

15. Симеонов И. Клонова селекція при лозовите сортове Димят и Мискет врачански: дисертация за придобиване на образователна и научна степен Доктор / И. Симеонов. – Плевен, 2014. - 231 с.
16. Симеонов И. Вътресортово разнообразие при сорт Мискет Отонел / И. Симеонов, З. Наков, М. Иванов // Растениевъдни науки. – 2015. - Год. ЛП, №2. – Р. 34-39.
17. Райониране на лозарството в България / К. Стоев и др. // Научни трудове ЦНИИЛВ. Т.3. С. – София: Земиздат, 1960. - 167 с.

*I. N. Simeonov, M. N. Ivanov, Z. H. Nakov*

### **The Institute of Wine (Pleven, Bulgaria) breeding results**

*A brief overview of the research work in the field of grape breeding at the Institute of Wine, Pleven. The main achievements in hybridization, clonal selection and grape introduction.*

*Ampelographic peculiarities of presented interspecific varieties and hybrids make them suitable for the cultivation of biological grapes and wine production in all wine-growing areas of the country.*

**Keywords:** grapes, breeding, table and wine varieties, clones.

**УДК 834.835:631.532.3**

*Н. І. Теслюк, канд. с-г. наук,  
Національний науковий центр  
“Інститут виноградарства та виноробства ім. В. Є. Таїрова”  
Україна*

### **НАПІВРІДКІ ПОЖИВНІ СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ КУЛЬТУРИ ПИЛЯКІВ ВИНОГРАДУ IN VITRO**

*Досліджено можливість одержання продуктивних ембріогенних калюсів із пиляків винограду in vitro. Для цього вивчено та виявлено особливості впливу температури (+4 °С) на початкових етапах культивування експлантів пиляків в культурі in vitro, встановлено оптимальне поживне середовище. Вперше досліджували вплив концентрації агару, консистенції поживного середовища на приживлюваність та регенераційну здібність пиляків винограду in vitro. Встановлено перевагу напіврідкого поживного середовища Уайта із додаванням 2 мг/л 6-БАП.*

**Ключові слова:** пиляки винограду, культура in vitro, фітогормони, напіврідкі поживні середовища, калюсогенез, ембріогенез.

Дослідження з культури пиляків винограду in vitro викликають безперечний інтерес для селекції. Виноградна рослина являє собою складний гетерозиготний організм. Гаплоїди і гомозиготні диплоїди, одержані з культури пиляків, мають значення для генетичного аналізу та покращення продукції [1]. Андрогенез in vitro дозволяє одержати анеуплоїди з багатьох сортів, що є важливим для генетики виду, а також життєздатні анеуплоїди, які не були відомі раніше [2].

Роботи авторів [3, 4] свідчать про те, що для культури винограду в принципі є

можливим одержання дігаплоїдів у пиляковій культурі. Вперше це було показано у Gresshoff R., Douy C. [3]. Японські дослідники Hirabayashi та ін. [5] одержали калюс (нез'ясованої плідності) при культивуванні пиляків *V. thunbergii* і шляхом зміни середовищ та умов вирощування визвали утворення пагонів і корінців. В більш пізніх роботах ці автори [4, 5] повідомляють про одержання рослин з 7 сортів *V. vinifera*, а також з декількох гібридів і видів шляхом соматичного ембріогенезу з калюсів пилякового походження.

Результати з індукування калюсо- і морфогенезу наведені в роботах Mauro et al. [6], Stamp and Meredith [7], Lebrun et al. [8].

В наш час практично не вивчено вплив знижених позитивних температур на приживлюваність та регенераційні властивості винограду в культурі *in vitro*. Хоча в роботах Rajasekaran, Mullins [9], Takeno та ін.[10] було доведено, що передобробка та початкове культивування експлантів пиляків при + 4 °C суттєво підвищує ембріогенні можливості тканини.

Аналіз літературних джерел свідчить, що необхідно підвищити ефективність біотехнології одержання рослин-регенерантів винограду *in vitro*, розширити можливості управління окремими етапами індукції ембріодів та їх подальшого розвитку.

