

СТАБИЛИЗАЦИЯ ЭКСПЛАНТОВ СОРТА ВИНОГРАДА CHARDONNAY В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

STABILIZATION OF cv. CHARDONNAY GRAPE EXPLANTS IN *IN VITRO* CULTURE

М. Д. Марковская¹, Т. А. Красинская^{1,2}
M. Markovskaya, T. Krasinskaya

¹Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь

²РУП «Институт плодоводства» НАН Беларуси
г. Минск, Республика Беларусь
markovskaya.maria.d@gmail.com

¹International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU,
Minsk, Republic of Belarus

²RUE “Institute of Fruit Growing” National Academy of Sciences of Belarus
Minsk, Republic of Belarus

Маточные растения сорта Chardonnay, являющиеся источниками эксплантов для исследований, соответствовали стандартам ЕРРО и ЕАЭС. Выбранные условия культивирования на этапе введения в культуру *in vitro* способствовали получению высокой доли стерильных и жизнеспособных эксплантов (84,1 %). Доля инфицированных эксплантов составила 15,9 %. Показатели среднее количество развившихся растений-регенерантов из одного экспланта (1,7 %), длина растений-регенерантов (1,8 см) и среднее количество микрочеренков (2,36 шт) говорят о высокой эффективности этапа введения в культуру *in vitro* сорта винограда Chardonnay. На этапе микроразмножения максимальный коэффициент размножения растений-регенерантов составил 2,9 на модифицированной питательной среде MS с 1,1 мг/л 6-БА. Средняя длина стебля растений-регенерантов на средах, содержащих 0,9 и 1,1 мг/л, варьировала от 1,19 и 1,14 см соответственно.

The nuclear stock of the cv. Chardonnay, which were the source of explants for the research, complied with EPPO and EAEU standards. The selected cultivation conditions at the *in vitro* culture stage contributed to obtaining a high rate of sterile and viable explants (84.1 %). The rate of infected explants was 15.9 %. The average number of regenerants developed from an explant (1.7 %), the length of the regenerants (1.8 cm) and the average number of microcuttings (2.36) indicate a high efficiency of the *in vitro* propagation stage of cv. Chardonnay. At the micropropagation stage, the maximum multiplication rate of grape regenerants was 2.9 on modified MS medium containing 1.1 mg/L 6-BA. The mean stem length of the regenerants on media containing 0.9 and 1.1 mg/L was 1.19 and 1.14 cm, respectively.

Ключевые слова: Chardonnay, вирусы винограда, культура *in vitro*, стабилизация.

Keywords: Chardonnay, grape viruses, culture *in vitro*, stabilization.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2024-2-108-111>

Виноградарство в Беларуси – это достаточно молодое, но перспективное направление, связанное с импортозамещением как растительного, так и винного материала. На Пинщине и Гомельщине насчитывается около 70 гектаров промышленных плантаций технических сортов винограда, и весь собранный здесь урожай отправляется на винодельческий и ликёро-водочный заводы. Столовый виноград в основном выращивается на частных плантациях.

Одним из сдерживающих факторов развития виноградарства являются сокопереносимые вирусы, которые наносят большой экономический ущерб производителям из-за негативного воздействия на устойчивость к абиотическим и биотическим факторам, урожайность, качество ягод и их биохимический состав. Таким образом мониторинг сокопереносимых вирусов винограда в маточных насаждениях актуален для получения сертифицированного посадочного материала. Контроль вирусных заболеваний растений имеет решающее значение для создания питомников для производства саженцев винограда, дающих стабильный и высокий урожай [1]. Необходимый контроль посадочного материала объясняется еще одной причиной – привоз нового перспективного сортового ассортимента из-за пределов Республики Беларусь, который чаще всего не имеет фитосанитарного документа. Включение в селекционных процесс свободных от вирусов родительских форм винограда также весьма важно для развития виноградарства, снижая себестоимость получаемых перспективных гибридов.

Выделены **основные сокопереносимые вирусы** винограда, которые должны отсутствовать в посадочном материале: вирус короткоузлие винограда (*GFLV*), вирус скручивания листьев винограда (*GLRaV-1*, *GLRaV-2*,

GLRaV-3), вирус А винограда (*GVA*), вирус пятнистости винограда (*GFkV*), **карантинные вирусы винограда**: вирус кольцевой пятнистости табака (*TRSV*), вирус кольцевой пятнистости томата (*ToRSV*), вирус розеточной мозаики персика (*Peach rosette mosaic virus*). Согласно стандартам ЕРРО (European and Mediterranean Plant Protection Organization) по содержанию маточных насаждений, последние должны ретестироваться каждые 5 лет [2].

