

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* РАЙОНИРОВАННЫХ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ СОРТОВ ГРУШИ

Е. В. КОЛБАНОВА, Н. В. КУХАРЧИК, Т. Н. БОЖИДАЙ

РУП «Институт плодоводства»,
ул. Ковалёва, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,
e-mail: kolbanova@tut.by

АННОТАЦИЯ

Получены стерильные жизнеспособные экспланты 9 районированных в Республике Беларусь сортов груши, из них 8 – белорусской селекции: Белорусская поздняя, Виляя, Завея, Купала, Просто Мария, Спакуса, Ясачка (*P. communis* × *P. × ussuriensis*), Кудесница (*P. communis* × *P. × pyrifolia*) и 1 интродуцированный сорт Талгарская красавица (*P. communis* × *P. × pyrifolia*). Введение в культуру *in vitro* целесообразно проводить в периоды полного (Виляя, Завея) или вынужденного покоя (Белорусская поздняя, Купала, Просто Мария, Спакуса, Талгарская красавица, Ясачка) с применением следующей схемы стерилизации: 60 мин – 0,5%-ный Оксихом с добавлением Tween-20 (нестерильно с использованием встряхивателя (190 об/мин)); далее в ламинар-боксе: 1 мин – 70%-ный этанол, 15 мин – 33%-ная перекись водорода, 5 мин – промывка стерильной дистиллированной водой. Сорт Кудесница целесообразно вводить в культуру *in vitro* в период полного покоя с применением более жесткой схемы стерилизации: 60 мин – 0,5%-ный Оксихом с добавлением Tween-20 (нестерильно с использованием встряхивателя (190 об/мин)); далее в ламинар-боксе: 1 мин – 70%-ный этанол, 7 мин – 0,1%-ная сулема, 5 мин (3 раза) – промывка стерильной дистиллированной водой.

Ключевые слова: *Pyrus*, культура *in vitro*, стерилизация, срок введения, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Для успешного размножения в культуре *in vitro* любой плодовой или ягодной культуры первостепенной задачей является получение стерильных жизнеспособных первичных эксплантов. Исходным материалом для получения культуры *in vitro* сортов груши *P. communis* L. могут являться узловые сегменты [1] или верхушки побегов (1,0–1,5 мм) [2, 3], вычлененные из активно растущих молодых побегов, которые получают путем искусственного проращивания пазушных почек одревесневших побегов, срезанных с деревьев, растущих в полевых условиях. Спящие побеги предварительно стерилизуют раствором фунгицида [1–3]. Активно растущие верхушки побегов использовали в качестве эксплантов для введения в культуру *in vitro* груши сортов *P. communis* L. Conference и Doyenné d'Hiver, компактных клонов [4], Seckel [5], сортов *P. pyrifolia* Nijisseiki, Osa-nijisseiki, Kosui, Hosui, Yagumo, Shinsui [6], дикой груши *P. pyrifolia* [7], дикой груши *P. syrica* [8], *P. communis*, *P. pyrifolia*, *P. calleryana*, *P. cordata* и *P. koehnei* [9]. Узловые сегменты побегов успешно использовали для получения культуры груши сортов *P. communis* Выжница, Львовский сувенир, Роксолана, Христианка, Черемшина, Этюд [10], сортов *P. communis* William's Bon Chrétien, Packham's Triumph, Beurré Bosc [11], Rocha, Williams [12], IGE 2002 – мутации сорта Dr. Jules Guyot (*P. communis*) [13], сортов *P. pyrifolia* Hosui, Kosui, Nijisseiki, Shinseiki, Shinsu [14], дикой груши *P. pyrifolia* [7], подвоя Pyrodwarf®(S) (*P. communis*) [15].

В период активного роста побегов, используя в качестве эксплантов меристемы (0,5–1,0 мм), успешно вводили в культуру *in vitro* сорта *P. communis* Carrick, сорта *P. communis* × *P. pyrifolia* Garber, Smith [16], сорта *P. communis* Passe Crassane [17], Williams [18], Packham's Triumph, Red Bartlett [19], La France и Bartlett × La France [20], сорта *P. pyrifolia* Housui, Carrick, Nijisseiki [19], сорт *P. serotina* Housui [20]. В период полного покоя побегов меристемы (0,2–0,3 мм; 0,5–1,5 мм) использовали для введения сортов *P. communis* Durondeau, Conférence, Doyenné du Comice, Professeur Molon [21], клоновых подвоев *P. betulaefolia* [22]. Из почек сорта *P. communis* Bartlett, набухших весной в длину до 1,0 см, выделяли меристемы 0,5–1,5 мм [23]. Источником эксплантов были вегетативные пазушные почки на стадии набухания сорта *P. calleryana* Bradford [24].

Для введения в культуру *in vitro* представителей рода *Pyrus* используют питательные среды, состоящие из солей MS [3, 6, 7, 10, 11, 15, 16, 18–20, 22, 23, 25] и WPM [2, 15, 26]. В качестве основного стерилизующего агента чаще применяют гипохлорит натрия в различных концентрациях (0,5–20,0 %), в большинстве случаев с добавлением детергента (0,01–0,10%-ный Tween-20), в экспозиции 5–30 мин [1–3, 5, 6, 8, 11–16, 19, 20, 22, 23, 25–28], коммерческий препарат гипохлорита натрия с 7 % активного хлора (10%-ный Доместос) в течение 20 мин [17, 18], реже используют 6–9%-ный гипохлорит кальция в течение 20 мин [21, 29], 0,1–0,3%-ный нитрат серебра с добавлением нескольких капель детергента тритона X-100 в экспозиции 15–30 мин [10], 0,1%-ная сулема в экспозиции 4 мин [7, 28].

Цель работы – определить сроки введения в культуру *in vitro* и способ стерилизации эксплантов груши.

