u201304207 ; заявл. 08.04.2013 ; опубл. 10.12.13, Бюл. № 23.
22. Зеленянська Н.М., Подуст Н.В., Гогоулінська О.І. Двошарове поживне середовище для культивування винограду in vitro. *Влияние научных исследований* : зб. науч. докл., Быдгощ, 28 – 30 апреля, 2013 г. Быдгощ, 2013. Ч. 2. С. 63–68.