

УДК 634.8:631.532:631.544

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АППАРАТА
МНОГОКРИТЕРИАЛЬНОЙ
ОПТИМИЗАЦИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ
ПРОЦЕССОВ ИНДУКЦИИ
МНОЖЕСТВЕННЫХ ПОБЕГОВ
ВИНОГРАДА В КУЛЬТУРЕ
IN VITRO**

Теслюк Наталия Ивановна
канд. с.-х. наук
ст. научный сотрудник отдела
питомниководства и размножения
винограда

*Национальный научный центр
«Институт Виноградарства
и виноделия имени В.Е. Таирова»,
Одесса, Украина*

Кичмаренко Ольга Дмитриевна
канд. физ.-мат., наук, доцент
зав. кафедрой оптимального управления и
экономической кибернетики

*Одесский национальный
университет им. И.И. Мечникова,
Одесса, Украина*

Одним из способов повышения эффективности размножения виноградных растений in vitro является метод индукции множественных побегов на различных типах питательных сред. Этим методом можно значительно повысить коэффициент размножения растений и, следовательно, добиться увеличения производства посадочного материала, свободного от вирусной и бактериальной инфекции. Целью нашего исследования было выявление оптимальной питательной среды для индукции множественных побегов виноградных растений in vitro при помощи применения математического аппарата многокритериальной оптимизации. Исследования проводили в лаборатории культуры тканей Института виноградарства и виноделия им. В.Е. Таирова на сортах винограда

UDC 634.8:631.532:631.544

**THE USE OF METHOD
OF MULTICRITERIAN
OPTIMIZATION FOR EVALUATION
OF INDUCTION PROCESS
FOR THE GREAT NUMBER
OF GRAPEVINE SHOOTS
IN VITRO**

Teslyuk Natalia
Cand. Agr. Sci.
Senior Research Associate
of the Department of Nursery
and Grapes propagation

*National Scientific Centre
«Institute of Viticulture and Winemaking
named after V.YE. Tairov»,
Odessa, Ukraine*

Kichmarensko Ol'ga
Cand. Phys.-math. Sci., Docent
Head of Department of Variation calculus
and Optimal control

*Odessa National University
named after I.I. Mechnikov
Odessa, Ukraine*

One way to improve the efficiency of grapes plants breeding in vitro is the method of induction of multiple shoots on various types of cultural medium. Applying this method, we can significantly increase in the multiplication factor of plants and, therefore, to achieve the increase in the production of planting material free from viral and bacterial infection. The aim of our study was to determine the optimal culture medium for the induction of multiple grapes shoots in vitro by applying the mathematical apparatus of multi-criterial optimization. Study was carried out in the laboratory of tissue culture V.E. Tairov «Institute of Viticulture and Winemaking» on grapes varieties of Mechta, Kobzar, Original.

Мечта, Кобзарь, Оригинал. С целью оптимизации состава питательной среды для образования множественных побегов испытывали различные варианты сред. Для повышения эффективности индукции множественных побегов винограда в культуре *in vitro* исследовано и доказано преимущество использования полужидких сред по сравнению с твердыми и жидкими питательными средами. С использованием методов многокритериальной оптимизации определена и подтверждена оптимальная питательная среда, а именно: полужидкая модифицированная среда МС, которая способствовала лучшей приживаемости, дифференциации, регенерации и продуктивности меристем виноградных растений. Показано, что внедрение усовершенствованного метода индукции множественных побегов способствовало повышению коэффициента размножения винограда в культуре *in vitro* до 1:9,5, а также снижало себестоимость микроклонов винограда на начальных этапах клонального микроразмножения на 90 %.

Ключевые слова: ВИНОГРАД, КУЛЬТУРА IN VITRO, ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ, МЕТОД МНОГОКРИТЕРИАЛЬНОЙ ОПТИМИЗАЦИИ, МНОЖЕСТВЕННЫЕ ПОБЕГИ

In order to optimize the composition of the nutrient medium for the formation of multiple shoots we tested the various medium options. To improve the efficiency of induction of multiple shoots of grapes plants in the culture *in vitro* was studied and proved the advantage of using semi-liquid medium in comparison with solid and liquid medium. When using the multi-criterion optimization methods it is determined the optimal nutrient medium, namely a modified semi-solid MS medium, which contributed to a better survival, differentiation, regeneration and productivity of meristems of grapes plants. It is shown that the introduction of an improved method of induction of multiple shoots helped to increase in the multiplication factor of grapes *in vitro* culture to 1: 9.5, and this method reduced the cost of micro clones of grapes in the early stages of micropropagation by 90%.

