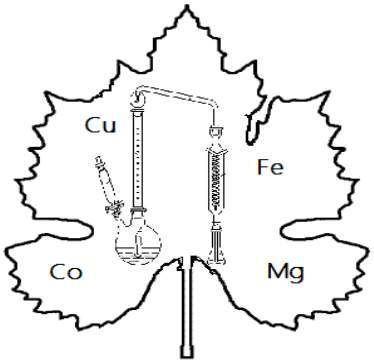
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ

Національний науковий центр «Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова»

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

з підвищення регенераційного потенціалу винограду в умовах культури тканин *in vitro*



Таїрове, 2026

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ

Національний науковий центр «Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова»

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

з підвищення регенераційного потенціалу винограду в умовах культури тканин *in vitro*

Таїрове, 2026

УДК 634.8:57.085.2

Методичні рекомендації з підвищення регенераційного потенціалу винограду в умовах культури тканин *in vitro*. Зеленянська Н.М., Артюх М.М., Гогулінська О.І., Борун В.В., Самофалов М.О., Бойко О.М., Дьяченко Д.В, Мавров В.Г. - Одеса: ННЦ "ІВіВ ім. В.Є. Таїрова", 2026. - с.20

Науково - практичне видання

Рекомендації призначені для виноградних розсадників, лабораторій культури тканин, маточних господарств і фахівців для виробництва вихідного і сертифікованого садивного матеріалу.

Науковий редактор:
Ніна МУЛЮКІНА – заступник директора з наукової роботи ННЦ "ІВіВ ім. В.Є. Таїрова", доктор сільськогосподарських наук, член-кор НААН, професор

Рецензенти:

Людмила ГЕРУС - завідувач відділу селекції, генетики та ампелографії ННЦ "ІВіВ ім. В.Є. Таїрова", доктор сільськогосподарських наук, старший дослідник
В'ячеслав СКРИПНИК – завідувач відділу виноградарства, доктор філософії

Рекомендовано до друку вченою радою ННЦ "ІВіВ ім. В.Є. Таїрова", протокол № 18 від 09.11.2026 р.

Національний науковий центр
"Інститут виноградарства і виноробства імені В.Є. Таїрова"
(ННЦ "ІВіВ ім. В.Є. Таїрова"), 2026

ВСТУП

У багатьох розвинених виноградарських країнах світу застосовують біотехнологічні методи для вирощування високоякісного садивного матеріалу. Найпоширенішим є метод мікроклонального розмноження, який полягає у культивуванні рослин в асептичних умовах у поживному середовищі з регуляторами росту. Його основними етапами є відбір, підготовка та введення експлантів в культуру *in vitro*, розмноження та укорінення мікропагонів, адаптація рослин до умов *in vivo*. Порівняно з традиційними методами мікроклональне розмноження має багато переваг – високий коефіцієнт розмноження, збереження та оздоровлення рослин, можливість цілорічного виробництва садивного матеріалу [1]. Мікророзмноження винограду використовується здебільшого для отримання вихідного і сертифікованого садивного матеріалу, вільного від вірусної та бактеріальної інфекції, для закладання маточних насаджень цінних сортів та клонів [2].

В умовах культури *in vitro* на процеси розмноження та морфогенезу рослин впливає багато факторів – генотип, вік вихідної рослини, сезонність ізоляції та розмір вихідного експланта, гормональний та мінеральний склад живильного середовища, а також фізичні фактори – кислотність середовища, умови освітлення, температурний режим та відносна вологість повітря [3].

Виноград уже тривалий час вирощують в культурі *in vitro*, є багато досліджень стосовно різних аспектів мікроклонального розмноження та особливостей морфогенезу, в тому числі і виконаних співробітниками ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» [4, 5, 6].

Встановлено, що оптимальним матеріалом винограду для введення в культуру *in vitro* є зелені пагони кущів, які ростуть в теплиці. Оптимальним типом ініціальних експлантів для клонального мікророзмноження винограду, є одновічкові мікрочубуки розміром 0,8 – 1,0 см, відібрані на рівні 3- 4 -го вузлів молодих пагонів [5].

