

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ВИНОГРАДА – КРИТИЧЕСКИЙ ЭТАП КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ

А. А. ЗМУШКО¹, Т. А. КРАСИНСКАЯ^{1,2,3}

¹РУП «Институт плодородия»,

ул. Ковалёва, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь

²Белорусский государственный университет,

пр. Независимости, 4, г. Минск, 220030, Беларусь

³УО «Международный государственный экологический институт
имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета,

ул. Долгобродская, 23, г. Минск, 220070, Беларусь,

АННОТАЦИЯ

Этап введения в культуру *in vitro* винограда – критический этап клонального микроразмножения, целью которого является получение максимального количества стерильных и жизнеспособных растений-регенерантов.

Современные сорта – это гибриды между основными видами *Vitis vinifera*, *V. labrusca*, *V. riparia*, *V. amurensis*, *V. rupestris*, *V. berlandieri* и *V. lincecumii*, к которым необходим подбор оптимальных условий культивирования: сроки введения, концентрация и длительность воздействия стерилизующих агентов, минеральный и гормональный состав питательных сред, использование дополнительных биологически активных веществ для улучшения регенерационных процессов.

Ключевые слова: *Vitis* L., культура *in vitro*, эксплант, питательная среда, схема стерилизации.

Клональное размножение является наиболее приемлемым способом получения достаточного количества сертифицированного посадочного материала винограда за короткие сроки. Первый этап клонального микроразмножения – введение в культуру *in vitro* – один из важнейших и критических этапов для дальнейшего размножения растений. Цель этапа введения в культуру *in vitro* – получить максимальное количество стерильных и жизнеспособных эксплантов растений винограда. Успех данного этапа определяется большим количеством факторов: генотипом растения (не только между видами, но и между сортами в пределах одного вида), сроком введения в стерильные условия, состоянием материнского растения, видом эксплантов, выбором стерилизующего агента и его экспозицией, минеральным и гормональным составом питательных сред и т. д.

Влияние генотипа. Большое количество сортов винограда являются межвидовыми гибридами, что осложняет работу при подборе оптимальных условий культивирования в культуре *in vitro*. В основном это гибриды между видами *Vitis vinifera*, *V. labrusca*, *V. riparia*, *V. amurensis*, *V. rupestris*, *V. berlandieri* и *V. lincecumii*, к которым необходим индивидуальный подход.

Способность сортов к регенерационным процессам в стерильных условиях отмечалась во всех наших экспериментах с сортами Агат донской, Bianca, Зилга, Mars, Marquette, Таежный изумруд, Crystall, Платовский, Regent [1].

Исследования А. А. Батукаева с коллегами отмечают, что степень приживаемости апикальных меристем на этапе введения в культуру *in vitro* определяется и группой, к которым относятся сорта (сорта столовой и технической групп): у группы столовых сортов (Августин, Восторг, Мускат итальянский, Ранний Магарача) доля жизнеспособных эксплантов была в среднем по сортам на уровне 50,0 %, а у технических сортов (Подарок Магарача, Виорика, Ркацители) – 40,0–45,0 % [2].

Отмечалась сортовая специфичность винограда в потребности различных концентрации цитокинина (6-бензиладенин (6-БА)) для развития побегов из меристем и пролиферации почек [3]. Концентрация 6-БА в питательной среде варьирует от 0,5 до 2 мг/л. При культивировании меристем с листовыми зачатками в жидкой среде для развития побегов для сортов Жемчуг Магарача, Альфонс Лавалле, Лимбергер, Цимлянский чёрный оптимальная концентрация 6-БА составила

0,5 мг/л; для формы *V. rotundifolia*, сорта Подарок Магарача – 1,0 мг/л; для гибрида Магарач № 17-81-20 – 2 мг/л [4]. Другая группа исследователей определила, что высокая жизнеспособность эксплантов сортов Ритон, Лакхеда мезеш, подвоя 16-3 отмечалась на средах с 1,0 мг/л 6-БА, для сортов Фиолетовый ранний, Грушевский белый, Росинка, Алан-3 – на средах с 2,0 мг/л [5]. Применение комплекса фитогормонов увеличивает долю жизнеспособных эксплантов: для сорта Шевченко оптимальным было сочетание 6-БА (2,0 мг/л) и гибберелловой кислоты (ГК) (0,5 мг/л), для сорта Фрумоаса албэ – 6-БА (1,0 мг/л) и ГК (0,5 мг/л). Для культивирования эксплантов сорта Каберне Совиньон оптимальными были среды и с добавлением 6-БА в концентрации 0,5 мг/л, и сочетание 6-БА (1,0 мг/л) с ГК (0,5 мг/л) [6].