ОБЪЕКТЫ, УСЛОВИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства» в 2018–2024 гг. Объекты исследований: 9 районированных в Республике Беларусь сортов груши, из них 8 – белорусской селекции: Белорусская поздняя, Вилия, Завея, Купала, Просто Мария, Спакуса, Ясачка (*P. communis* × *P. × ussuriensis*), Кудесница (*P. communis* × *P. × pyrifolia*) и 1 интродуцированный сорт Талгарская красавица (*P. communis* × *P. × pyrifolia*). Происхождение сортов приведено по данным сотрудников РУП «Институт плодоводства» [30–39].

Сроки введения: введение в культуру *in vitro* сортов груши проводили в периоды полного вегетативного покоя (первая и вторая декады декабря), вынужденного покоя (вторая декада февраля) и активного роста (вторая декада июля).

Экспланты: точки роста, размером 1–2 мм, вычлененные из верхушечных и пазушных почек однолетних одревесневших (периоды полного и вынужденного вегетативного покоя) и неодревесневших побегов (период активного роста) с помощью бинокулярного микроскопа Olympus-SZ61. Однолетние побеги длиной 20–30 см срезали с 15-летних плодоносящих растений груши, растущих в полевых условиях, предварительно протестированных на отсутствие вирусов хлоротической пятнистости листьев яблони (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV), борозчатости древесины яблони (*Apple stem grooving virus*, ASGV), ямчатости древесины яблони (*Apple stem pitting virus*, ASPV), кольцевой пятнистости томатов (*Tomato ringspot virus*, TomRSV), кольцевой пятнистости табака (*Tobacco ringspot virus*, TRSV) и фитоплазмы истощения груши (Pear decline phytoplasma, PD).

Схемы стерилизации:

1. В период полного и вынужденного покоя: 60 мин – 0,5%-ный Оксихом или 0,5%-ный Пеннкоцеб с добавлением Tween-20 (нестерильно с использованием встряхивателя (190 об/мин)); далее в ламинар-боксе: 1 мин – 70%-ный этанол, 15 мин – 33%-ная перекись водорода, 5 мин – промывка стерильной дистиллированной водой.

2. В период вынужденного покоя с целью подбора фунгицида (сортов Белорусская поздняя, Спакуса и Талгарская красавица): 60 мин – 0,5%-ный Оксихом или 0,5%-ный Пеннкоцеб с добавлением Tween-20 (нестерильно с использованием встряхивателя (190 об/мин)); далее в ламинар-боксе: 1 мин – 70%-ный этанол, 15 мин – 33%-ная перекись водорода, 5 мин – промывка стерильной дистиллированной водой.

Изучали два фунгицида: Оксихом – двухкомпонентный контактно-системный фунгицид (д. в. меди хлорокись, 670 г/кг, оксадиксил, 130 г/кг), Пеннкоцеб – контактный фунгицид (д. в. манкоцеб, 750 г/кг).

3. В период активного роста: 60 мин – 0,5%-ный Оксихом с добавлением Tween-20 (нестерильно с использованием встряхивателя (190 об/мин)); далее в ламинар-боксе: 1 мин – 70%-ный этанол, 1, 3, 5 и 7 мин – 33%-ная перекись водорода, 5 мин – промывка стерильной дистиллированной водой.

Питательная агаризованная среда: макро- и микросоли, FeNa-EDTA по прописи Мурасиге и Скуга (MS), витамины B₁, B₆, PP – по 0,5 мг/л, витамин C – 1,5, мезоинозит – 100, 6-бензила-

денин (6-БА) – 0,5 мг/л, сахара – 30 г/л, pH 5,8. Автоклавирование среды проводили в течение 15 мин после добавления регуляторов роста при 0,9–1,0 атм.

Условия культивирования эксплантов *in vitro*: освещение (лампы NARVA LT, 36 W) – 2,5–3,0 тыс. лк, температура составила +20...+22 °C и фотопериод – 16/8 ч. Экспланты высаживали в пробирки 160 × 16 мм с объемом питательной среды 3 мл. Длительность субкультивирования – 28 сут.

Статистическую обработку осуществляли в программе STATISTICA 10.0, используя ANOVA, однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ, критерий Дункана ($p < 0,05$) для сравнения средних величин ($n = 3$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По предварительным результатам, полученным при введении в культуру *in vitro* сортов груши Талгарская красавица и Спакуса в фазу полного вегетативного покоя, была установлена целесообразность использования в качестве основного стерилизующего соединения 33%-ной перекиси водорода в экспозиции 15 мин [39], поэтому данная экспозиция перекиси водорода использовалась в дальнейшей работе.

На стадии предварительной стерилизации эксплантов в нестерильных условиях было выбрано два фунгицида для последующей оценки их эффективности. Оксихом на этапе предварительной стерилизации вводимых в культуру эксплантов оказался более эффективным, чем Пеннкоцеб. Использование контактно-системного фунгицида Оксихом снижает количество инфицированных эксплантов на 21,46–22,91 % у сортов Белорусская поздняя и Спакуса по сравнению с контактным фунгицидом Пеннкоцеб. Также у всех трех сортов количество стерильных активно регенерирующих эксплантов было достоверно выше при использовании Оксихома: в 2 раза у сорта Белорусская поздняя, в 1,6 раза у сорта Спакуса, в 1,3 раза у сорта Талгарская красавица, чем при использовании Пеннкоцеба. Таким образом, анализ средних значений количества инфицированных, некротировавших и стерильных активно регенерирующих эксплантов по фактору *B* (фунгицид) без учета сортовых особенностей показал статистическую зависимость данных показателей от типа фунгицида: Оксихом обеспечил больший выход регенерирующих эксплантов и меньший процент инфицированных и некротировавших эксплантов (табл. 1). Это послужило основанием использовать его для предварительной стерилизации при введении в культуру эксплантов других сортов груши.

