

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ЭКСПЛАНТОВ ВИНОГРАДА В ПЕРИОД АКТИВНОГО РОСТА*

Т. А. КРАСИНСКАЯ^{1,2}, Е. Н. БИРЮК³

¹Республиканское унитарное предприятие «Институт плодоводства»,
ул. Ковалева, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь

²Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова БГУ,
ул. Долгобродская, 23, г. Минск, 220070, Беларусь,
e-mail: krasinskaya@tut.by

³Республиканское унитарное предприятие «Институт мясо-молочной промышленности»,
пр. Партизанский, 172, г. Минск, 220075, Беларусь

АННОТАЦИЯ

При изучении эксплантов сортов винограда межвидовой гибридизации (Regent, Mars, Bianca, Marquette, Агат донской) с использованием различных биологически активных веществ отмечено, что генотип растения винограда с высокой степенью достоверности определял способность эксплантов к регенерационным процессам в культуре *in vitro*. Высокой регенерационной способностью методом прямого органогенеза при выбранных условиях обладал сорт Regent (48,6 %).

Для получения стерильной культуры эффективна 30%-ная перекись водорода экспозицией 10 мин. При стерилизации стоит учитывать тип экспланта: верхушечная часть зеленых черенков и пасынки более чувствительны к данной схеме стерилизации, чем почки без кроющих чешуй.

Использование в модифицированной питательной среде Мурасиге – Скуга только 6-БА в концентрации 1,1 мг/л, как биологически активного соединения, способствует увеличению выхода нормально развитых эксплантов путем прямого органогенеза. В то время как добавление 0,09 мг/л НУК стимулировал каллусогенез у основания эксплантов в количестве 13,4 %, что в 19 раз выше, чем на среде без ауксина.

Ключевые слова: *Vitis* L., Mars, Marquette, Bianca, Regent, Агат донской, культура *in vitro*, введение в культуру *in vitro*, стерилизация эксплантов, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Виноград как техническая культура в последнее время становится актуальной в Беларуси. В республике, в частности Гомельская и Брестская области, активно закладывают виноградники техническими сортами для промышленного производства винного материала.

Наиболее быстрый способ получения посадочного материала класса А – это использование биотехнологических методов, в частности клональное микроразмножение. Кроме того, в настоящее время культура *in vitro* рассматривается как эффективный способ сохранения и долговременного хранения растительного генофонда (создание генобанков) [1]. Этап введения в культуру *in vitro* один из первых этапов, определяющих успех всей работы с новой культурой. Цель этапа введения в культуру *in vitro* – получить стерильную и жизнеспособную культуру растений. При введении важно учитывать множество факторов, оказывающих влияние на успех получения стерильной и жизнеспособной культуры: генотип растений (физиологические, сортовые и видовые особенности), вид экспланта [2–5], сроки введения [6, 7], стерилизующие агенты и их длительность воздействия на экспланты [2, 6, 9–13], минеральный и гормональный составы питательных сред [2–4, 8, 12–22].

Заготовка исходного материала. При выборе материнского растения необходимо учитывать его физиологические, сортовые и видовые особенности. Исходные растения должны быть визуально здоровы, не поражены грибковыми, бактериальными и вирусными болезнями. Для более точного определения вирусов или их комплекса в растении используют методы ELISA или ПЦР.

В качестве материнских растений исследователи используют разновозрастные растения со спящими почками [23], активно растущие зеленые побеги [8], растения-регенеранты в культуре *in vitro*, состоящие из 8–10 междоузлий [3, 4].

* Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Б17-097).

Сроки введения. Известно, что успех регенерации апикальных меристем в условиях *in vitro* зависит от срока их вычленения. Исследования Н. И. Медведевой и др. показали, что введение в культуру *in vitro* эксплантов в феврале – марте и июне способствовало получению 97,5 и 96,7 % соответственно жизнеспособных растений-регенерантов в отличие от августа (49,2 %) [9, 10].

Вид экспланта. При выборе экспланта необходимо учитывать его возраст, строение и происхождение растения. Для обеспечения максимальной стабильности клонируемого материала, во избежание появления аномальных растений в качестве экспланта желательно использовать молодые, слабо дифференцированные ткани. Кроме того, экспланты от ювенильных растений лучше укореняются, чем от зрелых, особенно это касается древесных пород. В качестве эксплантов используют верхушечную меристему с 2–3 примордиальными листочками, пазушные почки [15], микрочеренки длиной 10–12 мм с узлом и листом [11].

Введение *in vitro* меристематических верхушек предполагает достаточно длительный период инициации начала роста и развития меристемы в пригодный для микроразмножения конгломерат (1–2 месяца). Поэтому интерес представляют и ускоренные методы введения в культуру *in vitro* – посадка на питательные среды черенков и вегетативных почек. Метод введения в культуру *in vitro* крупных эксплантов может являться наиболее перспективным при размножении свободных от вирусов растений, а также при необходимости размножения редких генотипов без учета их фитосанитарного статуса [6, 7].