Таким образом, генотип оказывает влияние на развитие эксплантов на этапе введения в культуру *in vitro*, поэтому рекомендуется вести подбор фитогормонов и их концентраций индивидуально для каждого сорта.

Тип экспланта. В качестве эксплантов используются апикальные меристемы, пазушные почки и междоузлия, несущие почку. Междоузлия и пазушные почки имеют ряд преимуществ: легкость в работе, применимы для многих генотипов винограда, характеризуются генетической стабильностью и наличием коэффициента размножения уже на этапе введения – 2–5,5 за 4 нед. культивирования [7].

Апикальные меристемы используются для оздоровления растений от сокопереносимых вирусов. При этом очень важное значение имеет размер экспланта: чем меньше его величина, тем больше вероятность получения абсолютно здорового материала. Однако чем меньше эксплант, тем тяжелее у него проходят регенерационные процессы. Рядом исследований отмечено, что оптимальный размер экспланта может варьировать от 0,2 до 1 мм в зависимости от генотипа [4, 8, 9].

Экспланты характеризуются разной регенерационной активностью в зависимости от типа почек, в которых они находятся (апикальные и пазушные почки; пасынковые (летние) и зимующие почки) [3]. Рост микропобегов из апикальных меристем пасынковых почек у всех исследуемых сортов был активнее, чем при использовании апикальных меристем зимующей почки. Вероятно, такое явление связано с генетической предопределенностью – пасынковые почки в естественных условиях произрастания имеют более короткий период развития и характеризуются более интенсивным ростом. При культивировании пасынковой почки отмечалось формирование преимущественно одного побега, тогда как при культивировании апикальных меристем зимующих почек отмечалось формирование дополнительных почек у основания побега, хотя на этапе введения развивался только один побег. Таким образом, эффективность регенерационных процессов экспланта обуславливается использованием апикальных меристем из разных типов почек [6].

Отмечают, что доля стерильных и жизнеспособных эксплантов из растений, произрастающих в поле, низка и предпочтительно брать экспланты из выведенной из состояния покоя вызревшей лозы или из растений, растущих в теплице [4].

Сроки инициации культуры *in vitro*. Отмечают, что регенерационная способность меристематических верхушек зависит от срока их выделения и посадки в условия *in vitro*. Апексы винограда вводят в культуру *in vitro* в различные сроки: 1-й срок – осенне-зимний период; 2-й срок – июнь (период активного роста); 3-й срок – август (период вторичного роста) [8–11]. Оптимальными сроками введения в культуру *in vitro* являются февраль – март и июнь, когда выход регенерантов составляет 97,5 и 96,7 % соответственно. В то время как при посадке экспланта в августе выход пробирочных растений составил 49,2 % [8].

В осенне-зимний период для введения в культуру *in vitro* в качестве эксплантов используют зеленые побеги, взятые из выведенной из состояния покоя вызревшей лозы. Предварительно вызревшую лозу, заготовленную в конце ноября – начале декабря, нарезают на двух- или трехглазковые черенки длиной 8–15 см, которые в течение 2–3 сут вымачивают при комнатной температуре в водном растворе β-индолилуксусной кислоты в концентрации 2 мг/л. Затем черенки ставят на проращивание в растворе того же состава при температуре воздуха 25–30 °С [9]. Данную методику рекомендуют использовать при введении в культуру *in vitro* в феврале – марте [8]. Отмечается, что при проращивании спящей виноградной лозы асептический материал получить легче, поскольку побеги, вырастающие из спящей лозы в культуральной комнате, содержат меньше грибов и бактерий, чем растения с поля [7].

Для успешного размножения в культуре *in vitro* в качестве эксплантов могут быть использованы интенсивно растущие зеленые побеги, взятые с активно вегетирующих кустов винограда в мае – июне [9]. Активно регенерирующие экспланты успешно можно получить из лоз, растущих не только на винограднике, но и в теплице (наилучшие результаты дают сборы, сделанные с середины июня до 2-й половины июля) [12].