Введение в культуру *in vitro* сортов груши в периоды полного и вынужденного вегетативного покоя. Стерильные активно регенерирующие экспланты сортов Вилия (15,11 %) и Завея (4,11 %) удалось получить только в период полного покоя. Для сортов Купала, Просто Мария, Спакуса, Талгарская красавица лучший срок введения – период вынужденного покоя. Количество активно регенерирующих эксплантов в этот срок введения было в 3,9 раза (Просто Мария), 3,2 (Спакуса), 2,4 (Купала) и 2,1 раза (Талгарская красавица) выше, чем в период полного покоя. У сорта Ясачка стерильные регенерирующие экспланты (8,33 %) были получены только при введении в период вынужденного покоя. У сорта Белорусская поздняя статистически значимой разницы между двумя сроками введения не наблюдалось: 20,17–22,70 % регенерирующих эксплантов. Отсутствие регенерационной активности эксплантов в оба срока введения отмечено у сорта Кудесница (табл. 2).

Анализ средних значений основного показателя введения в культуру *in vitro* (количество стерильных регенерирующих эксплантов) по фактору *A* (сорт) без учета срока введения показал достоверные различия в регенерационной активности сортов Талгарская красавица (33,68 %), Белорусская поздняя (21,43 %), Спакуса (15,06 %), у сортов Вилия, Завея, Купала, Просто Мария и Ясачка – регенерационную активность от 2,06 до 7,56 %. Регенерационная активность не отмечена у эксплантов сорта Кудесница. Низкую регенерационную активность эксплантов изучаемых сортов можно объяснить зрелым возрастом материнского растения (15 лет), с которого срезались побеги для введения в культуру *in vitro*. Влияние возраста материнского растения на регенерационную способность эксплантов сортов *P. communis* Cure, Argessis, Euras, Carpica,

Таблица 1. Влияние типа фунгицида на результативность введения в культуру *in vitro* сортов груши в период вынужденного вегетативного покоя, %

Сорт (фактор <i>A</i>)	Фунгицид (фактор <i>B</i>)	Доля инфицированных эксплантов	Доля некротизирован- ных эксплантов	Количество стерильных эксплантов	
				активно регенерирующих	неразвивающихся
<i>Влияние двух факторов вместе (сорт и фунгицид)</i>		<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> < 0,01
Белорусская поздняя	Оксихом	28,83^a	28,83 ^d	22,70^c	19,64 ^d
	Пеннкоцеб	50,29 ^c	36,84 ^e	11,11 ^d	1,75 ^a
Спакуса	Оксихом	27,09^a	29,17 ^d	22,91^c	20,83 ^d
	Пеннкоцеб	50,00 ^c	24,40 ^c	14,59 ^d	10,98 ^b
Талгарская красавица	Оксихом	41,01 ^b	0 ^a	45,76^a	13,23 ^c
	Пеннкоцеб	43,75 ^b	12,50 ^b	35,42 ^b	8,33 ^b
<i>Среднее по фактору A (сорт)</i>					
<i>Влияние фактора «сорт»</i>		–	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,01
Белорусская поздняя		39,56 ^A	32,84 ^C	16,90 ^B	10,69 ^A
Спакуса		38,54 ^A	26,80 ^B	18,75 ^B	15,90 ^B
Талгарская красавица		42,38 ^A	6,25 ^A	40,59^A	10,78 ^A
<i>Среднее по фактору B (фунгицид)</i>					
<i>Влияние фактора «фунгицид»</i>		<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,001
Оксихом		32,31^B	19,33^D	30,45^C	17,90 ^D
Пеннкоцеб		48,01 ^C	24,59 ^E	20,37 ^D	7,02 ^C

Примечание. Данные с одинаковыми буквами по столбцам статистически не различаются при $p < 0,05$ (критерий Дункана).

Таблица 2. Результативность введения в культуру *in vitro* сортов груши в периоды полного и вынужденного вегетативного покоя, %

Сорт (фактор <i>A</i>)	Срок введения (фактор <i>B</i>)	Доля инфицированных эксплантов	Доля некротизированных эксплантов	Количество стерильных эксплантов	
				активно регенерирующих	неразвивающихся
<i>Влияние двух факторов вместе (сорт и срок введения)</i>		<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,001
Белорусская поздняя	Период полного покоя	22,80 ^c	8,77 ^{bc}	20,17^b	48,26 ^h
	Период вынужденного покоя	28,83 ^d	28,83 ^f	22,70^b	19,64 ^f
Вилия	Период полного покоя	45,22 ^g	10,94 ^{cd}	15,11^c	28,72 ^g
	Период вынужденного покоя	24,95 ± 1,42 ^{cd}	63,51 ± 1,20 ^j	0 ^g	11,54 ^{de}
Завея	Период полного покоя	48,61 ^g	13,50 ^{cd}	4,11^{ef}	33,78 ^g
	Период вынужденного покоя	77,08 ^k	18,75 ^e	0 ^g	4,17 ^{abc}
Кудесница	Период полного покоя	53,58 ^h	46,42 ^g	0 ^g	0 ^a
	Период вынужденного покоя	48,05 ^g	51,31 ^h	0 ^g	0,64 ^{ab}
Купала	Период полного покоя	40,28 ^e	0 ^a	2,78 ^g	56,94 ⁱ
	Период вынужденного покоя	6,67 ^a	80,0 ^k	6,67^{de}	6,67 ^{bcd}
Просто Мария	Период полного покоя	69,99 ^j	28,21 ^f	1,80 ^g	0 ^a
	Период вынужденного покоя	69,87 ^j	14,10 ^d	7,05^{de}	8,98 ^{cde}
Спакуса	Период полного покоя	58,60 ⁱ	4,50 ^{ab}	7,20 ^{de}	29,70 ^g
	Период вынужденного покоя	27,09 ^d	29,17 ^f	22,91^b	20,83 ^f
Талгарская красавица	Период полного покоя	17,10 ^b	9,0 ^{bc}	21,60 ^b	52,30 ^{hi}
	Период вынужденного покоя	41,01 ^e	0 ^a	45,76^a	13,23 ^e
Ясачка	Период полного покоя	43,68 ^{ef}	56,32 ⁱ	0 ^g	0 ^a
	Период вынужденного покоя	61,46 ⁱ	26,04 ^f	8,33^d	4,16 ^{abc}
<i>Среднее по фактору A (сорт)</i>					
<i>Влияние фактора «сорт»</i>		<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,001
Белорусская поздняя		25,82 ^A	18,80 ^{AB}	21,43^B	33,95 ^D
Вилия		35,08 ^C	37,23 ^C	7,56 ^D	20,13 ^B
Завея		62,85 ^F	16,12 ^A	2,06 ^{FE}	18,97 ^B