Загальноприйнятим є те, що на етапі мікророзмноження гібридів та сортів винограду застосовують модифіковані середовища Мурасіге - Скуга (MS), Чі та Пул (C2D), в якості цитокініна в склад середовища в основному вводять 6-бензиламінопурин (БАП) у концентраціях від 0,1 до 5,0 мг/л [3, 7]. Однак на середовищі з низькою концентрацією БАП мікропагони розвиваються дуже повільно, а недоліком середовищ з підвищеною концентрацією БАП є формування невеликих по довжині міжвузлів зі зміненою морфологією та вітрифікацією, що ускладнює подальше живцювання пагонів та укорінення

чубуків [8]. Внесення високої концентрації БАП у середовище (5 мг/л) викликає некроз тканин [7].

На етапі укорінення (а іноді і на етапі проліферації, одночасно з цитокінінами) застосовують фітогормони ауксинової природи, зокрема індолілоцтову, нафтилоцтову та індолілмасляну кислоти, вносячи їх у поживне середовище переважно у кількості 0,2-0,5 мг/л [9]. Введення ауксинів у середовище у кількості більше 1,0 мг/л, як правило, пригнічує ризогенез та викликає інтенсивний розвиток калусу. Велике значення має і спосіб застосування ауксинів. В основному, їх вводять до складу поживного середовища, тоді вплив фітогормонів є довготривалим, що не бажано після етапу закладки коренів; але можлива і короткочасна обробка базальних кінців мікрочубуків (обробка або короткочасне вимочування стерильним розчином препарату або ауксиновмісною пудрою з подальшою посадкою на безгормональне поживне середовище) [10].

Зниження ефективності мікроклонального розмноження переважно пов’язане з труднощами на етапах введення експлантів в культуру *in vitro*, укорінення та адаптації рослин до нестерильних умов. На етапі введення винограду в культуру *in vitro* частими проблемами є повільний ріст, розвиток калусу та вітрифікація, а також фенольне окислення тканин, також відоме як явище побуріння. На початку культивування під час введення ініціальних експлантів з їх тканин може вивільнятися велика кількість фенольних сполук, які при окисленні утворюють токсичні речовини, що перешкоджає успішній регенерації різних видів, в тому числі і винограду [11]. Продукти вторинного обміну негативно впливають на клітинну проліферацію, пригнічують ріст та розвиток експлантів та загалом регенераційний потенціал рослин під час тривалого субкультивування [12, 13].

Поліфеноли – широко розповсюджені рослинні сполуки, які здійснюють важливі фізіологічні та структурні функції у процесах росту та розвитку рослин [14], вони окислюються ферментами спочатку до хінонових похідних, а далі з утворенням пігменту меланіну [15]. Причинами фенольного окислення є пошкодження рослинного матеріалу при виділенні експлантів, культивування їх у потенційно стресових середовищах [16-18], накопичення етилену в культуральній ємкості, виділення фенольних ексудатів з відмираючих клітин [11]. Частота прояву побуріння варіює залежно від виду, сорту, фізіологічного стану рослини/тканини, розміру та віку експлантів [19, 20].

Щоб запобігти фенольному окисленню, застосовують різні прийоми, такі як попереднє замочування експлантів у розчинах антиоксидантів або ж

додавання антиоксидантів та/або адсорбентів у поживне середовище, культивування деякий час у темряві, часте субкультивування експлантів, однак ефективність цих методів різна [21]. Антиоксиданти, наприклад, аскорбінова, лимонна та винна кислота, L-цистеїн, глутатіон, манніт, нітрат срібла, тіосульфат натрію та ін., взаємодіють з фенольними речовинами та пригнічують активність ферментів, які каталізують їх синтез та окислення [22]. Дослідження показують, що аскорбінова кислота здатна запобігати та зупиняти процес потемніння експлантів. Вона реагує з о-хінонами та інгібує ферменти, що окислюють поліфеноли [23].

Адсорбенти (активоване вугілля, полівінілпіролідон, синтетичні кремнієві сполуки) не застосовують так широко, оскільки вони активно поглинають не лише фенольні сполуки, а й інші складові поживного середовища. Наприклад, у дослідженні формування мікрокалюсів з протопластів винограду V. vinifera L. активоване вугілля запобігало потемнінню культури, однак негативно впливало на результати культивування [20].

Відомо, що прояви побуріння калюсних культур винограду найефективніше зменшували полівінілпіролідон, маніт та нітрат срібла, менш ефективними були аскорбінова кислота, активоване вугілля та лимонна кислота [24]. Кількаразове промивання експлантів винограду у розчинах лимонної кислоти та аскорбінової кислоти перед стерилізацією зменшувало прояви фенольного окислення [25]. Інші дослідники додавали у поживне середовище антиоксидант дитіотреїтол для покращення життєздатності та росту експлантів винограду [26].