Методы стерилизации. Жизнеспособность эксплантов связана с правильным выбором оптимальной схемы стерилизации, при которой не повреждаются растительные ткани и максимально снижается уровень их контаминации. Эффективность стерилизации зависит не только от вида стерилизующего агента, но и от ряда таких факторов, как сортовые особенности, сроки изоляции, тип и размер эксплантов [13, 14]. В раствор основного стерилизующего агента многие исследователи добавляют специальное смачивающее вещество Tween 20, концентрацию которого подбирают индивидуально, но чаще всего примерно 2 капли на 100 мл стерилизующего раствора. После основного стерилизующего агента проводят промывку эксплантов стерильной дистиллированной водой 3–5 раз по 5–10 мин в зависимости от генотипа. Иногда для санации эксплантов и питательных сред от инфекции применяют антибиотики [15].

Для поверхностной стерилизации растительных тканей имеется широкий спектр химических соединений. Они делятся на две основные группы: вещества, содержащие активный хлор (хлорамин, гипохлорит натрия и кальция, хлорная известь), и вещества, содержащие ртуть (двухлористая ртуть – сулема, мертиолат, диоцид). Используются также азотнокислое серебро (AgNO_3) и перекись водорода (H_2O_2) [16–18].

Для введения в культуру *in vitro* винограда исследователи используют широкий спектр стерилизующих агентов.

Сулема (HgCl_2) в концентрации 0,1 % экспозицией от 5 до 15 мин используется для стерилизации междоузлий с почкой, предварительно погруженных в 70%-ный этанол на 8–10 или 30 сек [19–21]. Различное время экспозиции сулемы объясняется различной чувствительностью генотипов винограда к стерилизующему агенту, местом произрастания маточных растений и сроком введения.

Несмотря на высокий процент выхода стерильных и жизнеспособных эксплантов при использовании 0,1%-ном растворе сулемы экспозицией 10 мин, отмечается ее последствие в виде сдерживания развития эксплантов как на этапе введения, так и на первом пассаже культивирования [16]. Вероятно, это свидетельствует о более длительном остаточном последствии сулемы на растительные ткани, чем других стерилизующих веществ. При этом сулема оказывала тормозящее действие не только на вегетативное развитие эксплантов винограда, но и на рост недифференцированных тканей. Обработка данных эксперимента не показала существенных различий в приживаемости эксплантов винограда при обработке их стерилизующими веществами: 0,1%-ной сулемой, 0,1%-ным диоцидом и 2,0%-ным гипохлоритом натрия, поэтому использование последнего как более щадящего стерилизующего агента оправдано [16].

При наличии на эксплантах винограда опушения, чтобы увеличить долю стерильных эксплантов, в раствор 0,1%-ной сулемы добавляли 2,0%-ный раствор этилового спирта [7].

Для стерилизации эксплантов винограда используют диоцид экспозицией 5–8 мин [9, 22].

Гипохлорит натрия (NaOCl) используют многие исследователи в схемах стерилизации винограда, но его концентрация и экспозиция определяется видом экспланта, сроками введения. Одноглазковые черенки перед выделением меристемы, почки, зеленые междоузлия с теплицы или полевых условий стерилизуют в 0,8-, 1,0-, 1,2- и 2,0%-ном растворах гипохлорита натрия различной экспозицией: 3, 8, 10 или 15 мин [2, 4, 12, 23–26].

Гипохлорит кальция Ca(OCl)_2 . Для стерилизации зеленых междоузлий различных сортов винограда использовали 3%-ный раствор гипохлорита кальция экспозицией 3 мин и 7%-ный раствор экспозицией 15 мин [27–29]. S. Grenan указывает, что экспланты могут стерилизоваться гипохлоритом кальция (от 50 до 150 г/л) или гипохлоритом натрия (от 3 до 10 %) более длительное время – в течение 10–30 мин в зависимости от вида эксплантов [30].

Для стерилизации растительного материала возможно использование 0,1%-ного раствора йодида ртути (HgI_2) экспозицией 4 мин [31]. При введении в культуру *in vitro* растений винограда

Vitis vinifera L. эффективность показал препарат «Брадофен» 50%-ный (12 мин) [6]. Кроме того, возможно использовать дезинфицирующие препараты нового поколения – «Дезефект» и «Дезавит» в концентрациях 0,4–3,8 % [32].

В наших экспериментах в качестве основного стерилизующего агента использовался 30%-ный раствор перекиси водорода экспозицией от 7 до 15 мин. В зависимости от сорта, срока введения максимальный показатель жизнеспособных и стерильных эксплантов винограда составил 85,0 % [11, 33, 34].