Среднее по фактору А (сорт)				
Влияние фактора «сорт»	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Кудесница	50,81 ^E	48,86 ^F	0 ^F	0,32 ^A
Купала	23,47 ^A	40,0 ^{CD}	4,72 ^E	31,80 ^D
Просто Мария	69,93 ^G	21,15 ^B	4,43 ^E	4,49 ^A
Спакуса	42,84 ^D	16,83 ^A	15,06 ^C	25,26 ^C
Талгарская красавица	29,05 ^B	4,5 ^E	33,68 ^A	32,76 ^D
Ясачка	52,57 ^E	41,18 ^D	4,17 ^E	2,08 ^A
Среднее по фактору В (срок введения)				
Влияние фактора «срок введения»	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Период полного покоя	44,43 ^I	19,74 ^G	8,08 ^H	27,74 ^F
Период вынужденного покоя	42,78 ^H	34,63 ^H	12,60 ^G	9,98 ^E

Примечание. Данные с одинаковыми буквами по столбцам статистически не различаются при $p < 0,05$ (критерий Дункана).

Republica, Daciana, Getica, Republica, Ervina, Conference отмечает в своей работе А. С. Cosac с соавт. [29]: регенерационная способность эксплантов, взятых с молодых деревьев (3–5 лет), была значительно выше (в среднем 63,3 %), чем у эксплантов, взятых с 10–15-летних деревьев (в среднем 36,64 %).

Анализ средних значений количества стерильных регенерирующих эксплантов без учета сортовых особенностей показал преимущество введения в культуру *in vitro* сортов груши в период вынужденного покоя: данный показатель в 1,6 раза был выше, чем при введении в период полного покоя. Количество эксплантов, инфицированных грибной и бактериальной инфекциями, при обоих сроках введения было высоким – более 40 %, возможно, это связано с тем, что побеги для введения в культуру *in vitro* брали с деревьев, растущих в полевых условиях. Часто при введении в культуру *in vitro* берут побеги не с деревьев, растущих в полевых условиях, а с привитых деревьев, выращенных в теплице [9, 11, 14, 17, 18, 20, 22]. По данным ряда авторов [14, 22], эффективность стерилизации почек и сегментов побегов, взятых с растений, растущих в теплице, намного выше, чем с растений, произрастающих в поле. Стерилизация 1%-ным раствором гипохлорита натрия (5 мин) спящих почек *P. betuifolia*, взятых с побегов у растений, растущих в теплице (7 % контаминации), была намного успешнее, чем с побегов у растений, произрастающих в поле (35 % контаминации) [22]. Выход стерильных жизнеспособных эксплантов *P. pyrifolia* сортов Hosui, Kosui, Nijisseiki, Shinseiki, Shinsu составил 90–95 % при использовании эксплантов (узловой сегмент), взятых с побегов растений, выращенных в теплице, в то время как получение стерильных эксплантов с побегов растений, растущих в поле, оказалось малоэффективным (15 верхушек побегов (1 мм) из 16 были нестерильны). В качестве стерилизующего агента использовался 0,6%-ный гипохлорит натрия с добавлением нескольких капель детергента в экспозиции 30 мин [14]. Эффективность введения подвоя D-6 *P. calleryana* составила более 80 % при использовании однолетних побегов с молодых растений, растущих в теплице при стерилизации 3%-ным гипохлоритом натрия в течение 20 мин [25]. По данным Т. Hirabayashi с соавт. [20], не было проблем с получением стерильной культуры (1 % контаминации) сортов *P. serotina* Hosui и *P. communis* La France и Bartlett × La France при введении в культуру *in vitro* меристем, выделенных из активно растущих верхушек побегов деревьев, растущих в теплице.

Введение в культуру *in vitro* сортов груши в период активного роста побегов. Введение в культуру *in vitro* эксплантов с побегов в фазу активного роста (июль) требует щадящей стерилизации, чтобы минимизировать повреждения молодых тканей. Поэтому экспозиция перекиси водорода 15 мин, применяемая в период полного и вынужденного покоя для стерилизации эксплантов, не могла быть использована в этот период. В связи с этим экспозиция основного стерилизующего агента была уменьшена. Введение в культуру *in vitro* сортов груши в период

активного роста не было эффективным. Самая высокая регенерационная активность в этот период отмечена у сорта Талгарская красавица (13,33 % при экспозиции H_2O_2 3–5 мин), но это в 3,4 раза меньше данного показателя в период вынужденного покоя (45,76 %). У других сортов (Белорусская поздняя, Вилия, Просто Мария, Спакуса) отмечена та же тенденция: количество регенерирующих эксплантов при введении в период активного роста значительно меньше, чем при введении в период полного или вынужденного покоя. Исключение составляет сорт Купала, у которого при введении в период активного роста (при экспозиции H_2O_2 1 мин) выход регенерирующих эксплантов составил 12,12 %, что в 1,8 раза превышало данный показатель при введении в культуру в период вынужденного покоя (6,67 %). У сортов Завея, Кудесница и Ясачка регенерирующих эксплантов при введении в культуру *in vitro* в период активного роста получено не было (табл. 3).

