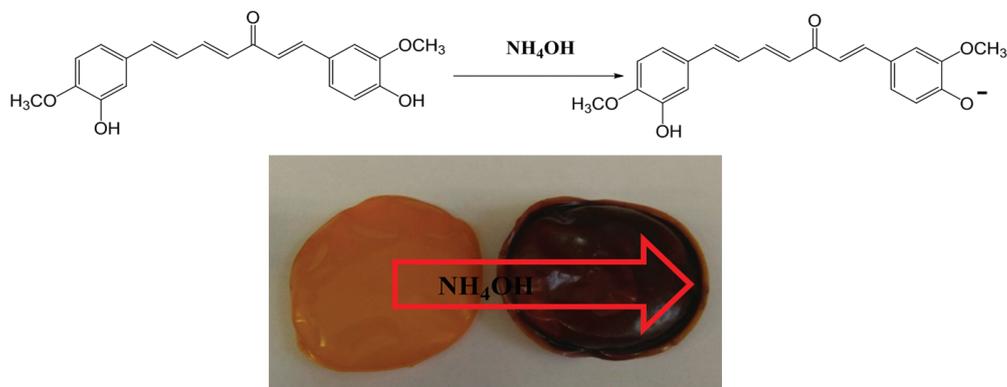


Таким образом, полученные пленки могут быть предложены для использования в медицине, в частности в хирургии для лечения ран, ожогов, повреждений в качестве минимально травматичных, биосовместимых и биоразстворимых, антимикробных повязок для поврежденной кожи, а также для производства маркеров, чувствительных к опасным газам (аммиак), который выделяется, например, при порче рыбы. При обработке парами аммиака пленки изменяют свои оптические параметры, что делает их перспективными для производства гибких газовых сенсорных пленок, в том числе, пригодных для индикации качества продуктов питания («умная упаковка»).



ЛИТЕРАТУРА

1. Черная А.И., Шульга О.С., Арсеньева Л.Ю., Кобилинский С.М. Упаковочные биодеградируемые пленки на основе поливинилового спирта. / Упаковка. – № 6. – 2016. – С. 32–35.
2. Bagchi, A.; He, T. Intelligent Sensing and Packaging of Foods for Enhancement of Shelf life : Concepts and Applications. *Int. J. Sci. Eng. Res.* 2012, 3, 1–13.
3. Толстов А.Л., Маланчук О.Н., Бей И.Н., Климчук Д.А. Получение и свойства антибактериальных полимерных композитов на основе поливинилового спирта и наночастиц серебра. / Полімер. журн. – 2013. –Т. 35 (№ 4). – С. 343–349.
4. Бесчастнов В.В., Юданова Т.Н., Арефьев И.Ю., Чернышев С.Н., Погодин И.Е., Павленко И.В., Тулупов А.А., Леонтьев А.Е. Возможности использования гидрогелевых композиций в лечении ран. / Московский Хирургический Журнал. – 2019. - Т. 6 (70). - С. 18-21.
5. Іщенко О.В., Ресницький І.В., Коляда М.К., Ляшок І.О., Шинкарьова К.В., Швидка К.М. Плівки медичного призначення на основі природних полімерів. /О.В. Іщенко. Вісник Київського національного університету технологій та дизайну. Серія Технічні науки. – 2017. – № 1 (106). – С. 76–86.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕГЕНЕРАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ ЭКСПЛАНТОВ ВИНОГРАДА СОРТА MARQUETTE НА ЭТАПЕ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ IN VITRO И СТАБИЛИЗАЦИИ СТЕРИЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ

EFFICIENCY OF REGENERATION PROCESSES OF EXPLANTS OF GRAPE VARIETY MARQUETTE AT THE INTRODUCTION STAGE IN VITRO CULTURE AND STABILIZATION OF STERILE CULTURE

Д. Д. Шикунец^{1,2}, Т. А. Красинская^{1,2,3}
D. D. Shikunets^{1,2}, T. A. Krasinskaya^{1,2,3}

¹Белорусский государственный университет, БГУ, г. Минск, Республика Беларусь

²Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, г. Минск, Республика Беларусь

gebeg@iseu.by, dasha.shy@mail.ru

³РУП «Институт плодородства»

krasinskaya@tut.by

¹Belarusian State University, BSU, Minsk, Republic of Belarus

²International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

³RUE “Institute for Fruit Growing”

Растения-регенеранты сорта Marquette, полученные в ходе исследований, были включены в коллекцию генобанка РУП «Институт пловодства», содержащуюся в условиях *in vitro*. Применение для зеленых междоузлий винограда стерилизующей схемы, включающей 30 % H₂O₂ экспозицией 7 минут и культивирование их на модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга, содержащей 1,1 мг/л 6-БА – дали максимальную долю стерильных и жизнеспособных эксплантов (85,0 %).