Несмотря на то, что этанол на первых этапах стерилизации растительного материала винограда используется очень многими исследователями, некоторые из них отмечают, что молодые побеги чувствительны к нему. Обработка 70%-ным этанолом вызывала повреждения у 32,0–100,0 % эксплантов [7].

При введении эксплантов непосредственно перед стерилизацией материала его помещают в колбы со стерилизованной водой или с добавлением антиоксиданта – аскорбиновой кислоты (1 мас.%) [7, 25]. Это позволяет снизить негативное последствие дезинфицирующих агентов: экспланты впитывают достаточное количество воды, что защищает их от дальнейшего воздействия стерилизующих агентов [7].

После стерилизации, непосредственно перед посадкой на питательные среды, рекомендуется обновить все срезы экспланта [7, 27, 30].

Минеральный состав сред. На этапе введения в культуру *in vitro* винограда наиболее часто используются среды, содержащие соли питательной среды Мурасиге – Скуга (MS), а также среды G90, M64 и модифицированные среды MS и Nitsch and Nitsch (1969) [19, 27, 35, 36].

Лучшие регенерация и развитие растений наблюдались у большинства сортов на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга (пониженное содержание $\frac{3}{4}$ макроэлементов, 160 мг/л $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$) с чередованием культивирования на твердой среде, а через 3–4 нед. на жидкой среде [5]. Применение жидкой питательной среды способствовало ускорению развития микро-растений из меристем сортов винограда Подарок Магарача, Кобер 5ББ, Жемчуг Магарача и Сверх-ранний бессемянный на 30 дн. по сравнению с агаризованной средой [4].

Оптимальные показатели регенерации эксплантов отмечались на агаризованных средах, содержащих $\frac{1}{2}$ или $\frac{3}{4}$ концентрации макро- и микроэлементов MS и увеличенной концентрацией витаминов (тиамин HCl – 10 мг/л, никотиновая кислота – 4 мг/л) [8, 37].

Зарубежные коллеги в своих исследованиях также отмечали эффективность среды MS с пониженной концентрацией солей: до $\frac{1}{2}$ концентрации всех солей MS [24] или только до $\frac{1}{2}$ концентрации KNO_3 и NH_4NO_3 [20].

Использовали питательную среду MS, модифицировав ее витаминный состав: тиамин – 1 мг/л, пиридоксин – 1 мг/л, никотиновая кислота – 1 мг/л, мезоинозит – 50 мг/л, с содержанием сахарозы – 2 % и pH до 6,4–6,5 [2].

Апикальные меристемы размером 0,5–0,8 мм через 70 дн. регенерировали побеги длиной 2–4 см на модифицированной среде MS, где $\text{NaN}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ составил 170 мг/л, парааминобензойная кислота – 5 мг/л, тиамин – 10 мг/л, никотиновая кислота – 5 мг/л, пиридоксин – 0,2 мг/л, глицин – 10 мг/л, pH до 5,6–5,8 [38].

J. L. Zhang с коллегами определили, что для инициации эксплантов *V. piasezkii* var. *pagnucii* была оптимальной среда $\frac{1}{2}$ MS, на которой развитие побегов проходило на 6 дн. раньше, чем на MS с полным набором макро- и микросолей. Кроме того, на $\frac{1}{2}$ MS формировалось больше листовых пластинок, чем на других средах [21].

Гормональный состав сред. Для размножения винограда в культуре *in vitro* в качестве цитокинина чаще всего используется 6-БА. Работы А. Батукаева свидетельствуют о том, что низкие концентрации 6-БА (0,01–0,1 мг/л) слабо стимулируют процессы органогенеза эксплантов, а высокие концентрации (5 мг/л) также негативно влияют на развитие микропобегов [16]. Таким образом, необходимо подбирать оптимальную концентрацию фитогормона в зависимости от генотипа.

Большинство исследователей использовали 6-БА в концентрациях 0,5 мг/л [38] или 1,0 мг/л [8, 39]. Примерно через 21–24 дн. у всех растений-регенерантов наблюдали образование побегов

высотой около 1,5 см [39]. Иногда концентрацию 6-БА несколько повышают для развития верхушечных меристем винограда до 2,0–2,25 мг/л [16, 19, 20] или понижают до 0,1–0,2 мг/л [32] в зависимости от генотипа.

Использование комплекса различных фитогормонов также положительно сказывалось на активации регенерационных процессов. Например, для культивирования апикальных меристем из пасынкковых почек сорта Молдова оптимальным гормональным составом являлось сочетание 6-БА и кинетина (по 1,0 мг/л), а апикальные меристемы из почек глазка высокие показатели инициации демонстрировали при сочетании 6-БА, кинетина и индолилуксусной кислоты (ИУК) (по 1 мг/л) [6].