Tobacco ringspot nepovirus (*TRSV*), Tomato ringspot nepovirus (*ToRSV*) и Peach rosette mosaic virus (Вирус розеточной мозаики персика) – карантинные вирусы не только на территории Европы, но и на территории Евразийского Экономического Союза (ЕАЭС) [3]. Вредоносность вируса кольцевой пятнистости заключается в том, что растения часто перестают плодоносить уже на втором году после заражения, они чувствительны к холоду и в морозные зимы погибают. Вирус кольцевой пятнистости томата вызывает снижение силы виноградной лозы и задержку роста побегов. Зараженные растения очень чувствительны к повреждению холодом и могут давать небольшие гроздья винограда. Вирус розеточной мозаики персика способен заметно снизить урожайность и качества плодов.

Одним из быстрых методов получения оздоровленного материала сортов винограда – культура *in vitro*. Введение в культуру *in vitro* – первый этап микроклонального размножения. Задача данного этапа – получение максимального количества стерильных и жизнеспособных растений-регенерантов. 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, типом эксплантов, выбором стерилизующего агента и его экспозиции, минеральным и гормональным составом питательных сред и т. д. [4].

В РУП «Институт плодоводства» был проведён анализ эффективности этапа введения в культуру *in vitro* эксплантов винограда сортов Regent, Marquette, Mars, Bianca и Агат донской в период их активного роста. По результатам исследования было отмечено достоверное влияние генотипа на регенерационные процессы эксплантов: в зависимости от сорта процент стерильных и жизнеспособных эксплантов варьировал от 27,4 до 48,6 % [5]. Поэтому включение нового сорта винограда в коллекцию геноресурсов для сохранения генофонда и в производственный процесс получения оздоровленного посадочного материала, используя биотехнологические методы – актуальное направление для развития и продвижения виноградарства в Беларуси.

Цель данной работы – подобрать оптимальные условия культивирования сорта Chardonnay на этапах введения в культуру *in vitro* и микроразмножения для длительного сохранения его в стерильных условиях и для получения оздоровленного посадочного материала.

Задачи:

1. Оценить эффективность введения в культуру *in vitro* эксплантов Chardonnay в период активного роста маточных растений;

2. Оценить влияние различных концентраций 6-БА на морфогенез растений-регенерантов.

Объект исследования: свободный от основных и карантинных вирусов технический сорт Chardonnay

Общепринятая гипотеза происхождения, согласно анализу ДНК – это естественное скрещивание сортов *Vitis vinifera* “Gouais Blanc” и “Пино нуар”. Chardonnay был распространен во Франции, в Бургундии и Шампани, культивируется также в Германии, Швейцарии, Венгрии, США. По морфологическим признакам и биологическим свойствам Chardonnay относится к эколого-географической группе западноевропейских сортов винограда. Гроздь средней величины (длиной 11–13, шириной 8–10 см), цилиндро-коническая, плотная, средней плотности и рыхлая в результате сильного осыпания завязей. Ножка грозди короткая, одревесневшая. Масса грозди 90–95 г. Ягода средней величины (диаметром 12–16 мм), округлая и слегка овальная, зеленовато-белая с золотистым оттенком на солнечной стороне, покрыта восковым налетом и мелкими коричневыми точками. Средняя масса 100 ягод 130 г. Кожица тонкая, прочная. Мякоть сочная, с приятным сортовым ароматом. Семян в ягоде 2–3. Сорт популярен среди производителей по причине универсальности: клоны Chardonnay приспосабливаются к разным климатическим условиям и везде из него можно сделать достойное вино практически любого стиля. Помимо этого, Chardonnay входит в тройку сортов, разрешенных для производства шампанского.

Маточные насаждения с закрытой корневой системой были протестированы на следующие вирусы: вирус короткоузлия винограда, вирус скручивания листьев винограда, вирус А винограда, вирус пятнистости винограда, вирус кольцевой пятнистости табака, вирус кольцевой пятнистости томата, вирус розеточной мозаики персика с помощью диагностических наборов фирмы SEDIAG (Франция) и Bioreba (Швейцария) согласно протоколу производителя.

Этап введения в культуру *in vitro*. Сроки введения: период активного роста (июнь). Тип экспланта – узел (почка с кусочком стебля).