Отмечалось достоверное поствливание на стабилизационные процессы растений-регенерантов при дальнейшем культивировании: растения-регенеранты сорта Marquette, введение эксплантов которых проводили на среде MS, содержащей 1,1 мг/л 6-БА, с использованием 30% H₂O₂ экспозицией 7 минут, обладали большим потенциалом к закладке новых микрорастений (коэффициент размножения составил 3,15) и меньшей долей каллусообразования у основания растений (18,0%).

The regenerative plants of the Marquette variety, obtained during the research, were included in the collection of the genebank of the RUE «Institute of Fruit Growing», kept under *in vitro* conditions. The use of a sterilizing scheme for green internodes of grapes, including 30% hydrogen peroxide with an exposure of 7 minutes and their cultivation on a modified Murashige-Skoog nutrient medium containing 1.1 mg/l 6-BA, gave the maximum proportion of sterile and viable explants (85.0%).

A significant aftereffect on the stabilization processes of regenerated plants during further cultivation was noted: regenerated plants of the Marquette variety, the introduction of explants of which was carried out on MS medium containing 1.1 mg/l 6-BA, using 30% H₂O₂ with an exposure of 7 minutes, had a great potential to the laying of new microplants (multiplication factor was 3.15) and a smaller share of callus formation at the base of plants (18.0%).

Ключевые слова: Vitis L., эксплант, питательная среда, этап введения, культура *in vitro*.

Keywords: Vitis L., explant, nutrient medium, initiation stage, *in vitro* culture.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2022-1-282-285>

Сохранение генетических ресурсов – стратегическая задача, которая обеспечивает продовольственную безопасность стран. Коллекции плодовых, ягодных, орехоплодных культур и винограда в 2012 году объявлена национальным достоянием, и по составу культур и видов не имеют аналогов в Беларуси. Существует два основных способа сохранения ресурсов растений: *in situ* (сохранение в традиционных условиях произрастания: лес, луг и т. д.) и *ex situ* (сохранение за пределами традиционных условий произрастания, в искусственных условиях), которые обладают как рядом преимуществ, так и некоторыми недостатками. Коллекционные фонды в Институте пловодства сохраняются в живом виде (в условиях *in situ*), по 3-6 растений каждого образца, виноград в данной коллекции составляет 512 образцов. Создание дуплетной коллекции генетических ресурсов винограда в условиях *in vitro* (*ex situ*) первостепенная задача в Беларуси. В коллекции *ex situ* можно содержать сорта, имеющие ценные хозяйственно биологические признаки, необходимые для селекционных процессов, но чувствительные к абиотическим и биотическим факторам окружающей среды. Поэтому к концу 2021 года коллекция геноресурсов РУП «Институт пловодства» в условиях *in vitro* содержала три сорта винограда: Илья, Regent и Marquette. Последний сорт являлся объектом данного исследования.

Актуальность исследования продиктована необходимостью получения стерильных и жизнеспособных растений-регенерантов сорта Marquette, которыми дополнили генетический банк ресурсов культурных растений в условиях *in vitro*. Кроме того, в процессе исследований были оптимизированы схема стерилизации эксплантов винограда, гормональный состав питательных сред для активной их регенерации.

Этап введения в культуру *in vitro* является критическим этапом. В зависимости от генотипа растений необходимо определяться с составом питательной среды. Большинство исследователей использовали модифицированную питательную среду Мурасиге и Скуга (MS), которая содержит много неорганического азота с различным набором витаминов и их концентраций [1-3], среда Chee et. al. – C₂D [4].

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) – 1,0 мг/л, нафтилуксусная кислота (НУК) – 0,09 мг/л

Из группы цитокининов: 6-бензиламинопури (6-БАП) – 0,1–5,0 мг/л, кинетин до 1,0 мг/л,

Из группы гиббереллинов: гибберелловая кислота (ГК₃) – 0,5–2,0 [1–5].