Очень большое значение имеет размер экспланта: оптимальный размер выделенной апикальной меристемы винограда составляет 0,2–0,3 мм [2], а микрочеренков, имеющих узел с листом и почкой – 10–12 мм, 2 мм над почкой, остальные под почкой [11]. На эффективность размножения могут влиять расположение экспланта (горизонтальное или вертикальное), а также соотношение объема эксплантов и количества питательной среды для оптимального освещения и газообмена эксплантов.

Однако чем меньше внимания уделяется вопросам оздоровления, тем крупнее могут быть вводимые *in vitro* экспланты. Это относится как к микроразмножению свободных от вирусов растений, так и к сохранению и размножению редких экземпляров, в том числе ценных гибридных форм [6, 7].

В качестве эксплантов используют следующие части растений винограда: зимующие почки, конус нарастания (апикальная меристема и 2–3 примордиальных листочка) апикальных и латеральных почек, щиток (почка с кусочком стебля), междоузлие (черенок с двумя почками) [12–24].

Генотип растения. Разные культуры и даже сорта неодинаково реагируют на один и тот же состав питательной среды. Возможно, специфическая реакция на включение в среду регуляторов роста, наблюдаемая у разных сортов, отражает эндогенное содержание ростовых веществ, которое является генетически обусловленным признаком не только вида, но и сорта. Породно-сортовые особенности растений оказывают значительное влияние не только на потребности в различных биологически активных веществах, но и на элементы минерального питания, что особенно актуально при культивировании тканей растений в изолированных условиях, именно поэтому эффективность микроразмножения в значительной степени определяется правильным выбором питательной среды [7].

Стерилизующие агенты. Успех введения в культуру часто определяется эффективностью схемы стерилизации. Выбор стерилизующего агента определяется особенностями экспланта. Для нежных тканей (меристемы) концентрация стерилизующего агента должна быть снижена, чтобы сохранить жизнеспособность экспланта. Часто внутреннее заражение исходных эксплантов бывает намного сильнее, чем поверхностное, поэтому экспланты предварительно обрабатывают фунгицидами и антибиотиками против грибковой и бактериальной инфекций.

В качестве фунгицидных и бактерицидных растворов для предварительной стерилизации используется хлорамин, белизна [9], 0,2%-ный бенлат, физан, доместос [15], для увеличения проницаемости наружных покровов и предварительной стерилизации – 70%-ный этанол [2, 18, 23] и 50%-ный братофен [2].

В качестве основного стерилизующего агента – 0,1%-ный раствор сулемы, 0,1%-ный раствор нитрата серебра [7], 0,01%-ный раствор мертиолата, раствор гипохлорита натрия (1 % активного

хлора), в который добавляется несколько капель Твина-80 (поверхностно-активного вещества) [12, 20, 22, 23].

Хорошие результаты получения стерильной культуры винограда отмечались при использовании в качестве стерилизующего агента 10 % NaOCl экспозицией 10 и 15 мин (80,7–96,3 % стерильных эксплантов сорта Perlette) [20].

Питательные среды на этапе введения в культуру *in vitro*. В зависимости от вида, генотипа растений необходимо испытывать как твердые, так и жидкие питательные среды. Иногда жидкие среды имеют преимущество, так как обеспечивают большую подвижность трофических элементов. Большинство авторов использовали модифицированную питательную среду Мура-сиге и Скуга (MS), которая содержит много неорганического азота с различным набором витаминов и их концентраций [3, 12–14, 16, 17, 22, 24], среда Chee et. al. – C₂D [13, 18].

В зависимости от сорта винограда в питательной среде использовали различные физиологически активные вещества:

Из группы ауксинов:

- индолилмасляная кислота (ИМК) в концентрации 0,5–5,0 мг/л;
- индолилуксусная кислота (ИУК) – 1 мг/л;
- нафтилуксусная кислота (НУК) – 0,09 мг/л.

Из группы цитокининов:

- 6-бензиламинопурин (6-БАП) – 0,1–5,0 мг/л;
- кинетин до 1 мг/л.

Из группы гиббереллинов:

- гибберелловая кислота (ГК₃) – 0,5–2,0 [1, 8, 12–22, 24, 25].

В результате анализа литературных источников было отмечено, что эффективное влияние 6-БАП оказывал в диапазоне концентрации 0,5–1,0 мг/л. Наибольший прирост микропобегов был зафиксирован в варианте с концентрацией 1,0 мг/л. На средах с низкой концентрацией (0,1 мг/л) микропобеги не развивались, высокие концентрации (5,0 мг/л) подавляли развитие побега.

Апикальные меристемы из почек глазка характеризуются более высокими параметрами при добавлении в питательную среду комплекса гормонов: БАП, кинетин, ИУК в концентрациях 1,0:1,0:1,0 мг/л соответственно [2].

Эмистим, как компонент питательной среды, имеет широкий спектр действия. Он обладает слабой гибберелловой и цитокининовой активностью, положительно влияет на процессы роста и развития растений, снижает влияние неблагоприятных и стрессовых факторов, активирует защитные механизмы против многих патогенов, является индуктором устойчивости к вирусным болезням пасленовых. Эффект действия эмистима обусловлен генотипом растения: для сорта винограда Дружба применение невысоких концентраций эмистима (10^{-9} и 10^{-11} %) способствовало увеличению приживаемости меристем до 71,8–81,2 %, для сортов Платовский и Шардоне – применение более высоких концентраций оказывали положительный эффект (10^{-5} и 10^{-6} %) [4].