Біосинтез фенольних сполук рослин посилюється на світлі. Також освітлення сприяє фенольному окисленню рослинних культур; етіольовані тканини, культивовані в темряві, часто демонструють нижчий рівень побуріння, ніж вирощені на світлі [27]. Власне, етіоляція – це зміни в будові рослини, яка росте в темряві, а саме відсутність продукування хлорофілу в тканинах (хлороз) та швидке подовження стебла, тобто видовження міжвузлів завдяки використанню запасних речовин. На світлі відбувається процес деетіоляції, під час якого пригнічується подовження стебла, розвиваються листки, утворюється хлорофіл та починається фотосинтез. Ймовірно, пророщування експлантів без світла зменшує активність ферментів, які беруть участь як у біосинтезі, так і в окисленні фенолів, внаслідок чого рівень приживлюваності культур зростає [28]. Подібний ефект має введення в культуру *in vitro* експлантів винограду, відібраних з пророщених у темряві пагонів [29], а також пророщування

апікальних меристем винограду у темряві протягом 4 тижнів при 25°С з метою подальшої їх генетичної трансформації [30].

Для підвищення морфогенетичного потенціалу експлантів винограду у культурі *in vitro* та їх здатності до регенерації було розроблено методику зменшення фенольного окислення на етапі введення в культуру in vitro. Методика базується на застосуванні інгібіторів фенольного окислення, а саме аскорбінової кислоти та полівінілпіролідону, а також прийому етіоляції на етапі введення експлантів в культуру тканин. Також наведено приклад застосування методики на сортах селекції ННЦ «ІВіВ ім. В.Є.Таїрова» Аркадія та Загадка.

СТРУКТУРА МЕТОДИКИ

Організація роботи у лабраторії культури тканин *in vitro*

Процес мікроклонального розмноження складається з чотирьох основних етапів:

1. Ізолювання експланта, введення й ініціація його розвитку в умовах *in vitro*.
2. Власне мікророзмноження.
3. Укорінення мікропагонів.
4. Адаптація мікророслин до умов *in vivo*.

Для правильної організації роботи у лабораторії культури тканин потрібно проводити стерилізацію приміщень та обладнання Лабораторний посуд, що використовується для приготування, зберігання поживних середовищ та вирощування рослинного матеріалу, обов'язково миють з використанням спеціальних миючих засобів та стерилізують у сухожаровій шафі за температури +160 °С протягом 2 год.

Інструменти спочатку стерилізують сухим жаром у сушильній шафі протягом 2 год за температури +140 °С. Перед початком і під час роботи в ламінарному боксі інструменти ще раз стерилізують, занурюючи їх у склянку з 96 %-м етиловим спиртом та обпалюючи в полум'ї спиртівки або витримують у стерилізаторі. Щоразу після кожної маніпуляції з інструментами їх знову стерилізують над спиртівкою.

Ламінарну кімнату спочатку прибирають від пилу та бруду, протираючи поверхні дезинфікуючими засобами, після чого стерилізують за допомогою кварцевих бактерицидних ламп протягом 1-3 годин. Також стерилізують сам ламінар-бокс, який, як правило, обладнаний ультрафіолетовими лампами, які вмикають також на тривалий час, а його поверхні протирають 96% етиловим спиртом.

Приготування поживних середовищ

Для приготування поживних середовищ для культивування винограду використовують маточні розчини або ж щоразу роблять необхідні наважки. Основою для приготування поживних середовищ є суміші мінеральних солей (макро- і мікроелементів), і, оскільки живлення культивованих тканин є гетеротрофним, джерелом вуглецю є сахароза або глюкоза. У таблиці 1 наведений склад поживного середовиза МС. Зазвичай окремо готують маточні розчини макросолей, мікросолей, хлориду кальцію, хелату заліза та вітамінів, які потім стерилізують та зберігають у холодильнику при +4 °С.

