

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

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

Кичмаренко Ольга Дмитриевна,  
канд. физ.-мат., наук

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

Одним из способов повышения эффективности размножения винограда in vitro является метод индукции множественных побегов на различных типах питательных сред. Применяя этот метод, можно значительно повысить коэффициент размножения 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 in vitro при помощи применения математического аппарата многокритериальной оптимизации.

Исследования проводили в лаборатории культуры тканей ИВиВ им. В. Е. Таирова на сортах винограда Мечта, Кобзарь, Оригинал.

С целью оптимизации состава питательной среды для образования множественных побегов испытывали различные варианты сред.

Было установлено, что для повышения эффективности индукции множественных побегов винограда в культуре in vitro

UDK 634.8:631.532:631.544

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

Teslyuk Nataliya, Cand. Agr. Sci.

*National academy of agrarian sciences of  
Ukraine National scientific centre «Institute of  
Viticulture and Winemaking named after V.YE.  
Tairov», Odessa, Ukraine*

Kichmarenko Ol'ga, Cand of Physical and  
Mathematical Sci.

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

One way to improve the effectiveness of grape breeding in vitro method is the induction of multiple shoots on various types of culture media. Applying this method, we can significantly increase the multiplication factor and therefore, to achieve increase in the production of seed free of viral and bacterial infections.

The aim of our study was to determine the optimal culture medium for the induction of multiple shoots in vitro by applying the mathematical apparatus of multi-criteria optimization.

Studies conducted in the laboratory tissue culture IViV them. VE Tairov on grape varieties Dream, Kobzar, Original.

In order to optimize the composition of the nutrient medium for the formation of multiple shoots tested various media options.

It was found that to improve the efficiency of induction of multiple shoots of grapes in the culture in vitro was investigated and proved the advantage of using semi-liquid media in comparison with the solid and the liquid medium with respect to the apical tips of survival, development and the formation of shoots explant.

When using multi-criteria optimization methods determined and confirmed the

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.

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 %

*Ключевые слова:* ВИНОГРАД, КУЛЬТУРА *IN VITRO*, ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ, МЕТОД МНОГОКРИТЕРИАЛЬНОЙ ОПТИМИЗАЦИИ, МНОЖЕСТВЕННЫЕ ПОБЕГИ, ПОЛУЖИДКАЯ СРЕДА.

optimum nutrient medium, namely a modified semi-solid MS medium, which contribute to a better survival, differentiation, regeneration and productivity of meristems. The introduction of an improved method of induction of multiple shoots helped to increase the multiplication factor of grapes in the culture *in vitro* to 1: 9.5; It reduces the cost of mikroklonov grapes in the early stages of micropropagation by 90%

*Key words:* GRAPEVINE, CULTURE IN VITRO, NUTRIENT MEDIUM, METHOD OF MULTICRITERIAN OPTIMIZATION, THE GREAT NUMBER GRAPEVINE SHOOTS, SEMI-LIQUID NUTRIENT MEDIUM

**Введение** одним из способов повышения эффективности размножения 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]. Применяя этот метод, можно значительно повысить коэффициент размножения и, следовательно, добиться увеличения производства посадочного материала, свободного от вирусной и бактериальной инфекции.

Многие авторы [2, 3, 4] отмечают, что этот метод имеет минимальную степень риска в отношении получения неоднородного потомства. 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 было использовано 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.