Установлена возможность использования пищевых крахмалов – кукурузного, картофельного и пшеничного (в концентрации 70 г/л) для приготовления питательных сред в культуре винограда *in vitro*, что способствует повышению эффективности клонального микроразмножения. Экспериментально доказано, что вышеназванные желирующие агенты способствуют улучшению показателей приживаемости пазушных почек одноглазковых черенков к условиям *in vitro*, их пролиферации, росту и развитию инициальных эксплантов. По биометрическим показателям развития микроклоны винограда на исследуемых типах питательных сред превосходили контрольные (агар) в 2 и более раз [14].

Цель исследований – оценить потенциал эксплантов сортов винограда межвидовой гибридизации, свободных от основных сокопереносимых вирусов, к регенерационным процессам на этапе введения в культуру *in vitro* при использовании различных биологически активных веществ.

Задачи исследований:

1. Определить сорта винограда, экспланты которых обладают наилучшей регенерационной способностью к прямому органогенезу на этапе введения в культуру *in vitro* в период активного роста.

2. Оценить реакцию эксплантов растений, свободных от основных вирусов винограда, на стерилизующие агенты-ксенобиотики (этиловый спирт, перекись водорода).

3. Выявить оптимальные биологически активные вещества и изучить особенности их влияния на морфогенез эксплантов.

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объекты исследований – свободные от специфических вирусов винограда перспективные и районированные сорта: Regent, Marquette, Mars, Bianca и Агат донской.

Regent – межвидовой гибрид винограда немецкой селекции: Диана (Сильванер × Мюллер Тургау) × Шамбургсен.). Генетическая формула – 80,06 % *Vitis vinifera* + 1,76 % *Vitis labrusca* + 14,32 % *Vitis rupestris* + 1,56 % *Vitis berlandieri* + 0,98 % *Vitis riparia* + 1,32 % *Vitis lincecumii*.

Устойчив к морозу (–27 °С), милдью (2 балла), оидиуму (2,5 балла), серой гнили (2,5 балла).

Marquette – новый перспективный красновинный сорт винограда. Гибрид *Vitis riparia*, *V. vinifera* и другие виды *Vitis* × *V. vinifera*). Один из родителей МС 1094 – сложный межвидовой гибрид, имеющий в своей родословной *Vitis riparia*, *Vitis vinifera* и другие виды винограда.

Среднего срока созревания. Обладает выдающейся морозоустойчивостью – надземная часть куста выдерживает снижения температуры до –38 °С, при этом имеет высокую устойчивость к грибным заболеваниям (милдью, оидиум и черная гниль). В отдельные годы требуются минимальные обработки фунгицидами. Умеренно устойчив к листовой форме филлоксеры.

Mars – бессемянный виноград столового назначения, изабельный сорт. Генетическая формула: 25 % *Vitis vinifera* + 75 % *Vitis labrusca*.

Среднего срока созревания, 130 дней.

Класс бессемянности 3, иногда встречаются небольшие рудименты.

Высокоустойчив к грибным заболеваниям. Морозоустойчивость –25...–26 °С.

Рекомендуется для беседочной культуры. Достаточно транспортабельный. Виноград используется в свежем виде, для сушки и приготовления вина.

Bianca (Виллар блан (генетическая формула 56,19 % *Vitis vinifera* + 3,13 % *Vitis labrusca* + 29,16 % *Vitis rupestris* + 6,25 % *Vitis berlandieri* + 5,28 % *Vitis lincecumii*) × Шасла бувье. Технический районированный сорт.

Морозоустойчивость –25...–27 °С. Сорт устойчив к милдью, оидиуму, серой гнили. Толерантен к филлоксере.

Рекомендуется для неукрывной корнесобственной культуры без химической защиты. Виноград может длительно висеть на кустах, накапливая сахар, с небольшим снижением кислотности, что позволяет, в зависимости от сроков уборки, готовить из Bianca сухие, полусладкие, крепленые и десертные вина.

Агат донской – столовый районированный сорт винограда [(Заря севера × Долорес) × Русский ранний]. ВНИИВиВ им. Я. И. Потапенко, Россия.

Сильнорослый. Грозди крупные, средним весом 400–600 г. Период от распускания почек до полной зрелости – 116–120 дней при сумме активных температур за этот период 2450 градусов.

Морозоустойчив (–26 °С). Повышенно устойчив к милдью, серой гнили. За сезон необходимы 1–2 опрыскивания. Сорт винограда Агат донской пригоден для выращивания в неукрывной культуре в районах укрывного виноградарства.

Сорта предварительно тестировали на наличие основных сокопереносимых вирусов винограда (вирус короткоузлия винограда (*GFLV*), вирус скручивания листьев винограда (*GLRaV-1*, *GLRaV-2*, *GLRaV-3*), вирус А винограда (*GVA*), вирус пятнистости винограда (*GFKV*)).