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

Объект исследования – сорт Marquette – новый перспективный красновинный сорт винограда. Гибрид *Vitis riparia*, *V. vinifera* и другие виды *Vitis* x *V. vinifera*). Обладает выдающейся морозостойкостью – 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.

Маточные растения были свободны от основных сокопереносимых вирусов, характерных для винограда (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GFLV и GFkV) и содержались в условиях с закрытой корневой системы.

Срок введения эксплантов в культуру *in vitro* – март. Экспланты винограда выделяли из однолетних зеленых черенков в период начала вегетационного периода растений. В качестве эксплантов использовали междоузлия растений.

Работа проводилась в стерильных условиях ламинарного бокса. Стерилизацию эксплантов проводили по двум схемам.

1 схема. *Нестерильные условия*: промывка черенков проточной водопроводной водой. *Стерильные условия*: 70 % спирт этиловый (1 мин), 30 % перекись водорода (H₂O₂) – 7 мин, трехкратная промывка стерильной дистиллированной водой по 5 мин.

2 схема стерилизации. *Нестерильные условия*: промывка черенков проточной водопроводной водой. *Стерильные условия*: 70 % спирт этиловый (1 мин), 30 % перекись водорода (H₂O₂) – 10 мин, трехкратная промывка стерильной дистиллированной водой по 5 мин.

Питательные среды. Среда №1 – модифицированная среда Мурасиге – Скуга (MS), содержащая макро- и микросоли по прописи MS, 1,1 мг/л 6-БА (6-бензиладенин), pH = 5,7.

Среда №2 – модифицированная среда Мурасиге – Скуга (MS), с содержащая макро- и микросоли по прописи MS, 0,5 мг/л 6-БА, 0,1 мг/л ИМК (индолилмасляная кислота), 0,1 мг/л ГК (гибберелловая кислота) с добавлением PVP (поливинилпирролидон) и измельченных таблеток нистатина, pH = 5,7.

Стабилизационный этап проводили на питательной среде №1, длительность культивирования 21 день.

Условия культивирования растений в условиях *in vitro*: освещение 2,5 – 3 тыс. люкс, 0+25...+26 °С, фото-период 16/8 часов. Длительность субкультивирования – 14 дней. Повторность опыта трехкратная, количество эксплантов на повторность – 6-7.

Показателями эффективности процесса стабилизации эксплантов в стерильных условиях являлись: доля инфицированных эксплантов, %, доля некротизированных эксплантов, %, доля каллусообразования, %, доля не развившихся эксплантов, %, доля нормально развитых стерильных эксплантов, %.

В ходе исследований было отмечено, что выбранные схемы стерилизации эффективно удаляли всю сапрофитную инфекцию (таблица 1). Однако высокая экспозиция перекиси водорода (10 мин) вызывала не только гибель грибной и бактериальной инфекции, но и некроз живых тканей - доля некротизированных эксплантов варьировала от 45 до 60 % в зависимости от среды культивирования. В то время как при стерилизации H₂O₂ в течении 7 минут доля некротизированных эксплантов была намного меньше, она варьировала от 15 до 38 % в зависимости от среды культивирования. При данной схеме стерилизации, на среде MS2 были отмечены 14,3 % эксплантов с фенольными выделениями. Фенольные соединения, являются негативным явлением на этапе введения в культуру *in vitro*, так как могут сдерживать рост и развитие эксплантов и вызывать их гибель.

В ходе эксперимента было выяснено, что оптимальное время стерилизации H₂O₂ составило 7 минут, так как при такой схеме стерилизации доля жизнеспособных и стерильных эксплантов была наиболее высокая и составила 66,3 % (таблица 1).

Таблица 1 – Эффективность схем стерилизации и гормонального состава сред на этапе введения эксплантов винограда *Marquette*

Схема стерилизации (фактор А)	Среда (фактор В)	Количество посаженных эксплантов, шт.	Доля инфицированных эксплантов, %	Доля некротизированных эксплантов, %	Доля эксплантов с фенольными выделениями, %	Доля стерильных и жизнеспособных эксплантов, %
Схема 1. 7 мин H ₂ O ₂	Среда 1	20	0	15,0	0	85,0
	Среда 2	21	0	38,1	14,3	47,6
Схема 2. 10 мин H ₂ O ₂	Среда 1	20	0	60,0	0	40,0
	Среда 2	20	0	45,0	0	55,0
Среднее по фактору А						
Схема 1		41	0	26,6b	7,2a	66,3a
Схема 2		40	0	52,5a	0b	47,5b
Среднее по фактору В						
Среда 1		40	0	37,5	0	62,5a
Среда 2		41	0	41,6	7,2	51,3b

При стерилизации H₂O₂ экспозицией 10 минут доля стерильных и жизнеспособных эксплантов варьировала от 40 до 55 %.