Нами [11], із співавторами [12] в попередніх роботах, було запропоновано для культури пиляків *in vitro* використовувати поживне середовище Уайта. Також досліджували вплив знижених позитивних температур на процеси приживлюваності та калюсогенезу ініціальних експлантів пиляків при тривалому культивуванні *in vitro*.

**Метою** даного дослідження було питання підбору та створення оптимальних умов культивування пиляків винограду *in vitro*, використання різних прийомів для індукції калюсогенезу та ембріодогенезу.

Зазвичай, культивування пиляків винограду *in vitro* проводили на твердих або інколи на рідких поживних середовищах. В даному дослідженні нами **вперше** було вивчено вплив концентрації агару, фітогормонів в поживному середовищі на приживлюваність експлантів та регенераційні здібності винограду в культурі *in vitro* і було використано напіврідкі середовища (4 г/л агару).

#### **Матеріали і методи досліджень**

Дослідження проводили в лабораторії культури тканин відділу розсадництва та розмноження винограду ННЦ "ІВіВ ім. В.Є. Таїрова" на сортах винограду Добриня, Ідилія мускатна, Комета. Планування роботи та відбір вихідного матеріалу з кущів-донорів, які ростуть на селекційній ділянці ННЦ "ІВіВ ім. В. Є. Таїрова" проводили спільно з співробітниками відділу селекції.

Матеріалом для роботи були суцвіття, із яких виділяли пиляки і вводили в культуру *in vitro*. Квіткові бутони дослідних сортів ізолювали на початку періоду цвітіння, зранку та видержували їх при зниженій температурі (+4 °C) темряві на протязі 6-7 днів. Бутони стерилізували по схемі, що була розроблена нами в процесі попередніх досліджень [12].

Роботи по введенню пиляків в культуру *in vitro* проводились в стерильних умовах ламінар-боксу. Із бутонів виділяли пиляки біло-жовтого (молочного) кольору. Від пиляків відділяли філамент і висаджували на експериментальні поживні середовища в чашки Петрі та культуральні стаканчики.

В попередніх дослідженнях ми випробовували різні варіанти середовищ: Мурасіге та Скуга (МС), Уайта, Ніча і Ніч, Гамборга. Нами було встановлено оптимальність поживного середовища Уайта та його позитивний вплив на основні процеси культури пиляків винограду *in vitro* [13]. Тому в даному дослідженні ми використовували різні модифікації поживного середовища Уайта. За прописом готували сольовий склад середовищ. Ми вивчали вплив концентрації агару в різних поживних середовищах, їх консистенції на показники приживлюваності, росту та розвитку ініціальних експлантів і вперше для культури пиляків винограду *in vitro* було використано напіврідкі середовища (4 г/л агару).

У поживні середовища додавали:

*Варіант 1:*

+1 мг/л 6-бензиламінопурину (6-БАП), 1 мг/л гібберелової кислоти (ГК), 8г/л агару – тверде середовище;

+1 мг/л 6-БАП, 1 мг/л ГК, 4 г/л агару – напіврідке середовище;

*Варіант 2:*

+2 мг/л 6-БАП, 8г/л агару – тверде середовище;

+2 мг/л 6-БАП, 4 г/л агару – напіврідке середовище.

У всі варіанти додавали 25 г/л сахарози та розчин вітамінів.

Ми вивчали тривалу дію зниженої позитивної температури ( $t=4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) як фактор, що підвищує приживлюваність експлантів та регенераційні здібності винограду в культурі *in vitro* на різних поживних середовищах. Для цього половину об'єктів культивували на протязі 60 днів в темряві при  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Другу половину експлантів після введення в стерильну культуру розміщували в умови темноти та температури  $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$  [13].

На 15-ий день від початку культивування визначали приживлюваність експлантів. Динаміку калюсогенезу визначали кожні 10 днів.