Присутствие в питательной среде гибберелловой кислоты не влияло на индукцию роста и развития эксплантов [37].

Для введения сортов винограда оптимальны были сочетания цитокининов и ауксинов: 0,5–1,0 мг/л 6-БА, 0,1–0,2 мг/л ИМК [37], а также 1 мг/л 6-БА и 0,01 мг/л α -нафтилуксусной кислоты (НУК) [1, 10, 11, 33, 34], 0,5 мг/л 6-БА и 0,01 мг/л НУК [24, 40].

Улучшает развитие эксплантов и добавление в питательную среду аденин-сульфата 74–147 мг/л на фоне 1–4 мг/л 6-БА [19, 36, 41].

Салициловая кислота и антибиотики. Лучшей приживаемости меристем подвоев винограда на этапе введения, а также новообразованию узлов и побегов на этапе собственно микроразмножения способствовала салициловая кислота в концентрации 1,4 мг/л. По реакции генотипов на салициловую кислоту авторы выделили несколько групп растений: слабореагирующие (SO4 и Кобер 5ББ); среднереагирующие (Гравесак и Феркаль); сильнореагирующие (5С и RCB) [42].

Для подавления бактериального и грибного заражения на этапе введения эксплантов рекомендуют вводить в состав питательной среды антибиотики «Карбонициллин» (динатриевая соль) в дозе 1 мг/мл или «Клафоран» («Цефотаксим») в дозе 0,1–0,2 мг/мл. Раствор антибиотиков добавляют через мембранные фильтры типа Millipore или термические фильтры с размером пор не более 0,4 мк методом холодной стерилизации [9].

Для поддержания стерильности на всех этапах развития растений-регенерантов в питательную среду добавляют антибиотик «Цефотаксим» в концентрации 10 мг/л [31]. Отмечают, что введение в состав питательной среды препарата «Цефотаксим» оказывало положительное влияние на регенерацию меристем на этапе введения и последующих этапах пролиферации и ризогенеза, способствуя оздоровлению растений [43].

Освещение. В основном исследователи культивируют экспланты при освещении 2,0–3,0 тыс. лк [1, 10, 11, 33, 34]. Некоторые авторы рекомендуют высаженные меристемы первую неделю культивировать при освещении 0,8–1,0 тыс. лк, а затем увеличивать освещение до 2,0–5,0 тыс. лк [9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Этап введения в культуру *in vitro* – критический этап клонального микроразмножения, целью которого является получение максимального количества стерильных и жизнеспособных растений-регенерантов.

Современные сорта – это гибриды между основными видами *Vitis vinifera*, *V. labrusca*, *V. riparia*, *V. amurensis*, *V. rupestris*, *V. berlandieri* и *V. lincecumii*, к которым необходим подбор оптимальных условий культивирования. Для успешного размножения в культуре ткани исходным материалом могут быть интенсивно растущие зеленые побеги, взятые из кустов винограда в мае – июне или из выведенной из состояния покоя вызревшей лозы в осенне-зимний период. В качестве экспланта обычно используются апикальные меристемы, выделенные из апикальных и латеральных почек, различной длины междоузлия с одной почкой.

Стерилизующие агенты, используемые для получения стерильного материала, (гипохлорит натрия или кальция, сулема, перекись водорода и т. д.) и их концентрации необходимо подбирать в соответствии с генотипическими особенностями сортов винограда, большая часть которых относится к межвидовым гибридам. Для подавления бактериальной и грибной контаминации на первом этапе культивирования эксплантов возможно введение в состав питательной среды антибиотиков.