Этап введения в культуру *in vitro*. Зеленые черенки заготавливали за день до введения в культуру *in vitro* в период активного роста растений (начало августа).

Экспланты выделяли из однолетних зеленых черенков (рисунок 1). В качестве эксплантов изучали:

а) верхушки зеленых плетей и пасынки из узлов;

б) очищенная почка – почка без 3–4 кроющих чешуй (рисунки 2 и 3).



Рисунок 1 – Однолетние зеленые черенки винограда сорта Агат донской

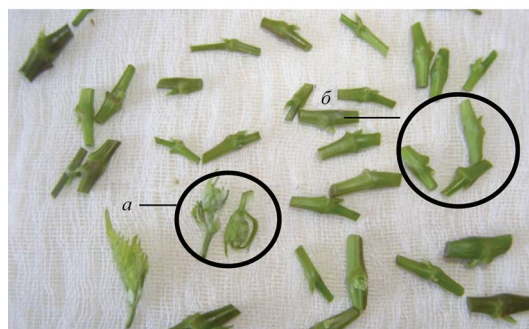


Рисунок 2 – Вид эксплантов винограда перед стерилизацией: а – верхушки черенков и пасынки; б – междоузлия

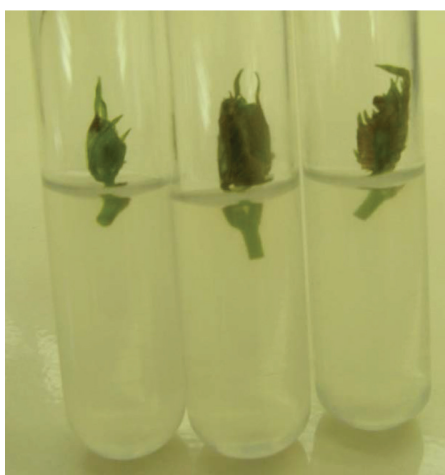


Рисунок 3 – Верхушки зеленых плетей в качестве эксплантов на питательной среде Мурасиге – Скуга

Экспланты выделяли в асептических условиях под бинокулярным микроскопом при 40-кратном увеличении с помощью специальных инструментов.

Схема стерилизации эксплантов в период активного роста:

В нестерильных условиях:

- раствор фунгицида дифеносоназола (Duaxo Universal Pilz-frei, COMPO) 3 мл/л – 60 мин;
- проточная вода – 10 мин.

В стерильных условиях (в ламинарном боксе):

- 70%-ный раствор спирта – 5 сек;
- стерильная дистиллированная вода – 10 мин;
- 30%-ный раствор перекиси водорода – 10 мин;
- трехкратная промывка стерильной дистиллированной водой – по 10 мин.

Питательная среда для введения эксплантов в культуру *in vitro*:

Среда 1. Модифицированная среда Мурасиге – Скуга (MS), содержащая 1,1 мг/л 6-БА и 0,09 мг/л НУК.

Среда 2. Модифицированная среда Мурасиге – Скуга (MS), содержащая 1,1 мг/л 6-БА. Длительность субкультивирования – 30 дней.

Показатели процесса стабилизации эксплантов в стерильных условиях:

- доля инфекции, %;
- доля некротизированных эксплантов, %;
- доля каллусообразования, %;
- доля не развившихся эксплантов, %;
- доля нормально развитых стерильных эксплантов, %.

Условия культивирования растений: освещение (лампы Phillips ЛД-54, 36W) – 2,5–3 тыс. лк, температура +23...+25 °С, фотопериод – 16/8 ч.

Длительность культивирования на этапе введения в культуру *in vitro* – 50 дней.

Статистическую обработку проводили в программе STATISTICA 10.0, используя ANOVA, одно- и многофакторный анализ, критерий Дункана для сравнения средних величин при $p = 0,95$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных результатов позволил отметить, что показатели морфогенеза эксплантов на этапе введения в культуру *in vitro* сортов винограда с высокой степенью достоверности зависели от генотипа растения, гормонального состава среды и типа экспланта.

Генотип растения. В ходе статистического анализа с высокой степенью достоверности было установлено, что генотип растений определял значения всех изучаемых показателей этапа

введения: количество инфицированных ($p < 0,001$), некротизированных эксплантов, процесс каллусообразования, долю неразвитых эксплантов и долю нормально развитых эксплантов ($p < 0,05$).

В целом доля инфицированных эксплантов была невысока и в зависимости от сорта варьировала от 2,8 до 29,9 % (таблица).

Экспланты сортов Regent и Агат донской имели лучшую отзывчивость на стерилизующий агент (доля инфицированных эксплантов составила 2,8 и 12,5 % соответственно).

Некротизация эксплантов при стерилизации 30%-ной перекисью водорода, как основного стерилизующего агента, определялась генотипом растения ($p < 0,05$). Экспланты сорта Bianca оказались устойчивы в выбранной схеме стерилизации и некроз у них не отмечался (таблица). Сорта Regent, Marquette, Mars и Агат донской были более чувствительны к стерилизующему агенту по сравнению с сортом Bianca, но доля некротизированных эксплантов была невысока и варьировала от 7,9 до 16,7 %.