Таблица 3. Результативность введения в культуру *in vitro* сортов груши в период активного роста

Сорт (фактор А)	Экспозиция Н ₂ О ₂ , мин (фактор В)	Доля инфицированных эксплантов, %	Доля некротизированных эксплантов, %	Количество стерильных эксплантов	
				активно регенерирующих, %	неразвивающихся, %
Влияние двух факторов вместе (сорт и экспозиция Н ₂ О ₂)		<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,001	—	<i>p</i> < 0,001
Белорусская поздняя	1	72,34 ^{<i>j</i>}	17,59 ^{<i>bc</i>}	2,56 ^{<i>de</i>}	7,51 ^{<i>bcde</i>}
	3	31,21 ^{<i>efgh</i>}	62,73 ^{<i>fg</i>}	6,06^{<i>abcde</i>}	0 ^{<i>ab</i>}
	5	8,33 ^{<i>abc</i>}	78,33 ^{<i>hi</i>}	0 ^{<i>e</i>}	13,33 ^{<i>def</i>}
	7	0 ^{<i>a</i>}	0 ^{<i>k</i>}	0 ^{<i>e</i>}	0 ^{<i>ab</i>}
Вилия	1	80,95 ^{<i>jk</i>}	14,29 ^{<i>b</i>}	4,76^{<i>bcde</i>}	0 ^{<i>a</i>}
	3	50,0 ^{<i>i</i>}	45,96 ^{<i>de</i>}	4,04^{<i>bcde</i>}	0 ^{<i>a</i>}
	5	33,33 ^{<i>fgh</i>}	64,58 ^{<i>fg</i>}	2,08 ^{<i>de</i>}	0 ^{<i>a</i>}
	7	0 ^{<i>a</i>}	100 ^{<i>k</i>}	0 ^{<i>e</i>}	0 ^{<i>a</i>}
Зався	1	96,67 ^{<i>l</i>}	3,33 ^{<i>a</i>}	0 ^{<i>e</i>}	0 ^{<i>a</i>}
	3	57,78 ^{<i>i</i>}	42,22 ^{<i>d</i>}	0 ^{<i>e</i>}	0 ^{<i>a</i>}
	5	22,92 ^{<i>def</i>}	77,08 ^{<i>hi</i>}	0 ^{<i>e</i>}	0 ^{<i>a</i>}
	7	0 ^{<i>a</i>}	100 ^{<i>k</i>}	0 ^{<i>e</i>}	0 ^{<i>a</i>}
Кудесница	1	78,42 ^{<i>jk</i>}	21,58 ^{<i>bc</i>}	0 ^{<i>e</i>}	0 ^{<i>a</i>}
	3	35,26 ^{<i>gh</i>}	64,74 ^{<i>fg</i>}	0 ^{<i>e</i>}	0 ^{<i>a</i>}
	5	16,24 ^{<i>bcd</i>}	59,40 ^{<i>f</i>}	0 ^{<i>e</i>}	24,36 ^{<i>g</i>}
	7	0 ^{<i>a</i>}	86,11 ^{<i>ij</i>}	0 ^{<i>e</i>}	13,89 ^{<i>ef</i>}
Купала	1	72,73 ^{<i>j</i>}	15,15 ^{<i>b</i>}	12,12^{<i>ab</i>}	0 ^{<i>a</i>}
	3	55,56 ^{<i>i</i>}	27,78 ^{<i>c</i>}	11,11^{<i>abc</i>}	5,55 ^{<i>abc</i>}
	5	40,15 ^{<i>h</i>}	57,07 ^{<i>f</i>}	2,78 ^{<i>cde</i>}	0 ^{<i>a</i>}
	7	0 ^{<i>a</i>}	100 ^{<i>k</i>}	0 ^{<i>e</i>}	0 ^{<i>a</i>}
Просто Мария	1	74,21 ^{<i>jk</i>}	13,77 ^{<i>b</i>}	3,42^{<i>cde</i>}	8,60 ^{<i>cde</i>}
	3	25,0 ^{<i>defg</i>}	70,83 ^{<i>gh</i>}	4,17^{<i>bcde</i>}	0 ^{<i>ab</i>}
	5	3,42 ^{<i>a</i>}	93,16 ^{<i>jk</i>}	0 ^{<i>e</i>}	3,42 ^{<i>abc</i>}
	7	0 ^{<i>a</i>}	93,33 ^{<i>jk</i>}	0 ^{<i>e</i>}	6,67 ^{<i>abcd</i>}
Спакуса	1	71,82 ^{<i>j</i>}	18,79 ^{<i>bc</i>}	9,39^{<i>abcd</i>}	0 ^{<i>ab</i>}
	3	20,83 ^{<i>de</i>}	75,83 ^{<i>hi</i>}	3,33 ^{<i>cde</i>}	0 ^{<i>ab</i>}
	5	0 ^{<i>a</i>}	100 ^{<i>k</i>}	0 ^{<i>e</i>}	0 ^{<i>ab</i>}
	7	0 ^{<i>a</i>}	100 ^{<i>k</i>}	0 ^{<i>e</i>}	0 ^{<i>ab</i>}
Талгарская красавица	1	78,42 ^{<i>jk</i>}	21,58 ^{<i>bc</i>}	5,34 ^{<i>abcde</i>}	0 ^{<i>ab</i>}
	3	31,67 ^{<i>fgh</i>}	55,0 ^{<i>ef</i>}	13,33^{<i>a</i>}	0 ^{<i>ab</i>}
	5	8,33 ^{<i>ab</i>}	78,33 ^{<i>hi</i>}	13,33^{<i>a</i>}	0 ^{<i>ab</i>}
	7	0 ^{<i>a</i>}	100 ^{<i>k</i>}	0 ^{<i>e</i>}	0 ^{<i>ab</i>}
Ясачка	1	83,97 ^{<i>k</i>}	16,03 ^{<i>b</i>}	0 ^{<i>e</i>}	0 ^{<i>ab</i>}
	3	18,52 ^{<i>cd</i>}	62,97 ^{<i>fg</i>}	0 ^{<i>e</i>}	18,52 ^{<i>fg</i>}
	5	0 ^{<i>a</i>}	100 ^{<i>k</i>}	0 ^{<i>e</i>}	0 ^{<i>ab</i>}
	7	0 ^{<i>a</i>}	100 ^{<i>k</i>}	0 ^{<i>e</i>}	0 ^{<i>ab</i>}