Key words: GRAPEVINE, CULTURE IN VITRO, NUTRIENT MEDIUM, METHOD OF MULTICRITERIAN OPTIMIZATION, GREAT NUMBER OF SHOOTS

Введение. Одним из способов повышения эффективности размножения растений винограда *in vitro* является метод индукции множественных побегов на различных типах питательных сред. Использование метода индукции множественных побегов из апикальных меристем винограда имеет целый ряд преимуществ перед размножением одноглазковыми микрочеренками [1]. Применение указанного метода может значительно повысить коэффициент размножения и, следовательно, добиться увеличения производства посадочного материала винограда, свободного от вирусной и бактериальной инфекции.

Многие авторы отмечают, что этот метод имеет минимальную степень риска в отношении получения неоднородного потомства [2, 3, 4]. При этом частота получения мутантных растений (в расчете на число новообразований) не превышает частоту появления таковых при обычном размножении. Сегодня актуальным становится вопрос оптимизации процесса индукции множественных побегов винограда *in vitro*. Но, несмотря на результативность метода, работ по индукции множественных побегов винограда все же очень мало, многие вопросы требуют доработки.

Целью нашего исследования было выявление оптимальной питательной среды для индукции множественных побегов *in vitro* при помощи применения математического аппарата многокритериальной оптимизации.

Как правило, развитие множественных побегов винограда *in vitro* индуцировали на твердых или жидких питательных средах. В данном исследовании было изучено влияние концентрации агара в среде, ее консистенции на индукцию множественных побегов винограда и были использованы полужидкие среды (4 г/л агара).

Объекты и методы исследований. Исследования проводили в лаборатории культуры тканей ИВиВ им. В.Е. Таирова на сортах винограда Мечта, Кобзарь, Оригинал. Исходный материал отбирали с кустов, произрастающих на клоно-испытательном участке и прошедших тестирование на отсутствие вирусной и бактериальной инфекции. Из заготовленной в ноябре-декабре лозы производили выгонку зеленых побегов, с которых отбирали меристематические верхушки и стерилизовали по принятой в лаборатории культуры тканей методике [1, 5].

В своей работе мы использовали меристемные верхушки с листовыми зачатками размером 1,5-2,5 мм, что в дальнейшем дало хорошее увеличение экспланта и развитие множественных побегов. Меристемные верхушки вычленили под бинокулярной лупой в ламинарном боксе в стерильных условиях.

С целью оптимизации состава питательной среды для образования множественных побегов испытывали различные варианты сред: Мурасиге и Скуга; МС модифицированной нами в плане количественного и качественного состава витаминов, сахарозы и фитогормонов [1,5]; Нича и Нич; Гамборга. В среды добавляли 0,1 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП), 25 г/л сахарозы. Перечисленные среды готовили жидкие (без содержания агара), полужидкие (4 г/л агара) и твердые (8 г/л).