На этапе введения в культуру *in vitro* винограда чаще используется полная по минеральному составу среда MS или с пониженной концентрацией макроэлементов; 6-БА применяют в диапазоне концентраций 0,5–1,0 мг/л как единственный фитогормон в среде, так и в сочетании с ауксинами (ИМК, НУК), кинетином или аденин-сульфатом. Минеральный и гормональный состав питательных сред также обуславливается генотипом винограда.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Красинская, Т. А. Введение в культуру *in vitro* различных генотипов рода *Vitis* L., свободных от основных вирусов винограда / Т. А. Красинская // Актуал. биотехнология. – 2017. – № 2 (21). – С. 174–175.
2. Батукаев, А. А. Биотехнологические методы ускоренного размножения винограда / А. А. Батукаев, Х. Эдиева, М. С. Батукаев // Научные труды государственного научного учреждения Северо-Кавказского зонального научно-исследовательского института садоводства и виноградарства Российской академии сельскохозяйственных наук : сб. ст. / Сев.-Кавк. зон. науч.-исслед. ин-т садоводства и виноградарства Рос. акад. с.-х. наук ; редкол.: Е. А. Егоров (гл. ред.) [и др.]. – Краснодар, 2013. – Т. 1. – С. 271–275.
3. Зленко, В. А. Диагностика хозяйственно ценных признаков и клональное микроразмножение винограда *in vitro* : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук : 06.01.08 ; 03.00.12. / В. А. Зленко ; ВНИИ винограда и продуктов его перераб. «Магарач». – Ялта, 1991. – 22 с.
4. Зленко, В. А. Размножение винограда методами *in vitro*. – Ч. I: Культивирование верхушек побегов и пролиферация аксиллярных почек винограда *in vitro* / В. А. Зленко, Л. П. Трошин, И. В. Котиков // Виноград и вино России. – 1998. – № 2. – С. 22–25.
5. Дорошенко, Н. П. Особенности культивирования *in vitro* некоторых технических сортов винограда / Н. П. Дорошенко, Н. О. Арестова, А. А. Соболев // Виноделие и виноградарство. – 2004. – № 4. – С. 34–36.
6. Бугаенко, Л. А. Морфогенез винограда в культуре *in vitro* / Л. А. Бугаенко, Л. В. Иванова-Ханина // Учен. зап. Тавр. нац. ун-та им. В. И. Вернадского. Сер. Биология, химия. – 2011. – Т. 24 (63), № 2. – С. 73–82.
7. Cao, Z. Grape: Micropropagation / Z. Cao // Handbook of Plant Cell Culture / ed. Z. Chen [et al.]. – New York, 1990. – Vol. 6 : Perennial Crops. – P. 312–328.
8. Медведева, Н. И. Методические рекомендации по микрклональному размножению винограда *in vitro* / Н. И. Медведева, Н. В. Поливара, Л. П. Трошин // Науч. журн. КубГАУ. – 2010. – № 62 (08). – С. 1–13.
9. Методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда / П. Я. Голодрига [и др.] ; Все-союз. науч.-исслед. ин-т винограда и продуктов его перераб. «Магарач». – Ялта : ВНИИ ВиПП «Магарач», 1986. – 56 с.
10. Красинская, Т. А. Введение в культуру *in vitro* экплантов винограда в период активного роста / Т. А. Красинская, Е. Н. Бирюк // Плодоводство : сб. науч. тр. / РУП «Ин-т плодоводства» ; редкол. В. А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2018. – Т. 30. – С. 202–211.
11. Krasinskaya, T. Morphogenetic potential of grape explants at initiation stage of *in vitro* culture during the active plant growth and dormancy period / T. Krasinskaya, A. Zmushko // Acta Horticulturae. – 2021. – № 1324. – P. 111–115. – DOI: 10.17660/ActaHortic.2021.1324.17.
12. Chee, R. A method for large scale *in vitro* propagation of *Vitis* / R. Chee, R. M. Pool, D. Bucher // New York' s food a. life sci. bull. – 1984. – № 109. – P. 1–9.
13. Особенности первого этапа клонального микроразмножения иммунных сортов яблони / Л. В. Ташматова [и др.] // Современ. садоводство. – 2018. – № 3. – С. 114–121.
14. Батукаев, А. Совершенствование технологии ускоренного размножения и оздоровления посадочного материала винограда методом *in vitro* / А. Батукаев. – М. : Моск. с.-х. акад. им. К. А. Тимирязева, 1998. – 223 с.
15. Беседина, Е. Н. Усовершенствования технологии клонального микроразмножения подвоев яблони на этапе введения в культуру *in vitro* / Е. Н. Беседина, Л. Л. Бунцевич // Науч. журн. КубГАУ. – 2015. – № 111. – С. 1716–1734.
16. Батукаев, М. С. Биотехнологические методы ускоренного размножения винограда методом *in vitro* / М. С. Батукаев. – М. : Рос. гос. аграр. ун-т – Моск. с.-х. акад. им. К. А. Тимирязева, 1998. – 222 с.
17. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами / Всерос. науч.-исслед. ин-т селекции плодовых культур Рос. акад. с.-х. наук ; под ред. Е. Н. Джигадло ; сост. Е. Н. Джигадло, М. И. Джигадло, Л. В. Голышкина. – Орел : ГНУ ВНИИСПК, 2005. – 50 с.
18. Высоцкий, В. А. Клональное микроразмножение растений / В. А. Высоцкий // Культура клеток растений и биотехнология : сб. ст. / АН СССР, Ин-т физиологии растений им. К. А. Тимирязева ; отв. ред. Р. Г. Бутенко. – М., 1986. – С. 91–102.
19. Mhatre, M. Micropropagation of *Vitis vinifera* L.: towards an improved protocol / M. Mhatre, C. K. Salunkhe, P. S. Rao // Scientia Horticulturae. – 2000. – Vol. 84, № 3/4. – P. 357–363.
20. *In vitro* propagation of a grape rootstock, deGrasset (*Vitis champinii* Planch.): Effects of medium compositions and plant growth regulators / P. Mukherjee [et al.] // Scientia Horticulturae. – 2010. – Vol. 126, № 1. – P. 13–19.
21. Factors affecting *in vitro* propagation of a Chinese wild grape (*Vitis piasezkii* var. *pagnucii*): shoot production and rhizogenesis / J. L. Zhang [et al.] // New Zealand J. of Crop & Horticultural Sci. – 2006. – Vol. 34, iss. 3. – P. 217–223.
22. Использование некоторых клеточных технологий в селекционном процессе винограда / Н. М. Пивень [и др.] // Биополимеры и клетка. – 1991. – Т. 7, № 4. – С. 66–72.
23. Ikten, H. The effects of growth regulators on micropropagation of grapevine (*Vitis* spp.) «Marechal Foch» and «Lacrosse» / H. Ikten, P. E. Read // Intern. J. of Fruit Sci. – Vol. 10, № 4. – P. 367–378.