Окончание табл. 3

Сорт (фактор <i>A</i>)	Экспозиция H ₂ O ₂ , мин (фактор <i>B</i>)	Доля инфицированных эксплантов, %	Доля некротизированных эксплантов, %	Количество стерильных эксплантов	
				активно регенерирующих, %	неразвивающихся, %
Среднее по фактору <i>A</i> (сорт)					
Влияние фактора «сорт»		<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,001
Белорусская поздняя		27,97 ^{ABC}	64,66 ^C	2,15 ^C	5,21 ^B
Вилия		41,07 ^D	56,21 ^B	2,72 ^C	0 ^A
Завея		44,34 ^D	55,66 ^B	0 ^C	0 ^A
Кудесница		32,48 ^C	57,96 ^B	0 ^C	9,56 ^C
Купала		42,11 ^D	50,0 ^A	6,50 ^{AB}	1,39 ^A
Просто Мария		25,66 ^{AB}	67,77 ^{CD}	1,90 ^C	4,67 ^B
Спакуса		23,16 ^A	73,65 ^E	3,18 ^{BC}	0 ^A
Талгарская красавица		29,60 ^{BC}	63,73 ^C	8,00 ^A	0 ^A
Ясачка		25,62 ^{AB}	69,75 ^{DE}	0 ^C	4,63 ^B
Среднее по фактору <i>B</i> (экспозиция H ₂ O ₂)					
Влияние фактора «экспозиция H ₂ O ₂ »		<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,001
1 мин		78,84 ^H	15,79 ^F	4,18 ^{DE}	1,79 ^D
3 мин		36,20 ^G	56,45 ^G	4,67 ^D	2,67 ^{DE}
5 мин		14,75 ^F	78,66 ^H	2,02 ^{EF}	4,57 ^E
7 мин		0 ^E	97,72 ^I	0 ^F	2,28 ^D

Примечание. Данные с одинаковыми буквами по столбцам статистически не различаются при $p < 0,05$ (критерий Дункана).

Таким образом, анализ средних значений количества активно регенерирующих эксплантов по фактору А (сорт) без учета экспозиции H₂O₂ выявил статистическую зависимость данного показателя от сортовых особенностей: регенерационная активность отсутствовала у сортов Завея, Кудесница, Ясачка, у других сортов она колебалась от 1,90 (Просто Мария) до 8,00 % (Талгарская красавица) (табл. 3). В то время как анализ средних значений количества активно регенерирующих эксплантов по фактору А (сорт) без учета срока введения показал, что регенерационная активность отсутствовала только у сорта Кудесница, а у остальных сортов колебалась от 2,06 (Завея) до 33,68 % (Талгарская красавица) (табл. 2).

У сорта Кудесница не было получено стерильных регенерирующих эксплантов ни в один срок введения при использовании перекиси водорода, поэтому в период полного покоя почек был взят более жесткий стерилизующий агент – 0,1%-ная сулема в экспозиции 7 и 10 мин. Установлено достоверное влияние 0,1%-ной сулемы на количество инфицированных ($p < 0,01$) и некротизировавших эксплантов ($p < 0,05$). Минимальное количество (1,85 %) стерильных активно регенерирующих эксплантов получено с использованием сулемы в экспозиции 7 мин (табл. 4).

Таблица 4. Результативность использования сулемы при введении в культуру *in vitro* сорта Кудесница

Экспозиция 0,1%-ной сулемы, мин	Доля инфицированных эксплантов, %	Доля некротизированных эксплантов, %	Доля стерильных активно регенерирующих эксплантов, %
7	77,78 ^b	20,37 ^a	1,85 ^a
10	72,62 ^a	27,38 ^b	0 ^a

ВЫВОДЫ

Введение в культуру *in vitro* сортов груши целесообразно проводить в периоды полного (Виляя, Завея) или вынужденного покоя (Белорусская поздняя, Купала, Просто Мария, Спакуса, Талгарская красавица, Ясачка) с применением следующей схемы стерилизации: 60 мин – 0,5%-ный Оксихом с добавлением Tween-20 (нестерильно с использованием встряхивателя

(190 об/мин)); далее в ламинар-боксе: 1 мин – 70%-ный этанол, 15 мин – 33%-ная перекись водорода, 5 мин – промывка стерильной дистиллированной водой, что позволяет получить стерильные жизнеспособные экспланты сортов Вилия (15,11 %), Завея (4,11 %), Белорусская поздняя (22,70 %), Купала (6,67 %), Просто Мария (7,05 %), Спакуса (22,91 %), Талгарская красавица (45,76 %), Ясачка (8,33 %).