Анализируя эффективность развития эксплантов на питательных средах с различным гормональным составом, отмечаем, что на среде 1, содержащей в качестве гормона только 6-БА в концентрации 1,1 мг/л, доля жизнеспособных и стерильных эксплантов была наиболее высокая и составила 66,3 %.

неспособных эксплантов составила в среднем по всем опытам 62,5 %, что на 11,2 % достоверно больше, чем на среде, содержащей комплекс гормонов (таблица 1).

Таким образом, стерилизация эксплантов, используя Схему 1, в течение 7 минут 30 % перекисью водорода и культивирование на питательной среде 1, содержащей 1,1 мг/л 6-БА – дали максимальный выход стерильных и жизнеспособных эксплантов (85 %).

Добавление нистатина в питательную среду достоверно не влияло на долю инфицированных эксплантов: инфицированные экспланты отсутствовали на всех вариантах опытов.

На этапе стабилизации отмечалось последствие условий введения в культуру *in vitro* эксплантов винограда (таблица 2). Статистическая обработка позволила отметить, что комплексное воздействие гормонального состава сред и схем стерилизации достоверно оказывало влияние на эффективность закладки и развития новых растений (коэффициент размножения) и долю каллусообразования. Витрификация растений-регенерантов достоверно не зависела от условий этапа введения. Растения-регенеранты сорта Marquette, введение эксплантов которых проводили на среде 1 с использованием 30% H₂O₂ экспозицией 7 минут, обладали большим потенциалом к закладке новых микрорастений (коэффициент размножения составил 3,15) и меньшей долей каллусообразования у основания растений (18,0%).

Таблица 2 – Стабилизация эксплантов винограда сорта Marquette на 1 пассаже на питательной среде MS, содержащая 1,1 мг/л 6-БА

Питательная среда и время стерилизации на этапе введения	Коэффициент размножения	Доля витрификации, %	Доля каллуса, %
	P<0,000	P< 0,347	P< 0,006
Среда 1 + Схема 1	3,15a	39,3	18,0b
Среда 1 + Схема 2	2,0c	8,3	83,3 ab
Среда 2 + Схема 1	2,9 b	20	71,6a
Среда 2 + Схема 2	2,7b	11,1	88,9a

Таким образом, выяснено, что оптимальной схемой стерилизации междоузлий сорта винограда Marquette в начале вегетационного периода, являлась схема, включающая 30 % H₂O₂ экспозицией 7 минут. При такой схеме стерилизации доля жизнеспособных и стерильных эксплантов была наиболее высокая и составила 66,3 %. Применение для зеленых междоузлий винограда стерилизующей схемы, включающей 30 % перекись водорода экспозицией 7 минут и культивирование их на модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга, содержащей 1,1 мг/л 6-БА – дали максимальную долю стерильных и жизнеспособных эксплантов (85,0 %).

Добавление нистатина в питательную среду достоверно не влияло на долю инфицированных эксплантов: инфицированные экспланты отсутствовали на всех вариантах опытов.

Отмечалось достоверное влияние на стабилизационные процессы растений-регенерантов при дальнейшем культивировании: растения-регенеранты сорта Marquette, введение эксплантов которых проводили на среде 1 с использованием 30 % H₂O₂ экспозицией 7 минут, обладали большим потенциалом к закладке новых микрорастений (коэффициент размножения составил 3,15) и меньшей долей каллусообразования у основания растений (18,0 %).

Растения-регенеранты сорта Marquette, полученные в ходе исследований, были включены в коллекцию генобанка РУП «Институт плодоводства», содержащуюся в условиях *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Preece J.E. The role of plant propagation at clonal genebanks / J.E. Preece // Acta Hort. – 2013. – Vol. 988. – P. 107–114.
2. Abido A.I.A. *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.
3. Bettoni J.C. *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.
4. Chee R.A method for large scale *in vitro* propagation of Vitis / R. Chee, R.M. Pool, D. Bucher // New York's Food and Life Sciences Bulletin. – 1984. – № 109. – P. 1–9.
5. Laso-Javalera M.F. 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.