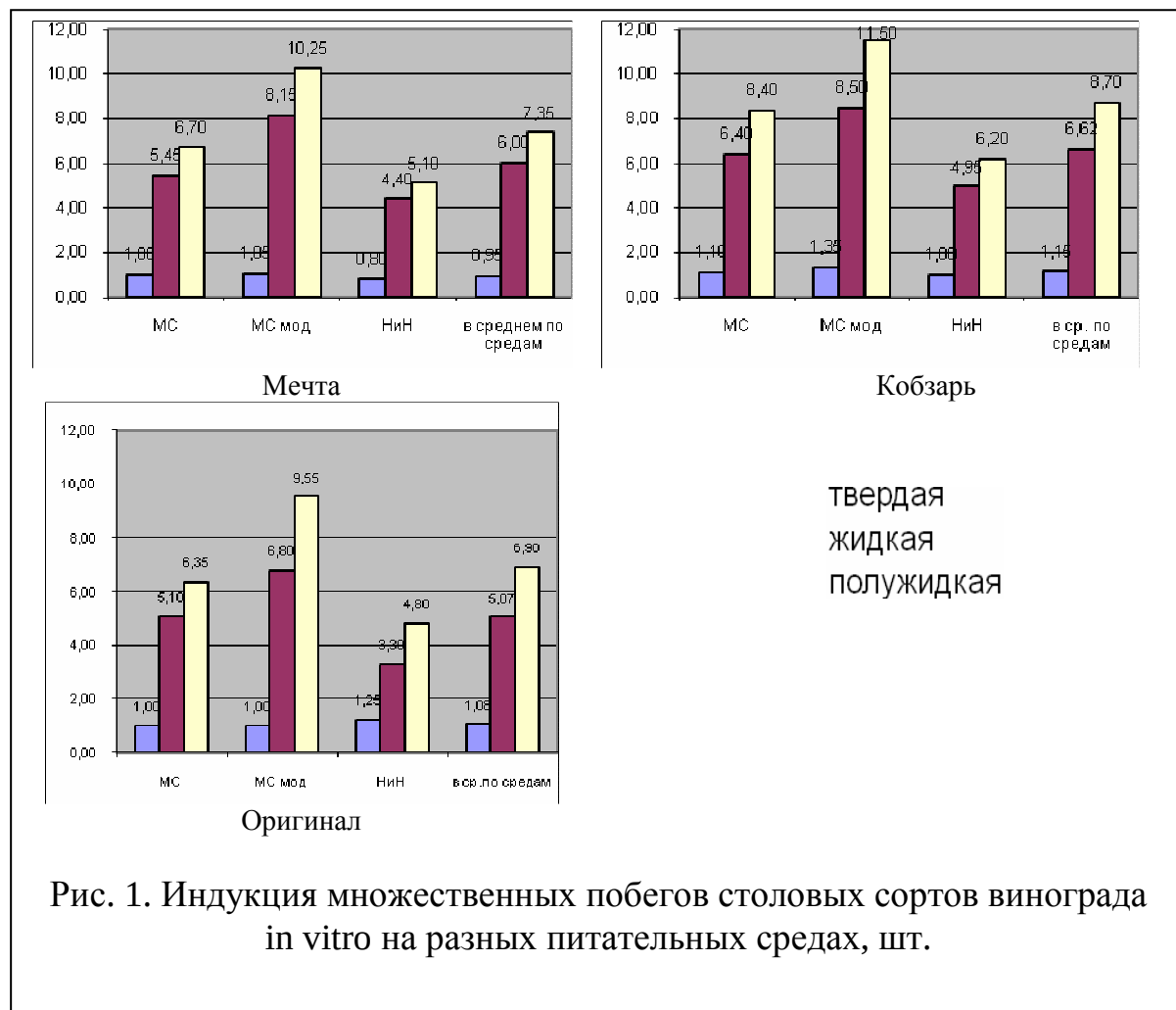
Экспланты высаживали в отдельные культуральные стаканы на экспериментальные варианты сред. Стаканы с жидкими средами закрепляли на встряхивательном аппарате. Полужидкая среда полупрозрачная, киселеобразная. Эксплант находился в ней в полупогруженном плавающем положении. Культивирование проводили в обычных условиях культурального бокса без встряхивания при $t = 23-27\text{ }^{\circ}\text{C}$ – первую неделю при освещении 80-1000 лкс., а затем при 2-3 тыс. лкс., при 16-часовом фотопериоде.

Во время культивирования вели наблюдения за состоянием минициальных эксплантов, проводя учет приживаемости и количества образовавшихся побегов. Через 20-30 дней культивирования меристематические верхушки увеличивались в размере до 1-2 см, и их пересаживали на среды того же состава и плотности.

Обсуждение результатов. Для разработки приемов повышения индукции множественных побегов в культуре *in vitro* мы изучали влияние концентрации агара в разных питательных средах. В результате было определено и доказано преимущество использования полужидких сред по сравнению с твердыми и жидкими.