24. Poudel, P. R. Effect of red- and blue-light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes / P. R. Poudel, I. Kataoka, R. Mochioka // Plant cell, tissue and organ culture. – 2008. – Vol. 92, № 2. – P. 147–153.
25. Thies, K. L. Meristem micropropagation protocols for *Vitis rotundifolia* Michx. / K. L. Thies, C. H. Graves // HortSci. – 1992. – Vol. 27, № 5. – P. 447–449.
26. Lu, M.-C. Micropropagation of *Vitis thunbergii* Sieb. et Zucc., a medicinal herb, through high-frequency shoot tip culture / M.-C. Lu // Scientia Horticulturae. – 2005. – Vol. 107, № 1. – P. 64–69.
27. Peros, J.-P. Variability among *Vitis vinifera* cultivars in micropropagation, organogenesis and antibiotic sensitivity / J.-P. Peros, L. Torregrosa, G. Berger // J. of Experimental Botany. – 1998. – Vol. 49, № 319. – P. 171–179.
28. Torregrosa, L. *In vitro* propagation of *Vitis* x *Muscadinia* hybrids by microcuttings or axillary budding / L. Torregrosa, A. Bouquet // *Vitis* – J. of Grapevine Res. – 1995. – Vol. 34, № 4. – P. 237–238.
29. Roubelakis-Angelakis, K. A. A new culture medium for *in vitro* rhizogenesis of grapevine (*Vitis* spp.) genotypes / K. A. Roubelakis-Angelakis, S. B. Zivanovic // HortSci. – 1991. – Vol. 26, № 12. – P. 1551–1553.
30. Grenan, S. Micropropagation of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) / S. Grenan // High-Tech and Micropropagation II / ed. Y. P. S. Bajaj. – Berlin, 1992. – P. 371–398. – (Biotechnology in Agr. and Forestry ; № 18).
31. Медведева, Н. И. Особенности микрклонального размножения интродуцентов и клонов винограда / Н. И. Медведева, Н. В. Поливарова, Л. П. Трошин // Науч. журн. КубГАУ. – 2008. – № 40. – С. 1–18.
32. Зеленянская, Н. Н. Усовершенствованная технология размножения винограда *in vitro* / Н. Н. Зеленянская, Н. И. Теслюк // Эффективность внедрения научных разработок для инновационного развития виноградо-винодельческой отрасли: состояние, тенденции, прогноз : материалы Междунар. науч.-практ. конф., г. Новочеркасск, 27 июля 2010 г. / Всерос. науч.-исслед. ин-т виноградарства и виноделия им. Я. И. Потапенко ; под общ. ред. Л. В. Кравченко. – Новочеркасск, 2010. – С. 117–122.
33. Krasinskaya, T. Grape viruses in Belarus / T. Krasinskaya, E. Kolbanova // Acta Horticulturae. – 2017. – № 1188. – P. 307–312. – DOI: 10.17660/ActaHortic.2017.1188.40.
34. Красинская, Т. Эффективность питательных сред на этапе введения в культуру *in vitro* технических сортов винограда Кристалл и Маршал Фош / Т. Красинская, Е. Дубовик // Биология – наука XXI века: 16-я Междунар. Пуш. шк.-конф. молодых ученых, Пушино, 16–21 апр. 2012 г. / Пуш. науч. центр Рос. акад. наук ; редкол.: А. М. Боронин [и др.]. – Пушино, 2012. – С. 264–265.
35. Galzy, R. Influence of three factors on the growth and nutrition of grapevine microcuttings / R. Galzy, V. Haffner, D. Compan // J. of Experimental Botany. – 1990. – Vol. 41, № 224. – P. 295–301.