Таблиця 1

Склад поживного середовища Мурасіге-Скуга (1962)

Компоненти	Вміст, мг/л
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440
$MgSO_4 \cdot 4H_2O$	370
KH_2PO_4	170
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22,3
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,6
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25
KJ	0,83
$Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$	27.8
Na_2-ЕДТА$\cdot 2H_2O$	37,3
Тіамін - HCl	0,1
Піридоксин - HCl	0,5
Нікотинова кислота	0,5
Мезоінозит	100
Сахароза	20 000
Агар	7 000
6-бензиламінопурин	0,1-0,5

Для вирощування та підтримання культур використовують фітогормони. Зазвичай на етапі введення до поживного середовища додають 6-бензиламінопурин (БАП), який стимулює проліферацію вічок експлантів винограду. Маточний розчин БАП (10 мг) розчиняють попередньо у невеликій

кількості 0,5н HCl і при нагріванні доводять об'єм розчину до 10 мл, додаючи потрібну кількість води.

Приготування модифікованого поживного середовища Мурасіге-Скуга для введення експлантів винограду

Для приготування поживного середовища в хімічний стакан місткістю 1 л поміщають 20 г сахарози, доливають дистильованою водою приблизно до 400 мл і після розчинення сахарози додають необхідні кількості маточних розчинів макросолей (100 мл), мікросолей (100 мл), хлориду кальцію (10 мл), хелату заліза (10 мл), вітамінів (10 мл) і 0,4 мл розчину БАП.

Для зменшення фенольного окислення до поживного середовища додають 100 мг/л полівінілпіролідону.

Обов'язково вимірюють pH розчину за допомогою pH-метра. Показник pH розчину має знаходитися в межах 5,6-5,8. У разі відхилення від цього значення до середовища по краплях додають луг (0,1N KOH) або кислоту (0,1N HC1).

Одночасно в іншому термостійкому стакані попередньо замочений для набухання агар нагрівають, помішуючи на електроплитці до повного розчинення. Потім його зливають з приготованим розчином і доводять об'єм до 1 л.

Поживне середовище розливають у пробірки (приблизно по 10-12 мл), закривають їх ватними пробками або алюмінієвою фольгою і стерилізують в автоклаві при 1,2 атм. 15 хвилин.

Також з метою зменшення фенольного окислення рекомендоване внесення аскорбінової кислоти до поживного середовища у кількості 5 мг/л, але, оскільки вона руйнується при високих температурах під час автоклавування, її додають після охолодження середовища через стерильний фільтр. Це роблять це у такому порядку: спочатку готують розчин аскорбінової кислоти (наприклад, 5мг у 5 мл води), далі роботу проводять у стерильному ламінарному боксі – пропускають розчин через шприцевий мембранний фільтр з діаметром пор 0.22 мкм у стерильну пробірку, після чого додають його у проавтоклавоване у термостійкій колбі поживне середовище, охолоджене до 45–50 °C (середовище має бути ще рідким, але вже не гарячим), ретельно перемішують та розливають у пробірки, попередньо простерилізовані у сухожаровій шафі.

Приготування розчинів аскорбінової кислоти та полівінілпіролідона для промивання експлантів

Розчини готують безпосередньо перед використанням.

Для приготування розчину аскорбінової кислоти 200 мг аскорбінової кислоти розчинити у 1 л стерильної дистильованої води.

Для приготування розчину полівінілпіролідона розчинити 10 г полівінілпіролідону у 1 л стерильної дистильованої води.

Підготовка та стерилізація експлантів

Для введення винограду в культуру *in vitro* заготовляють лозу з виділених та перевірених на зараження різними інфекціями кущів винограду. Заготівлю лози проводять у листопаді-грудні, у січні-лютому її ставлять на пророщування. Для цього здерев'янілі пагони нарізають на 2-3 вічкові чубуки, промивають у проточній воді з господарським милом, вимочують у розчині хінозолу (2 г/л) і пророщують у культуральному боксі. Або ж використовують зелені пагони кущів винограду, які ростуть в польових чи тепличних умовах, причому використовують апекси та мікрочубуки, відібрані з 1-го по 6-й вузол молодих пагонів