На всех типах полужидких сред показатели приживаемости растений винограда были наилучшими и достигали иногда 91,67% (например у сорта Кобзарь на МС модифицированной полужидкой среде). На полужидких питательных средах была лучшей приживаемость апикальных верхушек,

более интенсивно происходило развитие эксплантов и образовывалось большее количество побегов (рис. 1).



Как оказалось, на жидких и полужидких средах экспланты винограда росли быстрее и более интенсивно формировали сильные множественные побеги, чем на твердых агаровых средах. При этом лучшие результаты были получены на полужидких питательных средах.

При использовании жидких сред (без содержания агара) эксплант погружался на дно стакана, в процессе культивирования было необходимо непрерывное встряхивание на качалке. При культивировании инициале на полужидких питательных средах (4 г/л агара) апикальные верхушки погружались в среду не полностью, как бы зависая в ней. Это обеспечивало

хороший контакт экспланта со средой и давало возможность проводить культивирование без применения встряхивания.

Начало пролиферации почек и образования побегов у всех экспериментальных сортов винограда происходило на твердых питательных средах на 8-10 день, на жидких – 6-7 день, а на полужидких – на 5-6 день.

Также было установлено, что на показатели приживаемости, пролиферации почек, а также на количество образованных побегов кроме консистенции среды, ее физических характеристик огромное влияние оказывает тип питательной среды, ее качественный и количественный состав.

Выявлена оптимальная питательная среда – полужидкая модифицированная среда МС, которая способствовала лучшей приживаемости инициальных эксплантов, ускорению процессов пролиферации микропочек. На этой среде образовывалось большее количество побегов, пригодных для дальнейшего клонального микроразмножения.

Для анализа полученных результатов исследования, оценки и выбора состава оптимальной питательной среды и ее консистенции для ускоренного размножения винограда в культуре *in vitro*, кроме традиционного математического аппарата статистики и дисперсионного анализа, впервые в виноградарстве был использован аппарат многокритериальной оптимизации. Целесообразность применения именно этого математического аппарата вызвана тем, что при помощи аппарата статистики можно оценить качество сред только лишь по отдельным показателям – по приживаемости, по пролиферации побегов или только по количеству побегов, а многокритериальная оптимизация позволяет оценить качество питательных сред с учетом всех исследуемых показателей в совокупности. Базовые понятия, аксиоматика и правила выбора лучшего решения в многокритериальной оптимизации изложены в работах [6,7].

С учетом специфики исследования была поставлена и решена задача многокритериальной оптимизации с целевыми функциями (критериями) -

приживаемость f_1 , пролиферация побегов f_2 и количество побегов f_3 – и множеством возможных развязок (варианты питательных сред) $X = \{x_1, x_2, \dots, x_{12}\}$.

С учетом специфики исследования имеем задачу многокритериальной оптимизации:

$$\begin{aligned} & \max f_1(x) \\ & \min f_2(x) \\ & \max f_3(x) \\ & x \in X \end{aligned}$$

Оценками возможных решений является совокупность значений всех трех критериев на выбранном решении, то есть $y(x) = (f_1(x), f_2(x), \dots, f_m(x))$.

Оценки $y(x_i) = (f_1(x_i), f_2(x_i), f_3(x_i))$, $i=1, \dots, 12$ каждого из решений будут представлять собой следующие векторы:

$$y_1 = y(x_1) = (f_1(x_1), f_2(x_1), f_3(x_1)) = (46,67; 8,33; 1,05),$$

$$y_2 = y(x_2) = (f_1(x_2), f_2(x_2), f_3(x_2)) = (62,50; 6,79; 5,26),$$

.....

$$y_{12} = y(x_{12}) = (f_1(x_{12}), f_2(x_{12}), f_3(x_{12})) = (33,33; 10,75; 2,82).$$

Решение x_1 исключаем из рассмотрения, так как соответствующая ему оценка $y_1 = y(x_1) = (46,67; 8,33; 1,05)$ менее предпочтительна по сравнению с оценкой $y_2 = y(x_2) = (62,50; 6,79; 5,26)$ решения x_2 . Далее исключаем из рассмотрения решение x_2 , так как его оценка менее предпочтительна по сравнению с оценкой решения x_3 . Сравнивая оценку решения x_3 – $y_3 = y(x_3) = (73,75; 5,95; 6,85)$ с оценкой решения x_5 – $y_5 = y(x_5) = (75,42; 6,30; 7,34)$, видим, что нельзя выбрать из них ни одну по отношению предпочтения. Аналогичным образом проводим сравнение всех возможных решений, исключая менее предпочтительные.