Сорт Кудесница целесообразно вводить в культуру *in vitro* в период полного покоя с применением более жесткой схемы стерилизации: 60 мин – 0,5%-ный Оксихом с добавлением Tween-20 (нестерильно с использованием встряхивателя (190 об/мин)); далее в ламинар-боксе: 1 мин – 70%-ный этанол, 7 мин – 0,1%-ная сулема, 5 мин (3 раза) – промывка стерильной дистиллированной водой, что позволяет получить 1,85 % стерильных активно регенерирующих эксплантов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Pear *in vitro* propagation using a double-phase culture system / R. Rodriguez, C. Diaz-Sala, L. Cuozzo, G. Ancora // HortScience. – 1991. – Vol. 26, № 1. – P. 62–64.
2. *In vitro* propagation and recovery of eight apple and two pear cultivars held in a germplasm bank / A. Lizárraga, M. Fraga, J. Ascasiábar, M. L. González // American Journal of Plant Sciences. – 2017. – Vol 8, № 9. – P. 2238–2254.
3. Baviera, J. A. Commercial *in vitro* micropropagation of pear cv. Conference / J. A. Baviera, J. L. García, M. Ibarra // Acta Horticulturae. – 1989. – Vol. 256. – P. 63–68.
4. Predieri, S. *In vitro* propagation of compact pear clones / S. Predieri, M. Govoni // Acta Horticulturae. – 1998. – Vol. 475. – P. 127–132.
5. Singha, S. Influence of agar concentration on *in vitro* shoot proliferation of *Malus* .sp. ‘Almey’ and *Pyrus communis* ‘Seckel’ / S. Singha // Journal of the American Society for Horticultural Science. – 1982. – Vol. 107, № 4. – P. 657–660.
6. *In vitro* propagation of Japanese pear cultivars / K. Banno, K. Yoshida, S. Hayashi, K. Tanabe // Journal Japanese Society Horticultural Science. – 1989. – Vol. 58, № 1. – P. 37–42.
7. Thakur, A. Micropropagation of ‘Wild Pear’ *Pyrus pyrifolia* (Burm. F.) Nakai. I. Explant establishment and shoot multiplication / A. Thakur, J. S. Kanwar // Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. – 2008. – Vol. 36, № 1. – P. 103–108.
8. Micropropagation in wild pear (*Pyrus syrica*) / R. A. Shibli, M. M. Ajlouni, A. Jaradat [et al.] // Scientia Horticulturae. – 1997. – Vol. 68. – P. 237–242.
9. Micropropagation of pear (*Pyrus* sp.) / B. M. Reed, J. DeNoma, S. Wada, J. Postman // Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants / ed.: M. Lambardi, E. Ozudogru, S. Jain. – New York : Humana Press, 2012. – Vol. 994. – P. 1–24. – DOI: 10.1007/978-1-62703-074-8_1.
10. Микроклональное размножение груши (*Pyrus communis* L.) *in vitro* / И. В. Бартиш, С. М. Меркулов, В. И. Корховой, В. П. Копань // Физиология и биохимия культурных растений. – 1994. – Т. 26, № 1. – С. 84–90.
11. Shen, X.-S. Propagation *in vitro* of pear, *Pyrus communis* L., cultivars ‘William’s Bon Chrétien’, ‘Packham’s Triumph’ and ‘Beurré Bosc’ / X.-S. Shen, M. G. Mullins // Scientia Horticulturae. – 1984. – Vol. 23. – P. 51–57.
12. Freire, I. C. G. Improved culture media for the *in vitro* establishment of pear from nodal cuttings / I. C. G. Freire, C. P. S. Coelho, M. T. F. Barros // Acta Horticulturae. – 2002. – Vol. 596. – P. 457–461.
13. Micropropagation and field evaluation of the pear (*Pyrus communis* L.) ‘IGE 2002’, a new selection of the cultivar Dr. Jules Guyot / I. Iglesias, P. Vilardell, J. Bonany [et al.] // Journal of the American Society for Horticultural Science. – 2004. – Vol. 129. – P. 389–393.
14. Bhojwani, S. S. *In vitro* propagation of *Pyrus pyrifolia* / S. S. Bhojwani, K. Mullins, D. Cohen // Scientia Horticulturae. – 1984. – Vol. 23. – P. 247–254.
15. Optimization of *in vitro* propagation of pear (*Pyrus communis* L.) ‘Pyrodwarf®(S)’ rootstock / B. Kaviani, A. Barandan, A. Tymoszuk, D. Kulus // Agronomy. – 2023. – Vol. 13, ref. 53. – P. 1–12.
16. Erig, A. C. *In vitro* establishment of pear (*Pyrus* spp.) starting from meristems and buds / A. C. Erig, G. R. Fortes // Ciência Rural. – 2002. – Vol. 32, № 4. – P. 577–582.
17. Etude comparative de l’aptitude a la micropropagation, par culture de meristems *in vitro*, du poirier cv. ‘Passe-Crassane’ adulte et de poiriers juveniles issus de semis de ‘Passe-Crassane’ / K. Al-Maarri, M. Duron, Y. Arnaud, E. Miginiac // Comptes Rendus de l’Académie d’Agriculture de France. – 1986. – Vol. 72, № 5. – P. 413–421.
18. Al-Maarri, K. Micropropagation of *Pyrus communis* cultivar ‘Passe Crassane’ seedlings and cultivar ‘Williams’: factors affecting root formation *in vitro* and *ex vitro* / K. Al-Maarri, Y. Arnaud, E. Miginiac // Scientia Horticulturae. – 1994. – Vol. 58. – P. 207–214.
19. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de cultivares de *Pyrus* spp. / A. C. Dantas, A. N. Nesi, L. B. Machado [et al.] // Revista Brasileira de Agrociencia. – 2002. – Vol. 8. – P. 19–23.
20. *In vitro* propagation of *Pyrus* shoot tips / T. Hirabayashi, T. Moriguchi, I. Kozaki [et al.] // Bulletin of the Fruit Tree Research Station. Series A. – 1987. – № 14. – P. 9–16.
21. Viseur, J. Micropropagation of pear, *Pyrus communis* L., in a double-phase culture medium / J. Viseur // Acta Horticulturae. – 1987. – Vol. 212. – P. 117–124.