Процесс каллусогенеза при регенерации эксплантов также определялся генотипически. По способности к каллусообразованию изучаемые сорта можно определить в 3 группы:

- высокое каллусообразование – Mars (17,4 %);
- среднее каллусообразование – Regent и Marquette;
- низкое каллусообразование – Bianca и Агат донской (таблица).

Высокая доля неразвитых эксплантов отмечалась у сорта Агат донской (39,5 %). Вероятно, это может свидетельствовать о том, что у эксплантов данного сорта концентрация эндогенных гормонов отличается от такового у других сортов, и выбранные экзогенные фитогормоны и их концентрации не смогли индуцировать процессы роста на этапе введения (таблица). У других изучаемых сортов этот показатель варьировал от 8,3 до 22,9 %.

Таблица – Зависимость показателей эффективности этапа введения в культуру *in vitro* от генотипа растений

Сорт винограда	Доля инфицированных растений, %	Доля некротизированных эксплантов, %	Доля каллусообразования, %	Доля неразвитых эксплантов, %	Доля нормально развитых эксплантов, %
Regent	2,8 b*	16,7a	8,3a	23,6a	48,6b
Marquette	29,9a	7,9ab	7,5a	20,1a	34,4a
Mars	28,5a	9,7ab	17,4c	8,3b	36,1ab
Bianca	27,2a	0,0b	2,1ab	22,9a	27,4a
Агат донской	12,5c	12,1a	0,0b	39,6c	35,8ab

П р и м е ч а н и е: * – одинаковое буквенное значение в столбцах свидетельствует о недостоверной разнице между средними.

Для получения генетически стабильного материала, идентичного материнскому, нам важно было получить нормально развитые растения методом прямого органогенеза (рисунок 4). Наилучшей регенерационной способностью непосредственно из ткани экспланта обладал сорт

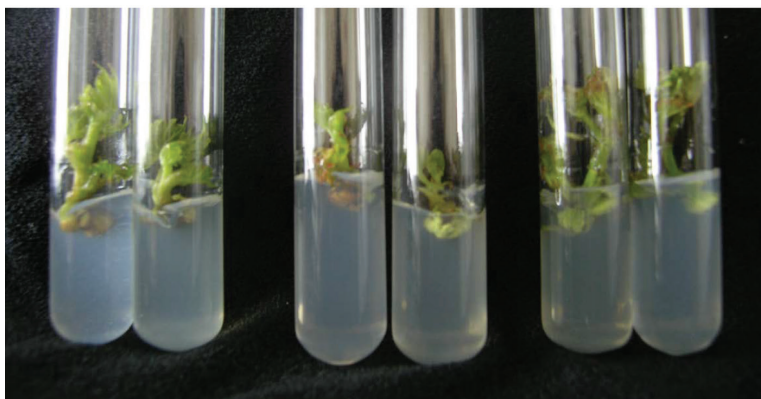


Рисунок 4 – Нормально развитые экспланты после 30 дней культивирования на среде Мурасиге – Скуга для введения в культуру *in vitro*

Regent (доля нормально развитых эксплантов – 48,6 %) (таблица). Доля нормально развитых эксплантов других изучаемых сортов варьировала от 27,6 до 36,1 %.

Гормональный состав питательной среды для введения достоверно оказывал влияние на формирование каллуса и на остановку развития эксплантов.

НУК в концентрации 0,09 мг/л в питательной среде (среда 1) способствовала образованию каллуса в 19 раз активнее по сравнению со средой без НУК, что не давало возможности регенерации экспланта в растение методом прямого органогенеза (рисунок 5).

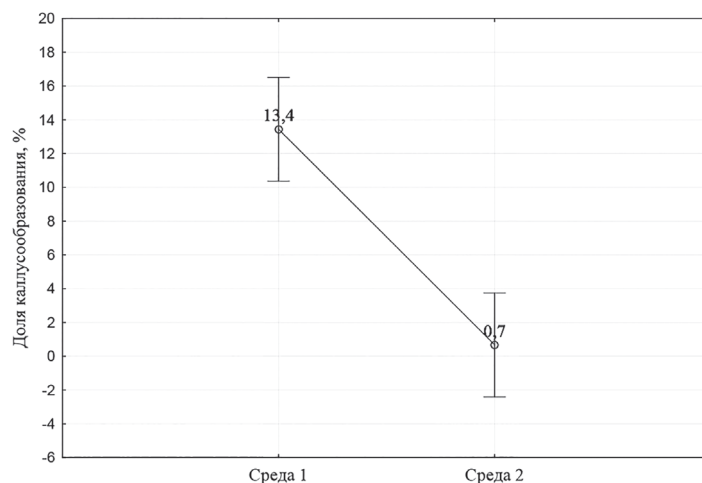


Рисунок 5 – Зависимость каллусообразования от гормонального состава питательных сред

Таким образом, можно говорить о том, что присутствие ауксина в среде для инициации (НУК в концентрации 0,09 мг/л) стимулировало образование каллуса, что в нашем случае является неприемлемым. В то же время отсутствие ауксина приводило к тому, что 32,7 % эксплантов останавливалось в своем развитии (рисунок 6).