Нетрудно заметить, что оценка $y_6 = y(x_6) = (87,08; 5,21; 9,74)$ решения x_6 является более предпочтительной любой другой оценки из множества имеющихся, следовательно, из рассматриваемого множества решений X будут исключены все, кроме решения x_6 .

Таким образом, в множестве оценок Y не существует другой оценки $y \in Y$ такой, что $y \geq y_6$ по всем критериям f_1, f_2, f_3 . Следовательно, оценка $y_6 = y(x_6) = (84,58; 5,21; 9,74)$ является парето-оптимальной по определению, а множество парето-оптимальных оценок $P(Y) = \{y_6\}$. Следовательно, множество парето-оптимальных решений $P_f(X)$ состоит из единственного решения x_6 .

В результате сделан вывод о том, что выбор питательной среды МС модифицированной полужидкой является оптимальным по совокупности трех критериев – приживаемости, пролиферации побегов и количеству побегов.

Далее с помощью свертки векторного критерия представленную задачу векторной оптимизации мы привели к однокритериальной задаче с обобщенным критерием F . Для этого определяли коэффициенты важности частичных критериев. Диаграмма на рис. 2 иллюстрирует полученный результат:

Таким образом, используя теорию многокритериальной оптимизации, мы получили полное обоснование выбора среды МС модифицированной полужидкой как оптимальной питательной среды для индукции множественных побегов в культуре in vitro.

Использование усовершенствованного метода индукции множественных побегов повышает коэффициент размножения винограда в культуре in vitro, снижает себестоимость микроклона винограда на начальных этапах клонального микроразмножения.

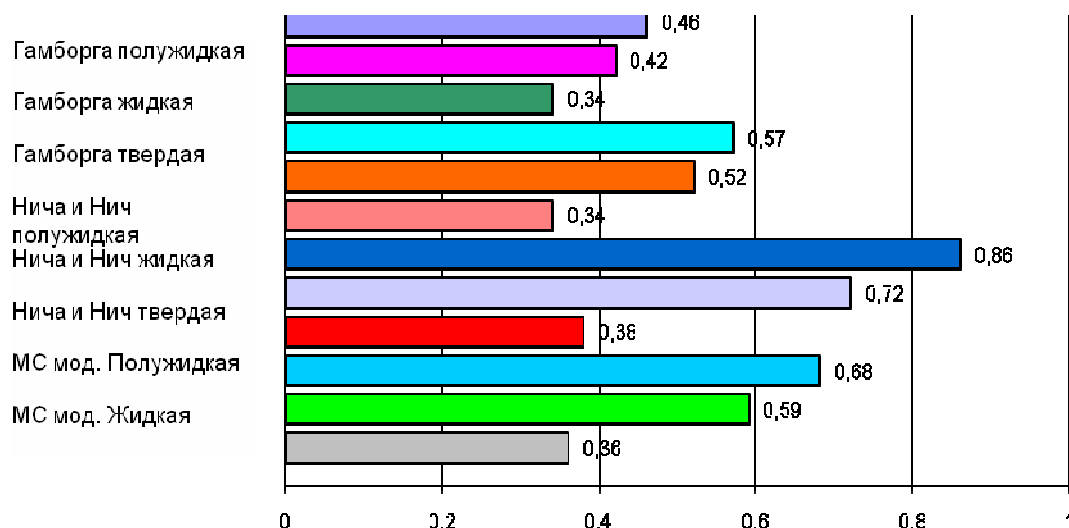


Рис. 2. Значение обобщенного критерия для инициальных эксплантов винограда на разных питательных средах (%)

Разработанная среда была испытана и внедрена в Центре клоновой селекции, отделе размножения и питомниководства ННЦ “Института виноградарства и виноделия им. В.Е. Таирова”.