### ***Результати досліджень***

**Вплив консистенції поживного середовища на приживлюваність пиляків в культурі *in vitro*.** Аналіз приживлюваності пиляків при температурі  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  показав, що найкращі показники були одержані на напіврідких поживних середовищах у всіх дослідних сортів винограду. На твердих поживних середовищах пиляки дуже швидко набували темного кольору, всихали. А на напіврідких експланти були світлого, молочно-білого кольору, тривалий час залишались життєздатними. Особливо чіткі відмінності відзначено у сорту Добриня (табл. 1). У сорту Ідилія мускатна спостерігали почорніння середовища навколо експлантів пиляків. Найкращі показники приживлюваності ініціальних експлантів при температурі  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  були у сорту Комета – варіант культивування на напіврідкому середовищі із додаванням 2мг/л 6-БАП складав 85%. В середньому по сортах приживлюваність пиляків на напіврідких середовищах була кращою на 18-25% ніж на твердих відповідно до варіантів досліду.

При температурі культивування  $4^{\circ}\text{C}$  кращі показники приживлюваності ініціалів було також одержано на напіврідких середовищах. У сорту Ідилія мускатна приживлюваність на напіврідких середовищах на 20% була вищою, ніж на твердих відповідного складу. А у сорту Комета приживлюваність на напіврідкому середовищі Уайта + 1мг/л 6-БАП+1мг/л ГК складала 100%, що на 30% вище, ніж на твердому середовищі такого ж складу відповідно (70%).

**Вплив складу фітогормонів поживного середовища на приживлюваність пиляків в культурі *in vitro*.** Як показали результати досліджень, кількісний і якісний склад фітогормонів поживного середовища впливає на приживлюваність пиляків винограду, які досліджувались. При культивуванні експлантів при температурі  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  найбільш висока приживлюваність пиляків була відмічена на напіврідкому середовищі Уайта із додаванням 2 мг/л 6-БАП (табл. 1). Так, у сорту Добриня приживлюваність складала 50%, а у сорту Комета – 85%. Після введення на середовище Уайта +2мг/л 6-БАП пиляки довгий час залишались життєздатними, були біло-молочного кольору, швидко збільшувались у розмірах.

На середовищах Уайта + 1мг/л 6-БАП+1мг/л ГК пиляки частіше набували жовтого кольору, деколи спостерігалось побуріння середовища навкруги експланта. Приживлюваність була набагато нижчою.

При культивуванні пиляків винограду в умовах знижених температур ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) та темряви були виявлені аналогічні закономірності залежності показника приживлюваності ініціальних експлантів від складу фітогормонів поживного середовища. Всі дослідні сорти показали найвищий показник приживлюваності на напіврідкому поживному середовищі Уайта +2мг/л 6-БАП (табл. 1). На цьому середовищі у сорту Добриня приживлюваність

складала 60%, а у сортів Ідилія та Комета – максимальне значення – 100%. В середньому по сортах чітко видно перевагу поживних середовищ у варіанті 2 відповідно по консистенції.

Нами було встановлено, що тип поживного середовища, кількісний та якісний склад фітогормонів суттєво впливає на показники приживлюваності пиляків винограду *in vitro*. Виявлено перевагу напіврідкого середовища Уайта +2 мг/л 6-БАП у всіх дослідних варіантах.

**Вплив температурного режиму культивування на приживлюваність пиляків в культурі *in vitro*.** По результатах дослідження встановлена значуща перевага процесів приживлюваності введених в культуру *in vitro* пиляків винограду при температурі 4 °С ніж при температурі 25 °С у всіх дослідних варіантах та сортах. Одержані дані узгоджуються з результатами досліджень попередніх років і підтверджують наші висновки про доцільність використання знижених позитивних температур для підвищення приживлюваності ініціальних експлантів пиляків винограду *in vitro* [13, 14].