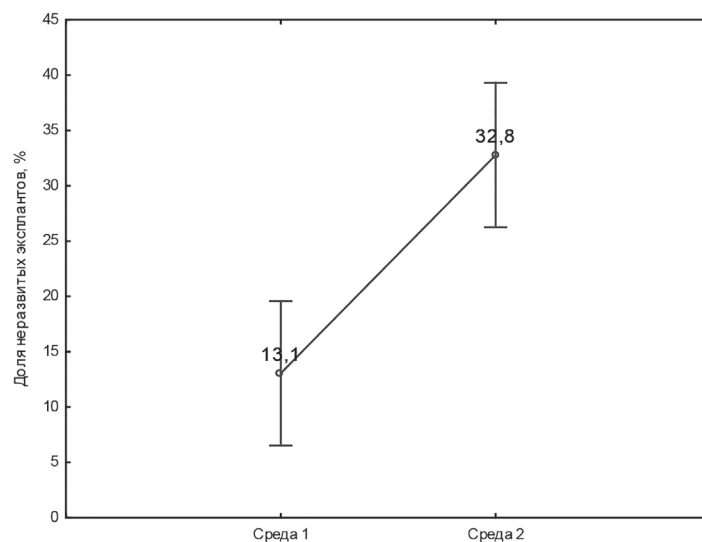
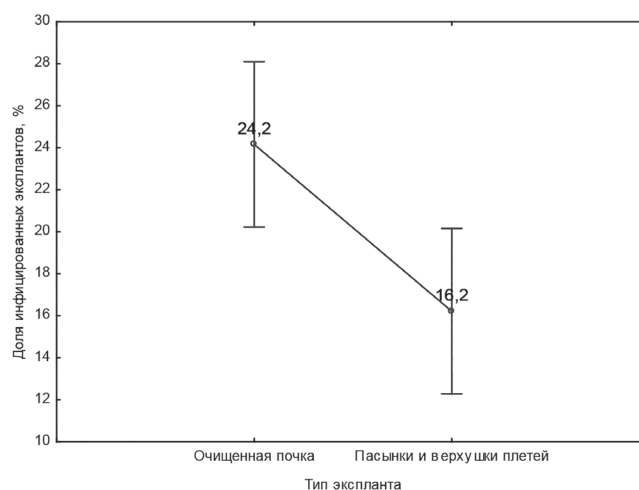


Рисунок 6 – Влияние гормонального состава питательных сред на развитие эксплантов

Тип экспланта. Доля инфицированных ($p < 0,01$), некротизированных ($p < 0,001$) и нормально развитых эксплантов достоверно определялась типом экспланта.

Пасынки и зеленые верхушки были менее инфицированы (16,2 %) в условиях *in vitro* по сравнению с эксплантами в виде очищенных почек (24,2 %) (рисунок 7). Вероятно, это связано с тем, что подготовка очищенных почек к переносу их в стерильные условия пробирки более продолжительна и при этой работе возможен был механический занос инфекции.

Рисунок 7 – Доля инфекции в условиях *in vitro* у различных типов эксплантов

Наиболее чувствительными к стерилизующему агенту (30%-ная перекись водорода) оказались апикальные части плетей и пасынки из узлов в качестве эксплантов: доля некроза составила 16,3 % (рисунок 8).

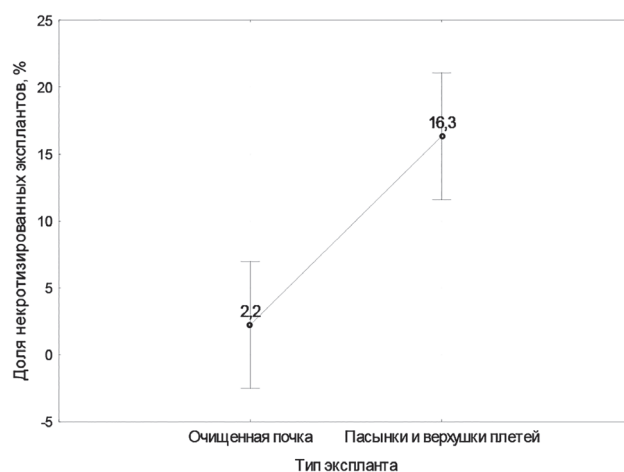


Рисунок 8 – Некротизация эксплантов в зависимости от их типа

Наилучшей регенерационной способностью путем прямого органогенеза обладали крупные экспланты в виде пасынков и верхушек зеленых черенков, что подтверждается работами других исследователей (рисунок 9).