22. Nicolodi, R. Micropropagation experiments with *Pyrus betuifolia* / R. Nicolodi, K. Pieber // Mitteilungen Klosterneuburg: Rebe und Wein, Obstbau und Früchteverwertung. – 1989. – Vol. 39, № 6. – S. 247–250.
23. Lane, W. D. Regeneration of pear plants from shoot meristem tips / W. D. Lane // Plant Science Letters. – 1979. – Vol. 16, № 2–3. – P. 337–342.
24. Stimart, D. P. *In vitro* shoot proliferation of *Pyrus calleryana* from vegetative buds / D. P. Stimart, J. F. Harbage // HortScience. – 1989. – Vol. 24, № 2. – P. 298–299.
25. Rossi, V. Propagation of *Pyrus calleryana* sel. D6 by *in vitro* culture / V. Rossi, G. De Paoli, P. Dal Pozzo // Acta Horticulturae. – 1991. – Vol. 300. – P. 145–148.
26. Yeo, D. Y. Micropropagation of three *Pyrus* rootstocks / D. Y. Yeo, B. M. Reed // HortScience. – 1995. – Vol. 30, № 3. – P. 620–623.
27. Effects of bud scales and gibberellins on dormancy of *in vitro* cultured Japanese pear leaf buds / T. Yotsuya, T. Ichii, M. Sawano [et al.] // Scientia Horticulturae. – 1984. – Vol. 24. – P. 177–184.
28. Dwivedi, S. K. *In vitro* propagation of low-chill pear cv. Gola / S. K. Dwivedi, L. D. Bist // Indian Journal of Horticulture. – 1999. – Vol. 56, № 3. – P. 189–193.
29. Cosac, A. C. *In vitro* propagation of some pear cultivars / A. C. Cosac, L. B. Fräsin, M. Isac // Acta Horticulturae. – 2008. – Vol. 800. – P. 447–452.
30. Мялик, М. Г. Клон груши Поздняя Белсад / М. Г. Мялик, О. А. Якимович // Интенсификация плодоводства Беларуси: традиции, достижения, перспективы : материалы междунар. науч. конф., посвящ. 85-летию Ин-та плодоводства, пос. Самохваловичи, 1 сент. – 1 окт. 2010 г. / НАН Беларуси, Ин-т плодоводства ; редкол.: В. А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2010. – С. 53–55.
31. Якимович, О. А. Новый сорт груши Вилия / О. А. Якимович // Плодоводство : сб. науч. тр. / НАН Беларуси, Ин-т плодоводства ; редкол.: В. А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2015. – Т. 27. – С. 80–86.
32. Якимович, О. А. Новый белорусский сорт груши Завея / О. А. Якимович, З. А. Козловская // Плодоводство : сб. науч. тр. / НАН Беларуси, Ин-т плодоводства ; редкол.: В. А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2016. – Т. 28. – С. 78–84.
33. Якимович, О. А. Новый сорт груши Купала / О. А. Якимович // Плодоводство : сб. науч. тр. / НАН Беларуси, Ин-т плодоводства ; редкол.: В. А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2014. – Т. 26. – С. 85–91.
34. Мялик, М. Г. Новый сорт груши Просто Мария / М. Г. Мялик, О. А. Якимович, М. П. Гарост // Плодоводство : сб. науч. тр. / НАН Беларуси, Ин-т плодоводства ; редкол.: В. А. Матвеев (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2007. – Т. 19. – С. 96–101.
35. Якимович, О. А. Новый белорусский сорт груши Спакуса / О. А. Якимович, Е. М. Мисюк // Плодоводство Беларуси: традиции и современность : материалы междунар. науч. конф., посвящ. 90-летию образования РУП «Ин-т плодоводства», аг. Самохваловичи, 13–16 окт. 2015 г. / НАН Беларуси, Ин-т плодоводства ; редкол.: В. А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2015. – С. 134–137.
36. Мялик, М. Г. Новый сорт груши Ясачка / М. Г. Мялик, О. А. Якимович // Плодоводство : сб. науч. тр. / Ин-т плодоводства НАН Беларуси ; редкол.: В. А. Матвеев (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2006. – Т. 18. – Ч. 1. – С. 21–23.
37. Мялик, М. Г. Новый сорт груши Кудесница / М. Г. Мялик, О. А. Якимович // Плодоводство : сб. науч. тр. / НАН Беларуси, Ин-т плодоводства ; редкол.: В. А. Матвеев (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2008. – Т. 20. – С. 121–127.
38. Якимович, О. А. Сорт груши Талгарская красавица в условиях Беларуси / О. А. Якимович // Плодоводство : сб. науч. тр. / НАН Беларуси, Ин-т плодоводства ; редкол.: А. А. Таранов (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2019. – Т. 31. – С. 49–54.
39. Марцинкевич, Т. Н. Предварительные результаты введения в культуру *in vitro* сортов груши / Т. Н. Марцинкевич, Е. В. Колбанова // Плодоводство : сб. науч. тр. / НАН Беларуси, Ин-т плодоводства ; редкол.: В. А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2018. – Т. 30. – С. 52–55.

INTRODUCTION OF ZONED PEAR CULTIVARS INTO *IN VITRO* CULTURE IN THE REPUBLIC OF BELARUS

E. V. KOLBANOVA, N. V. KUKHARCHIK, T. N. BOZHIDAI

Abstract

Sterile and viable explants were obtained from nine pear cultivars zoned in the Republic of Belarus, including eight Belarusian-bred cultivars: Belorusskaya Pozdnaya, Viliya, Zaveya, Kupala, Prosto Maria, Spakusa, Yasachka (*P. communis* × *P. × ussuriensis*), Kudesnitsa (*P. communis* × *P. × pyrifolia*), and one introduced cultivar–Talgarskaya Krasavitsa (*P. communis* × *P. × pyrifolia*). It is advisable to initiate *in vitro* culture during the periods of full dormancy (Viliya, Zaveya) or forced dormancy (Belorusskaya Pozdnaya, Kupala, Prosto Maria, Spakusa, Talgarskaya Krasavitsa, Yasachka), using the following sterilization protocol: 60 minutes in 0.5 % Oxychom with Tween-20 (non-sterile, using a shaker at 190 rpm); then, under a laminar flow hood: 1 minute in 70 % ethanol, 15 minutes in 33 % hydrogen peroxide, and 5 minutes rinsing in sterile distilled water. For the cultivar Kudesnitsa, it is recommended to initiate *in vitro* culture during full dormancy using a stricter sterilization protocol: 60 minutes in 0.5 % Oxychom with Tween-20 (non-sterile, using a shaker at 190 rpm); then, under a laminar flow hood: 1 minute in 70 % ethanol, 7 minutes in 0.1 % mercuric chloride, and three 5-minute rinses in sterile distilled water.

Keywords: *Pyrus*, *in vitro* culture, sterilization, initiation period, Belarus.

Поступила в редакцию 23.01.2025