Таблиця 1

**Приживлюваність пиляків винограду при температурі культивування 25 °С і 4 °С, %**

Сорт винограду	Поживне середовище	t = 25 °С	t = 4 °С
Добриня	Варіант 1		
	Уайта тв. + 1мг/л 6-БАП+1мг/л ГК	0	50
	Уайта н-р. + 1мг/л 6-БАП+1мг/л ГК	40	60
	Варіант 2		
Ідилія мускатна	Уайта тв.+2мг/л 6-БАП	30	55
	Уайта н-р +2мг/л 6-БАП	50	60
	Варіант 1		
	Уайта тв. + 1мг/л 6-БАП+1мг/л ГК	45	50
Комета	Уайта н-р. + 1мг/л 6-БАП+1мг/л ГК	60	70
	Варіант 2		
	Уайта тв.+2мг/л 6-БАП	55	80
	Уайта н-р +2мг/л 6-БАП	75	100
Середнє по сортах	Варіант 1		
	Уайта тв. + 1мг/л 6-БАП+1мг/л ГК	50	70
	Уайта н-р. + 1мг/л 6-БАП+1мг/л ГК	70	100
	Варіант 2		
Середнє по сортах	Уайта тв.+2мг/л 6-БАП	70	90
	Уайта н-р +2мг/л 6-БАП	85	100
	Варіант 1		
	Уайта тв. + 1мг/л 6-БАП+1мг/л ГК	31	57
Середнє по сортах	Уайта н-р. + 1мг/л 6-БАП+1мг/л ГК	56	77
	Варіант 2		
	Уайта тв.+2мг/л 6-БАП	52	75
	Уайта н-р +2мг/л 6-БАП	70	87

При температурі 4 °С не тільки значно збільшувалась приживлюваність пиляків у всіх дослідних сортах, але й різниця по приживлюваності між експериментальними сортами вирівнювалась. Даний показник приймав значення не менше ніж 50,0%, а в середньому по сортах - 57,0%.

**Вплив консистенції поживного середовища на процеси калюсогенезу та ембріогенезу пиляків в культурі *in vitro*.** На 25–30 день після початку культивування

спостерігали набухання пиляків та індукцію калюсогенезу. Калюси, які утворились із пиляків, швидко збільшувались у розмірах, утворюючи згустки прозоро-білого кольору.

Як показали дослідження, при культивуванні експлантів при температурі 25 °С кращими поживними середовищами для всіх досліджуваних сортів винограду виявились напіврідкі середовища, а саме - середовище Уайта із додаванням + 2 мг/л 6-БАП (табл. 2). Так, наприклад, у сорту Комета в цьому варіанті отримано 40% ембріогенних калюсів. В середньому по сортах кількість утворених калюсів з ознаками ембріогенності досягала 21,6%.

На твердих середовищах калюсоутворення було слабким, калюси відзначались низькою життєздатністю. При культивуванні пиляків в умовах культурального боксу на твердих середовищах у сорту Добриня пиляки темніли і не утворювали калюс. А у сортів Комета і Ідилія мускатна було одержано одиночні калюси.

При культивуванні експлантів в темряві і при температурі 4 °С виявлено аналогічну залежність утворення ембріогенних калюсів від консистенції поживного середовища. Як і у варіанті культивування при температурі 25 °С найгірші результати були одержані на твердому середовищі Уайта + 1мг/л 6-БАП+1 мг/л ГК. Але під час культивування при температурі 4 °С на цьому середовищі іноді спостерігалось набухання пиляків, утворення калюсів, а у сортів Ідилія мускатна, Комета і поодинокі ембріоноподібні утворення (табл. 2).