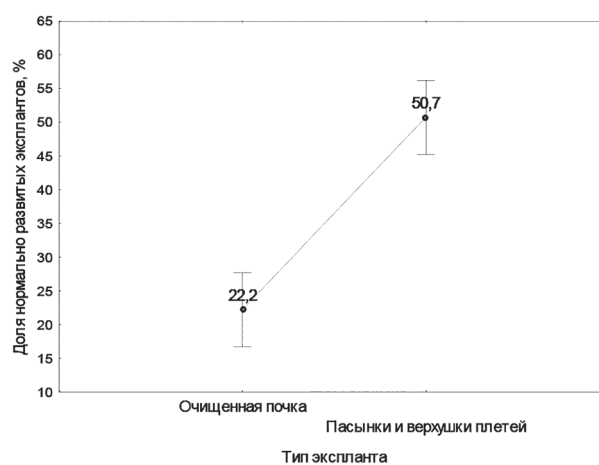


Рисунок 9 – Доля нормально развитых эксплантов в зависимости от типа экспланта

ВЫВОДЫ

1. При изучении эксплантов сортов винограда межвидовой гибридизации (Regent, Mars, Bianca, Marquette, Агат донской) с использованием различных биологически активных веществ отмечено, что генотип растения винограда с высокой степенью достоверности определял способность эксплантов к регенерационным процессам в культуре *in vitro*.

Высокой регенерационной способностью с помощью прямого органогенеза при выбранных условиях обладал сорт Regent (48,6 %).

Отмечено, что у сорта Агат донской 48,8 % изучаемых эксплантов (почки без кроющих чешуй и пасынки, верхушечные части плетей) останавливались в своем развитии, не сформировав нормально развитого растения к концу 50-го дня культивирования.

Экспланты сорта Bianca в период активного роста оказались более устойчивыми к выбранной схеме стерилизации по сравнению с другими сортами и некротизированных эксплантов не отмечалось.

Экспланты сорта Mars характеризовались как активно образующие каллус. Данное свойство можно использовать при микроразмножении путем непрямого органогенеза.

2. Отмечено, что использование 30%-ной перекиси водорода экспозицией 10 мин эффективно для получения стерильной культуры. Однако при стерилизации стоит учитывать тип экспланта: верхушечная часть зеленых черенков и пасынки более чувствительны к выбранной схеме стерилизации, чем почки без кроющих чешуй.

3. Использование в модифицированной питательной среде Мурасиге – Скуга только 6-БА в концентрации 1,1 мг/л, как биологически активного соединения, способствует увеличению выхода нормально развитых эксплантов путем прямого органогенеза. В то время как добавление 0,09 мг/л НУК стимулировал каллусогенез у основания эксплантов в количестве 13,4 %, что в 19 раз выше, чем на среде без ауксина.

Высокой регенерационной способностью к прямому органогенезу при выбранных условиях обладают пасынки и зеленые верхушки плетей в качестве эксплантов у сортов Regent, Mars, Bianca, Marquette, Агат донской.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Preece, J. E. The role of plant propagation at clonal genebanks / J. E. Preece // Acta Hort. – 2013. – Vol. 988. – P. 107–114.
2. Бугаенко, Л.О. Морфогенез винограда в культуре *in vitro* / Л. О. Бугаенко, Л. В. Иванова-Ханина // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Сер. Биология, химия. – 2011. – Т. 24 (63), № 2. – С. 73–82.
3. Дорошенко, Н.П. Особенности клонального микроразмножения винограда / Н. П. Дорошенко. – Новочеркасск: Изд-во ФГБНУ ВНИИВиВ им. Я. И. Потапенко, 2014. – С. 15–47.
4. Дорошенко, Н. П. Применение препарата Эмистим на этапе ввода при оздоровлении винограда от вирусной инфекции / Н. П. Дорошенко // Виноделие и виноградарство. – 2007. – № 6. – С. 37–41.
5. Зеленинская, Н. Н. Эффективные желирующие компоненты для размножения винограда *in vitro* / Н. Н. Зеленинская, Л. В. Джабурия, Н. И. Теслюк // Ин-т виноградарства и виноделия им. В. Е. Таирова [Электронный ресурс]. – Украина, 2009. – Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/pdf/10/04/09.pdf>. – Дата доступа: 13.03.2017.
6. Калинин, Ф. Л. Технология микрклонального размножения растений / Ф. Л. Калинин, Г. П. Кушнир, В. В. Сарнацкая; отв. ред. В. П. Лобов // Ин-т физиологии растений и генетики. – Киев: Навук. думка, 1992. – С. 5–8, 20–23.
7. Кильчевский, А. В. Генетические основы селекции: в 4 т. / А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева. – Минск: Беларуская навука, 2012. – Т. 3: Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия. – С. 8–10.
8. Батукаев, А. А. Использование регуляторов роста в системе производства оздоровленного посадочного материала винограда / А. А. Батукаев, А. А. Зармаев, М.С. Батукаев // Тр. БГУ / БГУ. – Минск, 2013. – Т. 8, ч. 2. – С. 44–48.
9. Медведева, Н. И. Методические рекомендации по микрклональному размножению винограда *in vitro* / Н. И. Медведева, Н. В. Поливар, Л. П. Трошин // Научный журнал КубГАУ [Электронный ресурс]. – 2010. – № 62 (08). – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2010/08/pdf/31.pdf>. – Дата доступа: 13.03.2017.
10. Медведева, Н. И. Особенности микрклонального размножения интродуцентов и клонов винограда / Н. И. Медведева, Н. В. Поливар, Л. П. Трошин // Научный журнал КубГАУ [Электронный ресурс]. – 2008. – № 40 (6). – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2008/06/pdf/18.pdf>. – Дата доступа: 13.03.2017.
11. Музыченко, Б. А. Способ микрклонального размножения винограда «ин витро» / Б.А. Музыченко, Н. П. Дорошенко // Виноград. – 1995. – Режим доступа: <http://www.freepatent.ru/patents/2041609>. – Дата доступа: 13.03.2017.