Молоді зелені пагони, які розвинулися з вічок, зрізають та відділяють від них листки. З пагонів відбирають експланти – фрагменти стебла з вузловими вічками. Перед початком стерилізації з вічок знімають покривні луски за допомогою скальпеля або препарувальної голки та промивають з господарським милом. Для запобігання фенольному окисленню очищені від лусок експланти витримують у розчинах 200 мг/л аскорбінової кислоти (АК) або полівінілпіролідона 10 г/л (ПВП) протягом 1 години перед стерилізацією. Під час стерилізації експланти послідовно витримують у розчинах препарату «Лізоформін» 2% (15 хв), хінозолу 2 г/л (20 хв) та етилового спирту 96% (2-3 с), щоразу промиваючи їх стерильною дистильованою водою, а наприкінці це повторюють тричі. Стерилізацію експлантів проводять в умовах стерильного ламінар-боксу. Після стерилізації виділяють одновічкові експланти розміром 0,5-1,0 см та висаджують на поживне середовище Мурасіге-Скуга (МС), виготовлене за стандартною схемою або ж з аскорбіновою кислотою чи полівінілпіролідоном у складі. Культивування експлантів проводять у культуральному боксі при температурі 25°С, освітленні 2000-2500 люкс 16 год, вологості повітря 60-70%. Для досягнення етіоляції експлантів їх після висаджування витримують у темряві без освітлення протягом 15 діб, для цього пробірки розміщують у термостаті або ж створюють умови затемнення у боксі підручними засобами (поміщають у бокс або коробку та притіняють). Після 15 діб етіоляції пробірки переносять в умови освітлення.

Для досягнення кращого ефекту зменшення фенольного окислення експлантів можна комбінувати різні прийоми між собою (промивання експлантів розчинами аскорбінової кислоти або полівінілпіролідона перед стерилізацією експлантів, культивування експлантів на поживному середовищі з аскорбіновою кислотою або полівінілпіролідоном, витримування експлантів у темряві для їх етіоляції) або ж застосовувати один з них.

Через 7, 15 та 30 діб після висаджування проводять обліки приживлюваності, проліферації та ризогенезу експлантів (у % від кількості висаджених), через 30 та 60 діб вимірюють основні показники росту та розвитку мікроклонів (висота стебла, см; кількість листків та коренів, шт.).

ЗРАЗОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Дослідження проводили в лабораторії культури винограду *in vitro* відділу розсадництва, розмноження та біотехнології винограду ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» НААН України. У роботі було використано столові сорти винограду Аркадія та Загадка селекції ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова».

Введення в культуру *in vitro* та вирощування мікроклонів здійснювали за загальноприйнятою методикою [1]. Для цього підготовлену лозу винограду попередньо пророщували у культуральному боксі, з отриманих зелених пагонів відбирали експланти – фрагменти стебла з вузловими вічками. Перед початком стерилізації з вічок знімали покривні луски, а тоді послідовно витримували у розчинах препарату «Лізоформін» 2% (15 хв), хінозолу 2 г/л (20 хв) та етилового спирту 96% (2-3 с), щоразу промиваючи їх стерильною дистильованою водою. Після цього експланти в умовах ламінарного боксу висаджували на стандартне поживне середовище Мурасіге-Скуга (МС), доповнене 0,4 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП), pH поживного середовища дорівнювало 5,7-5,8. Для запобігання фенольному окисленню використовували різні прийоми – витримували очищені від лусок експланти у розчинах 200 мг/л аскорбінової кислоти (АК) або полівінілпіролідона 10 г/л (ПВП) протягом 1 години перед стерилізацією, або висаджували на поживне середовище з 3-5 мг/л АК чи 50-100 мг/л ПВП, або ж витримували у темряві без освітлення протягом 15 діб для етіоляції експлантів, а потім культивували на світлі. У дослідженні також комбінували ці прийоми між собою для досягнення кращого ефекту, схема досліду подана у таблиці 2.

Експланти пророщували у культуральному боксі при температурі 25-27°С, вологості повітря 60-70% та освітленні 2000-2500 люкс з фотоперіодом 12 год,

якщо не вказане інше. Досліди проводили у триразово, кількість експлантів у варіанті була 15 шт. Через 7, 15 та 30 діб після висаджування проводили обліки приживлюваності, проліферації та ризогенезу експлантів (у % від кількості висаджених), також через 15, 30 та 60 діб визначали вміст поліфенольних сполук (мг/г тканини) у зелених тканинах методом Фоліна-Чекальтеу. Через 30 та 60 діб вимірювали основні показники росту та розвитку мікроклонів (висота стебла, см; кількість листків та коренів, шт.). Дані обробляли статистично за допомогою програм Jamovi та Microsoft Excel.