Таблиця 2

**Утворення ембріогенних калюсів пиляків винограду при температурі  
культивування 25 °С і 4 °С, %**

Сорт винограду	Поживне середовище	t = 25°C	t= 4°C
Добриня	<i>Варіант 1</i>		
	Уайта тв. + 1мг/л 6-БАП+1мг/л ГК	0	0
	Уайта н-р. + 1мг/л 6-БАП+1мг/л ГК	0	0
	<i>Варіант 2</i>		
Уайта тв.+2 мг/л 6-БАП	0	10,0	
Уайта н-р +2 мг/л 6-БАП	5,0	15,0	
Ідилія мускатна	<i>Варіант 1</i>		
	Уайта тв. + 1мг/л 6-БАП+1мг/л ГК	0	10,0
	Уайта н-р. + 1мг/л 6-БАП+1мг/л ГК	0	20,0
	<i>Варіант 2</i>		
Уайта тв.+2 мг/л 6-БАП	10,0	15,0	
Уайта н-р +2 мг/л 6-БАП	20,0	25,0	
Комета	<i>Варіант 1</i>		
	Уайта тв. + 1мг/л 6-БАП+1мг/л ГК	0	20,0
	Уайта н-р. + 1мг/л 6-БАП+1мг/л ГК	5,0	35,0
	<i>Варіант 2</i>		
Уайта тв.+2 мг/л 6-БАП	15,0	40,0	
Уайта н-р +2 мг/л 6-БАП	40,0	50,0	
Середнє по сортах	<i>Варіант 1</i>		
	Уайта тв. + 1мг/л 6-БАП+1мг/л ГК	0	10,0
	Уайта н-р. + 1мг/л 6-БАП+1мг/л ГК	1,6	18,3
	<i>Варіант 2</i>		
Уайта тв.+2 мг/л 6-БАП	8,3	21,3	
Уайта н-р +2 мг/л 6-БАП	21,6	30,0	

При культивуванні пиляків на напіврідких поживних середовищах (4 г/л агару) експланти занурювались в середовище не повністю, а начебто зависаючи в ньому. Таке положення забезпечувало добрий контакт експланту із середовищем і надавало можливість проводити культивування без струшування.

**Вплив складу фітогормонів поживного середовища на процеси калюсогенезу та ембріогенезу пиляків винограду.** Інтенсивне калюсоутворення було відмічене на середовищах Уайта із додаванням 1мг/л 6-БАП+1мг/л ГК, але, на жаль, це не сприяло утворенню ембріодів та організованому росту проростків. Більш інтенсивне утворення ембріогених калюсів зафіксоване на середовищах Уайта із 2 мг/л 6-БАП. У всіх даних сортах в цьому варіанті отримані кращі результати, що дозволяє зробити висновок про можливість використання цього середовища для культури пиляків *in vitro*.

Як показали дослідження, самим найкращим поживним середовищем для всіх досліджуваних сортів винограду виявилось напіврідке середовище Уайта +2мг/л 6-БАП. Так, наприклад, у сорту Комета в цьому варіанті отримано 50,0% ембріогених калюсів. Дуже хороші результати одержані на цьому середовищі і у сорту Ідилія мускатна (25,0%) і Добриня (15,0%). В середньому по сортах кількість утворених калюсів з ознаками ембріогенності досягала 30,0%.

### **Висновки**

**Вперше** було вивчено вплив концентрації агару, консистенції поживного середовища, складу фітогормонів в поживному середовищі на приживлюваність експлантів та регенераційні здібності винограду в культурі *in vitro* і було успішно використано напіврідкі середовища (4 г/л агару).

Виявилось, що морфогенетична характеристика калюсів і утворення ембріодів залежали від якісного та кількісного складу фітогормонів в поживному середовищі та температурного режиму культивування, що узгоджується з дослідженнями ряду авторів і нашими більш ранніми дослідженнями.

Встановлено і експериментально підтверджено, що для культури пиляків винограду *in vitro* необхідно враховувати взаємодію факторів генотипу сорту, підбору поживного середовища та умов культивування.

Визначено, що оптимальним для культивування пиляків на початкових етапах та для одержання калюсів з ознаками ембріогенності є напіврідке поживне середовище Уайта із додаванням 2 мг/л 6-БАП.

### **Використані джерела**

1. Bajaj Y. P. S. *In vitro* production of haploids / Evans D.A., Sharp W.A., Ammirato PV and Yamada Y (eds) // Handbook of plant cell culture. – Macmillan, New York. – Vol. 1. – P. 228 – 287.
2. Топалэ Ш. Г. Полиплоидия у винограда / Ш. Г. Топалэ. – Кишинев : Штиинца, 1983. – 215 с. – (Библиогр.: 301 назв.).
3. Gresshoff P. M. Derivation of a haploid cell line from *Vitis vinifera* and the importance of the stage of meiotic development of anthers for haploid culture of this and other genera / P. M. Gresshoff, C. H. Doy // Pflanzenphys. – 1974. – Vol. 73, № 2. – P. 132 – 141.
4. Matsuta N. Embryogenesis cell lines somatic embryos of grape (*Vitis vinifera* L.) / N. Matsuta, T. Hirabayashi // Plant cell Reports. – 1989. – № 7. – P. 684 – 687.
5. Hirabayashi T. *In vitro* embryogenesis and plant regeneration from the anther –derived callus of *Vitis* / T. Hirabayashi, T. Akihama; ed. A. Fujiwara // Plant tissue culture. – Maruren, Tokyo, 1982. – P. 547 – 548.
6. Mauro M. C. Stimulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon / M. C. Mauro, C. Nef, G. Fallot // Plant Cell Reports. – 1986. – Vol. 5, № 5. – P. 377 – 380.