Выводы. Для повышения эффективности индукции множественных побегов винограда в культуре *in vitro* исследовано и доказано преимущество использования полужидких сред, по сравнению с твердыми и жидкими питательными средами, относительно приживаемости апикальных верхушек, развития эксплантов и образования побегов.

При использовании методов многокритериальной оптимизации определена и подтверждена оптимальная питательная среда, а именно: полужидкая модифицированная среда МС, которая способствовала лучшей приживаемости, дифференциации, регенерации и продуктивности меристем виноградных растений.

Внедрение усовершенствованного метода индукции множественных побегов способствовало повышению коэффициента размножения винограда в культуре *in vitro* до 1:9,5; снижало себестоимость микроклонов винограда на начальных этапах клонального микроразмножения на 90 %.

Литература

1. Теслюк Н.І. Оптимізація процесуіндукції множинних пагонів винограду в культурі in vitro / Н.І. Теслюк, О.Д. Кічмаренко // Виноградарство і виноробство: міжв. тем. наук. зб. – Одеса: “Optimum”, 2006. – Вип. 43. – С. 158–167.
2. Высоцкий, В.А. Клональное микроразмножение растений // Культура клеток растений и биотехнология В.А. Высоцкий. – М.: Наука, 1986. – С. 91-102.
3. Barlass M., and K.G.M. Skene. In vitro propagation of (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices. *Vitis*. – 1978. – 17. – P. 4-8.
4. Дорошенко, Н.П. Повышение регенерационной способности меристем при получении безвирусного посадочного материала винограда / Н.П. Дорошенко // Виноград и вино России. – 1997. – № 2. – С. 6-9.
5. Стицько, С.А. Індукція множинних пагонів при розмноженні винограду in vitro / С.А. Стицько, Н.І. Теслюк, Л.В. Глотова // Вісник аграрної науки. – 2004.– № 4. – С. 42-44.
6. Жуковский, В.И. Риск в многокритериальных и конфликтных системах при неопределенности / В.И. Жуковский, Л.В. Жуковская. – М.: Едиториал УРСС, 2004. – С. 91-105.
7. Розен, В.В. Математические модели принятия решений в экономике / В.В. Розен.– Учебное пособие. – М.: Книжный дом “Университет”, Высшая школа, 2002. – С. 54-85.

References

1. Tesljuk N.I. Optimizacija procesuindukcii mnozhinnih pagoniv vinogradu v kul'turi in vitro / N.I. Tesljuk, O.D. Kichmarenko // Vinogradarstvo i vinorobstvo: mizhv. tem. nauk. zb. – Odesa : “Optimum”, 2006. – Vip. 43. – S. 158–167.
2. Vysockij, V.A. Klonal'noe mikrorazmnozhenie rastenij // Kul'tura kletok rastenij i biotehnologija V.A. Vysockij. – M.: Nauka, 1986. – S. 91-102.
3. Barlass M., and K.G.M. Skene. In vitro propagation of (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices. *Vitis*. – 1978. – 17. – P. 4-8.
4. Doroshenko, N.P. Povyshenie regeneracionnoj sposobnosti meristem pri poluchenii bezvirusnogo posadochnogo materiala vinograda / N.P. Doroshenko // Vinograd i vino Rossii. – 1997. – № 2. – S. 6-9.
5. Stic'ko, S.A. Indukcija mnozhinnih pagoniv pri rozmnozheni vinogradu in vitro / S.A. Stic'ko, N.I. Tesljuk, L.V. Glotova // Visnik agrarnoi nauki. – 2004.– № 4. – S. 42-44.
6. Zhukovskij, V.I. Risk v mnogokriterial'nyh i konfliktnyh sistemah pri neopredelennosti / V.I. Zhukovskij, L.V. Zhukovskaja. – M.: Editorial URSS, 2004. – S. 91-105.
7. Rozen, V.V. Matematicheskiemodeliprinjatijareshenijv jekonomike / V.V. Rozen.– Uchebnoe posobie. – M.: Knizhnyj dom “Universitet”, Vysshaja shkola, 2002. – S. 54-85.