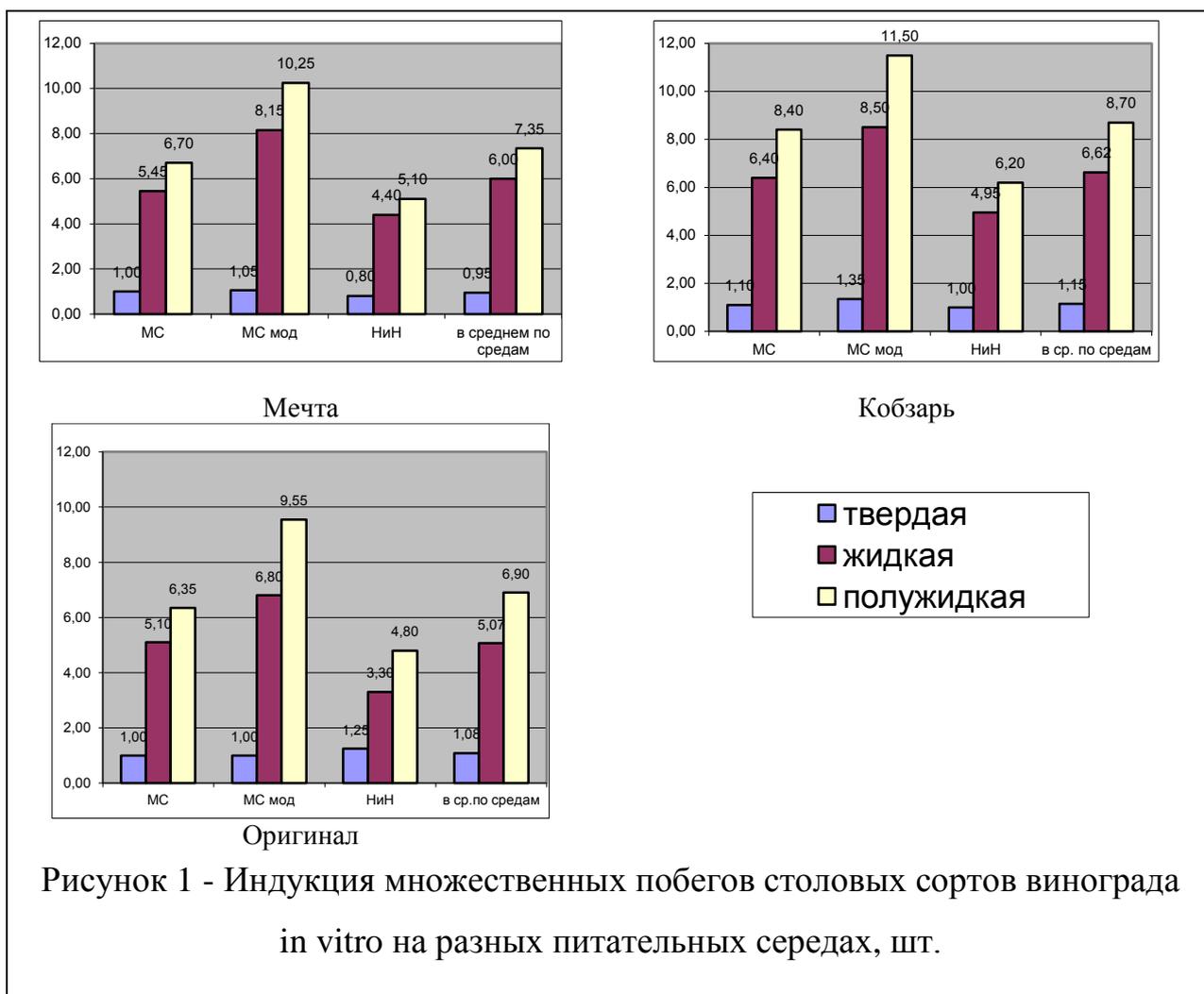
С целью оптимизации состава питательной среды для образования множественных побегов испытывали различные варианты сред: Мурасиге и Скуга; МС модифицированной нами в плане количественного и качественного состава витаминов, сахарозы и фитогормонов [1,5]; Нича и Нич; Гамборга. В среды добавляли 0,1 мг/л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

Перечисленные среды готовили жидкие (без содержания агара), полужидкие (4г/л агара) и твердые (8г/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. Культивирование эксплантов проводили в культуральном боксе при  $t = 23-27^{\circ}\text{C}$  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 инициальных 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 были наилучшими и достигали иногда 91,67% (нпр. 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 - 5 -6 день.

Также было установлено, что на показатели приживаемости, пролиферации почек, а также количества образованных побегов кроме консистенции среды, ее физических характеристик огромное значение имеет 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, т.е.  $y(x) = (f_1(x), f_2(x), \dots, f_m(x))$ .

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 вектора:

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

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

.....

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

Решение  $x_1$  исключаем из рассмотрения, т.к. 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  $x_2$ , т.к. 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*.