Таблиця 2

Умови культивування та склад поживного середовища для введення експлантів

Варіант	Освітлення експлантів з 12-год фотоперіодом (+) / Етіоляція експлантів протягом перших15діб (-) **(фактор А)**	Додаткове промивання експлантів у розчинах АК* / ПВП** перед стерилізацією **(фактор В)**	Інгібітори фенольного окислення у складі поживного середовища **(фактор С)**
Варіант 1 (контроль)	+	-	-
Варіант 2	+	-	3 мг/л АК
Варіант 3	+	-	5 мг/л АК
Варіант 4	+	-	50 мг/л ПВП
Варіант 5	+	-	100 мг/л ПВП
Варіант 6	+	200 мг/л АК	-
Варіант 7	+	200 мг/л АК	5 мг/л АК
Варіант 8	+	10 г/л ПВП	-
Варіант 9	+	10 г/л ПВП	100 мг/л ПВП
Варіант 10	-	-	-
Варіант 11	-	-	3 мг/л АК
Варіант 12	-	-	5 мг/л АК
Варіант 13	-	-	50 мг/л ПВП
Варіант 14	-	-	100 мг/л ПВП
Варіант 15	-	200 мг/л АК	-
Варіант 16	-	200 мг/л АК	5 мг/л АК
Варіант 17	-	10 г/л ПВП	-
Варіант 18	-	10 г/л ПВП	100 мг/л ПВП

* – аскорбінова кислота; ** – полівінілпіролідон.

Як відомо, приживлюваність та проліферація експлантів є найважливішими показниками їх життєздатності на етапі введення в культуру. Показник приживання з часом зменшується з різних причин – через фенольне

окислення тканин, інфікування бактеріями та грибками або ж пошкодження вічка (Рис. 1). У результаті роботи встановили, що на 7-у добу після введення приживлюваність експлантів винограду сорту Аркадія була високою у всіх варіантах – 95-100% від висаджених експлантів (Рис. 2). Однак уже на 15-у добу варіанти різнилися за цим показником – в основному, приживалось 94,4-100% експлантів, за винятком варіантів 5, 16, 17, у яких залишилося 80,0-88,6% експлантів. На 30-у добу після висаджування найкраща приживлюваність експлантів була у варіантах 2, 3, 7, 9-13 та 15 – 81,7-95%.



А Б В

Рис. 1. А. Зовнішній вигляд експлантів з фенольним окисленням тканин. Б. Експланти, які культивували на стандартному поживному середовищі на світлі (Варіант 1). В. Експланти, які витримували перед стерилізацією у розчині АК, після чого розміщували у темряві для етіоляції (Варіант 15).

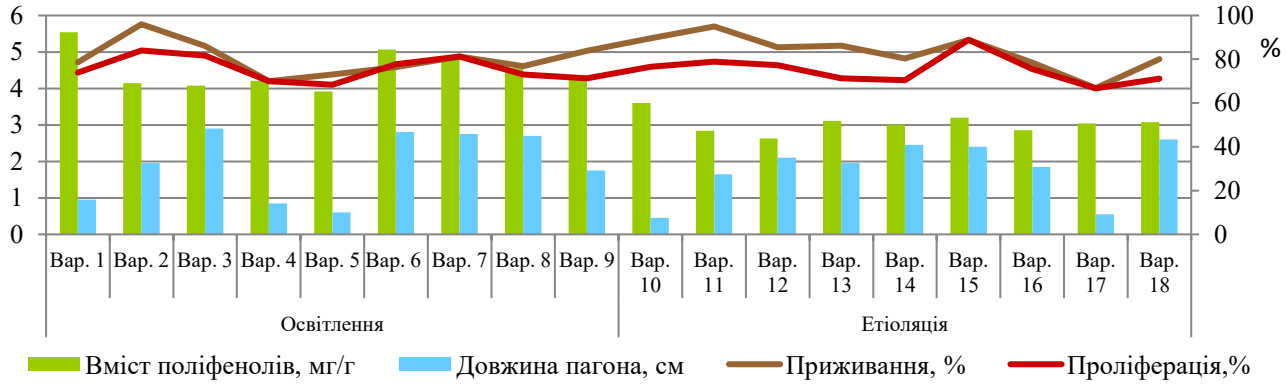


Рис. 2. Показники розвитку експлантів винограду сорту Аркадія через 30 діб після висаджування.