36. Debnath, S. C. Micropropagation of small fruits / S. C. Debnath // Micropropagation of woody trees and fruits / ed. S. M. Jain, K. Ishii. – Dordrecht, 2003. – P. 465–506.
37. Турдиев, Т. Т. Оптимизация минерального и гормонального состава питательных сред для культивирования винограда *in vitro* / Т. Т. Турдиев, И. Ю. Ковальчук, С. Н. Фролов // Сохранение биоразнообразия тропических и субтропических растений : материалы 2-й Междунар. науч. конф., Харьков, 7–10 окт. 2013 г. / М-во образования и науки Укр. [и др.] ; редкол.: Т. Г. Орлова [и др.], отв. ред. А. А. Алёхин. – Харьков, 2013. – С. 173–178.
38. Зленко, В. А. Размножение оздоровленного посадочного материала винограда в культуре *in vitro* / В. А. Зленко, И. В. Котиков, Л. П. Трошин // Садоводство и виноградарство. – 2005. – № 1. – С. 21–23.
39. Рыфф, И. И. Реакции подвойных сортов винограда на солевой стресс *in vitro* / И. И. Рыфф // Магарач. Виноградарство и виноделие. – 2015. – № 3. – С. 52–53.
40. Chee, R. *In vitro* propagation of *Vitis*: The effects of organic substances on shoot multiplication / R. Chee, R. M. Pool // J. of Grapevine Res. – 1985. – Vol. 24, № 2. – P. 106–118.
41. Lewandowski, V. T. Rooting and acclimatization of micropropagated *Vitis labrusca* «Delaware» / V. T. Lewandowski // HortSci. – 1991. – Vol. 26, № 5. – P. 586–589.
42. Дорошенко, Н. П. Применение салициловой кислоты на этапе ввода в культуру *in vitro* подвойных сортов винограда / Н. П. Дорошенко // Мобилизация и сохранение генетических ресурсов винограда, совершенствование методов селекционного процесса : материалы Междунар. науч.-практ. конф., г. Новочеркасск, 13–14 авг. 2008 г. / Всерос. науч.-исслед. ин-т виноградарства и виноделия им. Я. И. Потапенко. – Новочеркасск, 2008. – С. 162–167.
43. Дорошенко, Н. П. Создание и хранение коллекции винограда *in vitro* / Н. П. Дорошенко, Т. В. Жукова // Рус. виноград. – 2016. – Т. 3. – С. 8–14.

INITIATION STAGE OF GRAPES *IN VITRO* CULTURE AS A CRITICAL STAGE OF PLANT CLONAL MICROPROPAGATION

A. A. ZMUSHKO, T. A. KRASINSKAYA

Summary

Initiation stage of *in vitro* culture of grapes is a critical stage of clonal micropropagation, the purpose of which is to obtain the maximum number of sterile and viable regenerative plants.

Modern varieties are hybrids between the main species of *Vitis vinifera*, *V. labrusca*, *V. riparia*, *V. amurensis*, *V. rupestris*, *V. berlandieri* and *V. lineecumii*, which require the selection of optimal cultivation conditions: the timing of initiation, concentration and sterilization exposure time, mineral and hormonal composition of nutrient media, the use of additional biologically active substances to improve regeneration processes.

Keywords: *Vitis* L., *in vitro* culture, explant, nutrient medium, sterilization scheme.

Поступила в редакцию 31.03.2022