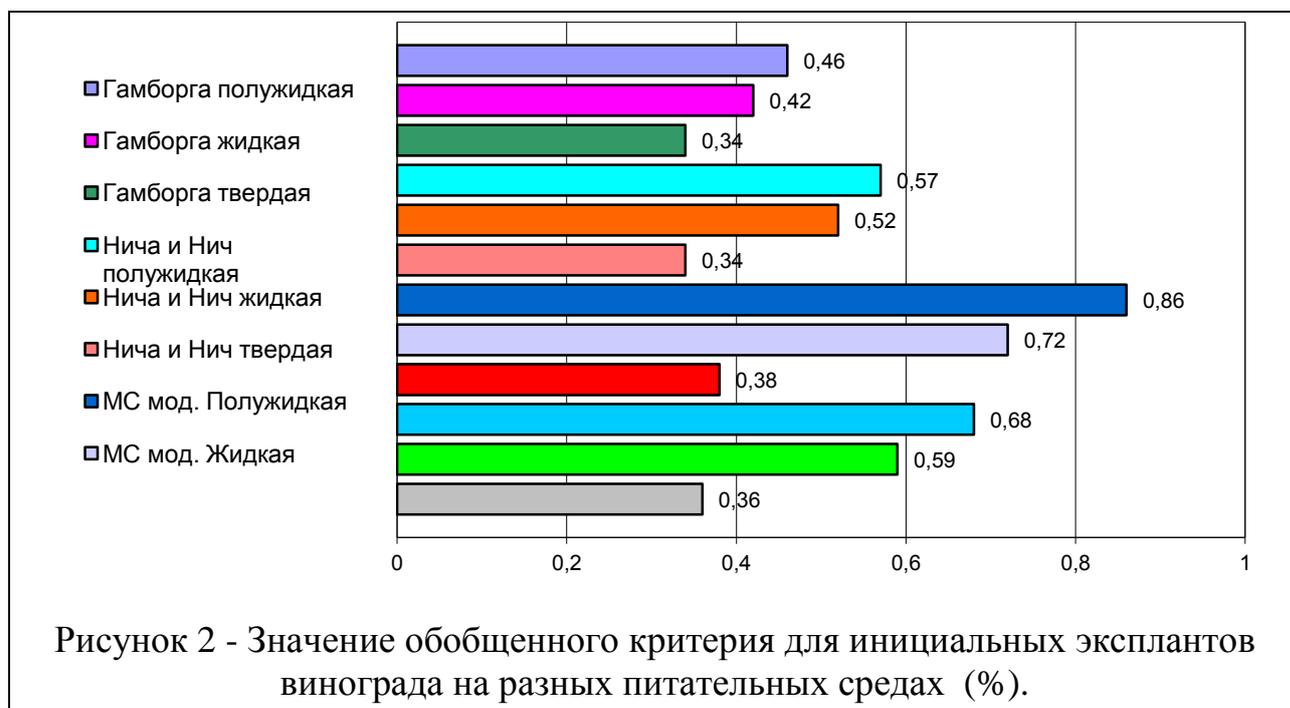


Рисунок 2 - Значение обобщенного критерия для инициальных эксплантов винограда на разных питательных средах (%).

Использование усовершенствованного метода индукции множественных побегов повышает коэффициент размножения винограда в

культуре *in vitro*, снижает себестоимость микроклона винограда на начальных этапах клонального микроразмножения. Разработанная среда была испытана и внедрена в Центре клоновой селекции, отделе размножения и питомниководства ННЦ “ИВиВ им. В.Е. Таирова”.

### **Выводы**

1. 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.

2. 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.

3. 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 процесу індукції 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. 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// Виноград и вино России. – 1997. – № 2. – с. 6-9.
5. Стицько С. А., Теслюк Н. І., Глотова Л. В. Індукція множинних пагонів при розмноженні винограду *in vitro*// Вісник аграрної науки. – 2004. - № 4. – с. 42-44.
6. Жуковский В. И., Жуковская Л.В. Риск в многокритериальных и конфликтных системах при неопределенности. – М.: Едиториал УРСС, 2004. – с. 91-105.
7. Розен В.В. Математические модели принятия решений в экономике. Учебное пособие. – М.: Книжный дом “Университет”, Высшая школа. – 2002. – с.54-85.