Однак, проліферацію вічок відмічали не у всіх на вигляд життєздатних експлантів. У варіантах з освітленням проліферація вічок розпочиналася на 3-5 добу, а у варіантах з етіоляцією трохи пізніше – на 5-7 добу. На 30-у добу вічка розпускалися у 66,7-88,9% експлантів. Найвищі значення проліферації – 81,3-88,9% – були у варіантах 2, 3, 7 та 15. Слід звернути увагу, що у цих варіантах

експлантів з ознаками фенольного окислення було лише 5,0-7,8%, а у інших варіантах та контролі таких експлантів було до 20%.

У сорту Загадка відмітили подібну тенденцію до збільшення приживання та проліферації у варіантах 2, 3, 5, 6, 8, 15, зокрема, найбільші значення були у останніх трьох варіантах – 85,0-92,5% (приживання) та 76,4-80,0% (проліферація).

Відомо, що потемнілі культури рослин (як калюси, так і мікропагони) демонструють нижчу регенераційну здатність, часто це пов'язане з підвищенням вмісту фенольних сполук та активних форм кисню в тканинах. Щоб оцінити ефективність використаних інгібіторів фенольного окислення. ми визначали у динаміці вміст поліфенолів у зелених тканинах експлантів та мікроклонів винограду. Встановили, що під час першого дослідження (через 15 діб після введення) найбільша кількість поліфенолів була у тканинах контрольних експлантів сорту Аркадія у варіанті 1, 4 і 5 (3,68-3,70 мг/г) та у варіантах 6, 8, 9 (3,75-3,88 мг/г). У етіольованих протягом 15 діб експлантів винограду вміст поліфенолів був значно меншим, зокрема у варіанті 10 становив 3,05 мг/г. Загалом, різниця з контролем була достовірною у всіх варіантах, – поліфенолів було на 4,9-28,5% менше. А через 30 днів культивування вміст поліфенолів зростав порівняно з попередніми значеннями, найбільше у контрольному варіанті – на 49,7% та у варіантах 6 і 7 – на 30,7-40,0% (Рис. 2). Найменше поліфенолів було у попередньо етіольованих експлантів на поживному середовищі з АК та ПВП, їх вміст збільшувався в середньому на 6,2-20,6%.

У сорту Загадка також спостерігали зменшення вмісту поліфенолів у етіольованих експлантах та під впливом АК і ПВП, особливо у варіантах 3- 6, 9, 11-16 – до 3,22-3,65 мг/г.

Також через 30 діб після висаджування вимірювали показники росту експлантів (Рис. 2). У сорту Аркадія найдовші пагони розвивалися у варіантах 3, 6-8 – 2,7-2,9 см та у варіантах 14, 15, 18 – 2,4-2,6 см. За кількістю листків виділялися варіанти 3, 6, 7, 12, 15, 16 – у них було 3,0-3,2 листка на стеблі. У сорту Загадка найдовші пагони розвивалось у етіольованих експлантів варіантів 15, 16 та 18 – 3,0-3,3 см, листків було 2,7-3,0 шт. на пагоні.

На останньому етапі роботи за допомогою трифакторного дисперсійного аналізу вивчили вплив досліджуваних факторів – освітлення/етіоляція 15 діб (фактор А), стандартна стерилізація/промивання антиоксидантом АК або ПВП (фактор В) та культивування на стандартному поживному середовищі МС/ середовищі МС з АК або ПВП (фактор С) на приживання, проліферацію експлантів винограду, вміст поліфенолів та довжину пагона на 30-у добу після

висаджування (Табл. 3). У більшості випадків результати показали статистично значущу взаємодію між трьома факторами. Щодо застосування АК встановили, що сильний вплив на приживання експлантів мали фактор А та В (19,5% та 12,0% дисперсії пояснюється його впливом) та взаємодія між факторами А та С (34,2% дисперсії). Ще більше ці фактори впливали і на проліферацію експлантів (55,6% впливу пояснюється їх взаємодією), тобто вплив фактора А повністю залежав від рівня фактора С. Щодо вмісту поліфенолів, то 77,5% варіативності пояснюється впливом фактора А, також значущими є вплив фактора С та взаємодії факторів В і С. Найбільший вплив на довжину пагона мали фактори В та С – відповідно на 36,6% та 29,7%, а також їх взаємодія (на 19,8%). Тристороння взаємодія факторів не є статистично значущою для жодного з показників.