12. *In vitro* propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) Muscat of Alexandria cv. for conservation of endangerment / A.I.A. Abido [et al.] // Middle-East Journal of Scientific Research. – 2013. – № 13(3). – P. 328–337.
13. *In vitro* propagation of grapevine cultivars with potential for South Brazil / J. C. Bettoni [et al.] // American Journal of Plant Sciences. – 2015. – № 6. – P. 1806–1815.
14. Regeneration of GFLV-free grapevines and synchronization of micropropagation *in vitro* / I. Blažina [et al.] // Acta Horticulturae. – 1991. – № 289. – P. 87–126.
15. *In vitro* Micropropagation of Several Grapevine Cultivars from Romania / A. L. Butiuc-Keul [et al.] // III International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants. – Romania, 2009. – P. 129–131.
16. Casal, M. Micropropagation of *Vitis vinifera* from 'Vinho verde' region of Portugal: a method for grapevine leafroll virus elimination / M. Casal, M. Salomè and S. Pais // Plant Aging: Basic and Applied approaches. – 1990. – P. 327–334.
17. Clonal micropropagation of main grape and rootstock varieties of Turkish viticulture for obtaining virus-free basic nursery stocks / H. Celik [et al.] // Acta Horticulturae. – 2009. – № 827. – P. 421–424.
18. Chee, R. A method for large scale *in vitro* propagation of *Vitis* / R. Chee, R. M. Pool, D. Bucher // New York's Food Life Science Bull. – 1984. – № 109. – P. 1–9.
19. Grenan, S. Micropropagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) / S. Grenan // Biotechnology in Agriculture and Forestry. – 1992. – Vol. 18. – P. 371–398.
20. Effect of growth hormones on micropropagation of *Vitis vinifera* L. cv. Perlette / M. J. Jaskani [et al.] // Pak. J. Bot. – 2008. – № 40 (1). – P. 105–109.
21. Jemenez, V.M. Relationship between endogenous hormone levels of grapevine callus cultures and their morphogenetic behavior / V. M. Jemenez and F. Bangerth // *Vitis*. – 2000. – № 39 (4). – P. 151–157.
22. Surface disinfection procedure and *in vitro* regeneration of grapevine (*Vitis vinifera* L.) axillary buds / M. F. Laso-Javalera [et al.] // SpringerPlus. – 2016. – № 5. – P. 453–464.
23. Ibañez, A. Establishment and *in vitro* clonal propagation of the Spanish autochthonous table grapevine cultivar Napoleon: an improved system where proliferating cultures alternate with rooting ones / A. Ibañez, M. Valero and A. Morte // *Anales de Biología*. – 2005. – № 27. – P. 211–220.
24. Poudel, P. R. Effect of plant growth regulators on *in vitro* propagation of *Vitis ficifolia* var. ganebu and its interspecific hybrid grape / P. R. Poudel, I. Kataoka and R. Mochioka // *Asian Journal of Plant Science*. – 2005. – № 4 (5). – P. 466–471.
25. Shan, F. Semi-sterilized tissue culture for rapid propagation of grapevines (*Vitis vinifera* L.) using immature cuttings / F. Shan, K. Seaton // *HortScience*. – 2014. – № 49 (7). – P. 949–954.

IN VITRO CULTURE INITIATION OF GRAPE EXPLANTS AT ACTIVE GROWTH PERIOD

T. A. KRASINSKAYA, E. N. BIRYUK

Summary

Grape plant genotype was observed to determine explant regenerative *in vitro* capacity with a high degree of confidence when studying grape cultivar explants of cross-species hybridization ('Regent', 'Mars', 'Bianca', 'Marquette', 'Agat donskoi') using biologically active compounds. 'Regent' cultivar had the high regenerative capacity (48.6 %) by the mean of a direct organogenesis at the selected conditions.

30 % hydrogen peroxide is effective to produce sterile culture with exposition for 10 minutes. It should be take into account explants type at sterilization: apical parts of green cuts and lateral shoot are more sensitive than buds without cover scale.

1.1 mg/L 6-BA only as a biologically active compound in a modified MS medium helps to increase normally developed explants output by the mean of a direct organogenesis. Meanwhile, 0.09 mg/L NAA stimulates callusogenesis at the explant base by 13.4 % which is 19 times higher as for the medium with no auxin.

Keywords: *Vitis* L., 'Mars', 'Marquette', 'Bianca', 'Regent', 'Agat donskoi', *in vitro* culture, *in vitro* culture initiation, explants sterilization, Belarus.

Дата поступления статьи в редакцию 08.04.2018