7. Stamp J. A. Proliferative somatic embryogenesis from zygotic embryos of grapevine / J. A. Stamp, C. P. Meredith // J. Amer. Soc. Hort. Sci. Nov. – 1988. – Vol. 113, № 6. – P. 941 – 945.
8. Lebrun L. Selection in vitro for NaCl –tolerance in Vitis rupestris Scheels / L. Lebrun, K. Rajasekaran, M. G. Mullins // Annals of Botany. – 1985. – Vol. 56. – P. 733 – 739.
9. Rajasekaran K. Influence of genotype and sex-expression on formation of plantlets by cultured anthers of grapevine / K. Rajasekaran, M. G. Mullins // Agronomie. – 1983. – Vol. 3. – P. 233-238.
10. Endogenous gibberellins-like substances in somatic embryos of grape (Vitis vinifera x Vitis rupestris) in relation to embryogenesis and the chilling requirement for subsequent development of nature embryos / [Takeno K., Koshioka M., Pharis R.P. etc. ] // Plant. Phys. – 1983. – Vol. 73. – P. 803-808.
11. Теслюк Н. І. Застосування методів культури in vitro у виноградарстві / Н. І. Теслюк // Аграрний вісник Причорномор'я: зб. наук. праць біол. та с.-г. наук. – Одеса: ОДАУ, 2002. – № 18. – С. 155-159.
12. Стыцко С. А. Культивирование пыльников винограда in vitro / С. А. Стыцко, Л. В. Глотова // Виноделие и виноградарство. – 2001. – № 4. – С. 36 – 37.
13. Теслюк Н. И. Усовершенствование методов культуры in vitro для селекции и размножения винограда: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. - Одесса, 2009.
14. Теслюк Н. І. Розробка методичних прийомів для культури пиляків винограду in vitro // Виноградарство і виноробство: міжв. наук. тем. зб. – Одеса: ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова», 2013. – Вип. 50. – С. 270-275.

**Теслюк Н. И.**

#### **Полужидкие питательные среды для культуры пыльников винограда in vitro**

*В статье представлены результаты исследований по культуре пыльников винограда in vitro. Установлена возможность получения продуктивных эмбриогенных каллусов из пыльников винограда. Для этого изучены и установлены особенности влияния пониженной температуры (4 °С) на начальных этапах культивирования эксплантов пыльников в культуре in vitro, определена оптимальная питательная среда. Впервые было изучено влияние концентрации агара, консистенции среды на приживаемость эксплантов и регенерационные способности пыльников винограда in vitro. Определено преимущество полужидкой среды Уайта с добавлением 2 мг/л 6-БАП.*

**Ключевые слова:** пыльники винограда, культура in vitro, фитогормоны, полужидкие питательные среды, каллусогенез, эмбриогенез.

**N. I. Teslyuk**

#### **The advantage of semi-liquid nutrient substratum used for grapes anthers in vitro cultivation**

*The possibility for obtaining productive embryonic calluses from grapes anthers has been determined. Peculiarities of low temperature (4°C) influence at the initial stages of explants cultivation has been revealed. Optimal substratum composition has been determined.*

*The influence of agar concentration and the consistency of the substratum on explants survival and regenerative capacity of grape anthers has been investigated for the first time. The advantage of White semi-liquid nutrient substratum with addition of 2 mg/l 6-BA has been defined.*

**Keywords:** grapes anthers, in vitro cultivation, semi-liquid nutrient substratum, callusogenesis, embryogenesis.