Схема стерилизации:

– Промывка черенков проточной водой с использованием хозяйственного мыла;

– Фунгицид с действующим веществом дифенокозол (концентрация 16,7 г/л) (раствор с дистиллированной водой 3 мл/л) – 1 час 10 мин;

– Промывка проточной водой – 40 мин;

– 70 % этиловый спирт – 1 мин;

– Раствор «Domestos» (действующее вещество – гипохлорит натрия) с дистиллированной водой (v/v) 1:5 – 20 мин;

– Трёхкратная промывка стерильной дистиллированной водой по 5 мин.

Питательная среда: модифицированная среда Мурасиге-Скуга (MS) с концентрацией 6-БА 1,1 мг/л.

Длительность культивирования: 24 дня.

Этап микроразмножения. Питательная среда: модифицированная среда MS с различной концентрацией 6-БА: 0,5, 0,7, 0,9, 1,1 мг/л. Культивирование проводили в пробирках, с объемом среды 6 мл.

Длительность культивирования: 32 дня.

Работу в асептических условиях, приготовление и стерилизацию питательных сред проводили по общепринятым методикам.

Условия культивирования – фотопериод 16/8 ч, температура 23–25 °С, освещение 3000–3500 лк (лампы OSRAM L36W/765 Cool Daylight).

Опыты проводили в 3-кратной повторности, по 10–15 растений в повторности в зависимости от опыта.

Статистическую обработку проводили в программе Statistica 10.0. Однофакторный анализ проводили с помощью ANOVA, для сравнения средних значений использовали критерий Дункана.

Эффективность этапа введения в культуру *in vitro*. Выбранные условия культивирования способствовали получению высокой доли стерильных и жизнеспособных эксплантов – 84,1 % (табл. 1). Доля инфицированных эксплантов составила 15,9 %, что является достаточно невысоким значением. Среднее количество растений-регенерантов, развивающихся из одного экспланта, и их средняя длина, составила 1,7 шт. и 1,8 см соответственно. Растения-регенеранты с такими показателями возможно было черенковать в ламинарном боксе. В результате чего количество микрочеренков размером примерно 1 см, полученных при черенковании, составило 2,36, что в два раза увеличивает эффективность этапа микроразмножения. Следовательно, выбранная схема стерилизации и питательная среда оптимальна для получения стерильных и хорошо развитых эксплантов.

Таблица 1

*Эффективность введения в культуру *in vitro* сорта винограда Chardonnay*

Доля инфицированных эксплантов, %	Доля неразвитых эксплантов, %	Доля стерильных и жизнеспособных эксплантов, %	Среднее количество растений-регенерантов, развившихся из экспланта, шт.	Средняя длина растений-регенерантов, см	Среднее количество микрочеренков, шт.
15,9	0,0	84,1	1,7	1,8	2,36

Эффективность этапа микроразмножения. В ходе статистического анализа с высокой степенью достоверности было установлено, что концентрация 6-БА определяла значения всех изучаемых показателей ($p < 0,001$) (табл. 2). Максимальный коэффициент размножения на этапе микроразмножения отмечен при использовании 6-БА в концентрации 1, 1 мг/л и составил 2,9. Максимальное значение средней длины стебля растений-регенерантов отмечены при использовании 6-БА в концентрации 0,9 и 1,1 мг/л: 1,19 и 1,14 см соответственно.

Таблица 2

Влияние 6-БА на эффективность этапа микроразмножения сорта винограда Chardonnay

Концентрация 6-БА, мг/л	Коэффициент размножения	Средняя длина стебля растений-регенерантов, см
	$p < 0,001$	$p < 0,001$
0,5	1,5с	0,82с
0,7	1,3d	0,98bc
0,9	2,0b	1,19a
1,1	2,9a	1,14ab

Таким образом, в процессе исследования согласно стандартам ЕРРО и ЕАЭС были выделены маточные растения сорта Chardonnay свободные от основных и карантинных сокопереносимых вирусов винограда (вирус короткоузлие винограда, вирус скручивания листьев винограда – 1,2,3, вирус А винограда, вирус пятнистости винограда, вирус кольцевой пятнистости табака, вирус кольцевой пятнистости томата, вирус розеточной мозаики персика).

На этапе введения в культуру *in vitro* использование модифицированной питательной среды MS, содержащей 1,1 мг/л 6-БА, эффективно для получения высокой доли стерильных и жизнеспособных эксплантов (84,1 %). Низкая доля инфицированных эксплантов (15,9 %) свидетельствует об эффективном ингибировании грибной и бактериальной инфекций комплексом стерилизующих агентов фунгицида (дифеноконозол) и раствором «Domestos», который является экономически выгодным в использовании. Высокую эффективность этапа введения в культуру *in vitro* сорта винограда Chardonnay характеризуют показатели среднего количества развившихся растений-регенерантов (1,7 %), длины растений-регенерантов (1,8 см) и среднего количество микрочеренков (2,36 шт)

На этапе микроразмножения концентрация 6-БА достоверное влияние оказывала на коэффициент размножения и рост растений-регенерантов. 1,1 мг/л 6-БА в питательной среде активизировал геммогенез и коэффициент размножения составил 2,9. Средняя длина стебля растений-регенерантов на средах, содержащих 0,9 и 1,1 мг/л, варьировала от 1,19 и 1,14 см соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Krasinskaya T. Grape viruses in Belarus / T. Krasinskaya, E. Kolbanova // Acta Hort. 2017. 1188. P. 307–312.
2. European and Mediterranean Plant Protection Organization. [Электронный ресурс] // EPPO standards. – Режим доступа: http://www.eppo.int/RESOURCES/eppo_standards. – Дата доступа: 19.02.2024.
3. Об утверждении Единых карантинных фитосанитарных требований, предъявляемых к подкарантинной продукции и подкарантинным объектам на таможенной границе и на таможенной территории Евразийского экономического союза [Электронный ресурс] : решение Совета ЕЭК, 30 нояб. 2016 г., № 157 // Совет Евразийской экономической комиссии. – Режим доступа: <https://gogiskzr.by/quarantine/normative-base/Edinye-fito-trebovaniya-30112016-157-03042023.pdf>. – Дата доступа: 19.02.2024.
4. Змушко А.А. Введение в культуру *in vitro* винограда – критический этап клонального микроразмножения растений / А.А. Змушко, Т.А. Красинская // Плодоводство. 2022. 34. 1. С. 228–234.
5. Кухарчик Н.В. Размножение плодовых, ягодных растений, винограда и хмеля в культуре *in vitro* / Н.В. Кухарчик [и др.] ; под общ. ред. Н.В. Кухарчик. – Минск : Колорград. 2021. – 400 с.

РОЛЬ СРЕДОВЫХ ФАКТОРОВ В ЖИЗНЕННОМ ЦИКЛЕ ПРЕСНОВОДНЫХ ЛЕГОЧНЫХ МОЛЛЮСКОВ ROLE OF ENVIRONMENTAL FACTORS IN THE LIFE CYCLE FRESHWATER PULMONARY MOLLUSCS

А. В. Лукашонок^{1,2}, Д. С. Ляшук^{1,2}, О. А. Бодиловская³
A. V. Lukashonok^{1,2}, D. S. Lyashuk^{1,2}, O. A. Bodilovskaya³

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

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

Легочные моллюски, обитающие в пресноводных водоемах, играют важную роль в экосистемах и используются как биоиндикаторы состояния окружающей среды. Жизненный цикл этих моллюсков, включая способность к размножению, зависит от различных факторов, таких как температура, освещенность, питание и паразитарная инвазия. Понимание их влияния на популяции пульмонат важно для получения достоверных данных экологических исследований и мониторинга состояния водных экосистем.

Lung mollusks living in freshwater bodies play an important role in ecosystems and are used as bioindicators of environmental conditions. The life cycle of these mollusks, including the ability to reproduce, depends on various factors such as temperature, light, nutrition and parasitic infestation. Understanding their impact on pulmonata populations is important for obtaining reliable data from ecological studies and monitoring the state of aquatic ecosystems.

Ключевые слова: легочные моллюски, оплодотворение, факторы.

Keywords: pulmonary mollusks, fertilization, factors.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2024-2-111-117>

Вследствие быстрого увеличения человеческого воздействия происходит изменение биоты водных экосистем, что приводит к уменьшению популяций и исчезновению многих видов животных. Легочные моллюски (лат. Pulmonata) – одна из самых распространенных групп зообентоса в экосистемах пресных водоемов умеренной зоны Евразии. Они имеют высокие адаптивные способности и успешно приспосабливаются к изменяющимся условиям окружающей среды. Это обусловлено способностью пульмонат переходить с перекрестного оплодотворения на альтернативную форму размножения – самооплодотворение.

Многие виды легочных моллюсков активно используются в качестве биоиндикаторов состояния среды и являются модельными видами при проведении широкого спектра экофизиологических, токсикологических и мониторинговых исследований.

Часто получение необходимого количества особей тех или иных видов для проведения лабораторных экспериментов бывает затруднительно или даже вообще невозможно. При этом не редко возникают ситуации, когда при проведении исследований с организмами, отобранными из природных водоемов, последние испытывают