Таблиця 3

Результати дисперсійного аналізу впливу факторів на показники розвитку експлантів сорту Аркадія

Джерело варіації	df	Приживання (%)		Проліферація (%)		Вміст поліфенолів (мг/г)		Довжина пагона (см)	
		F	η^2, %	F	η^2, %	F	η^2, %	F	η^2, %
Дисперсійний аналіз при застосуванні АК у розчині та поживному середовищі МС									
Всеохоплююча модель	7	6,96*		7,83*		121,24*		99,50*	
Освітлення (А)	1	12,59	19,5	3,98	5,6	670,47*	77,5	50,36*	7,1
Промивання у розчині АК (В)	1	7,77	12,0	0,32	0,4	0,04	0,0	261,03*	36,6
Поживне середовище МС+АК (С)	1	1,37	2,1	1,37	1,9	130,52*	15,1	211,58*	29,7
Взаємодія А × В	1	0,76	1,2	2,96	4,2	8,18	0,9	22,38*	3,1
Взаємодія А × С	1	22,16*	34,2	39,36*	55,6	1,03	0,1	0,65	0,1
Взаємодія В × С	1	0,78	1,2	0,64	0,9	38,19*	4,4	141,09*	19,8
Взаємодія А × В × С	1	3,28	5,1	6,18	8,7	0,26	0,0	9,43	1,3
Дисперсійний аналіз при застосуванні ПВП у розчині та поживному середовищі МС									
Всеохоплююча модель	7	17,99*		38,91		144,17*		24,28*	
Освітлення (А)	1	0,43	0,3	0,82	1,2	696,14*	68,4	0,27	0,2
Промивання у розчині ПВП (В)	1	18,38	13,7	10,07	14,4	17,73	1,7	37,12*	20,9
Поживне середовище МС+ПВП (С)	1	8,28	6,2	9,92	14,2	160,82*	15,8	29,12*	16,4
Взаємодія А × В	1	53,70*	40,1	18,24*	26,0	0,01	0,0	27,27*	15,3

Взаємодія A × C	1	0,28	0,2	9,32	13,3	35,46*	3,5	75,76*	42,6
Взаємодія B × C	1	43,20*	32,3	5,58	8,0	93,93*	9,2	0,12	0,1
Взаємодія A × B × C	1	1,65	1,2	8,06*	11,5	5,14	0,5	0,27	0,2

*Примітка: * – ефект значущий при $p < 0.01$*

Для вивчення впливу ПВП у складі розчину для промивання та у поживному середовищі провели аналогічний аналіз. Встановили, що на приживання експлантів винограду мали статистично підтверджений вплив взаємодії факторів А і В та В і С (розмір ефекту 40,1% та 32,3%). На проліферацію експлантів найбільший ефект мала взаємодія факторів А і В – 26,0% та факторів А, В і С – 11,5%. На вміст поліфенолів у тканинах найбільше впливав фактор А – 68,4% та фактор С – 15,8%. На довжину пагона найсильніше впливали фактори В і С % – 42,6%. Взаємодія трьох факторів не мала підтвердженого впливу на показники розвитку експлантів, за винятком проліферації, де розмір ефекту був 11,5%.

Таким чином, найсприятливішими для приживання та проліферації експлантів є правильна комбінація світлового режиму та складу поживного середовища (при внесенні АК) або ж комбінація світлового режиму та попереднього промивання (при внесенні ПВП). На вміст поліфенолів у тканинах та довжину пагонів у всіх випадках найбільше впливав світловий режим та склад поживного середовища. Імовірно, етіоляція заблокувала світлозалежний синтез поліфенолів, а подвійне застосування АК (під час промивання та культивування) нейтралізували ті оксиданти, що виділились при пошкодженні тканин. Завдяки цьому фітогормон БАП у складі середовища стимулював проліферацію експлантів та ріст проліферуючих пагонів.

Щоб визначити найкращу комбінацію серед факторів, провели пошук за показником «різниця середніх» шляхом апостеріорних порівнянь. Найбільша статистично значуща різниця за критерієм Тьюкі за показником приживання становила 13,17 ($p < 0,01$) у варіанті 16, а саме за умов етіоляції 15 діб, промиванні розчином АК перед стерилізацією та культивуванні на поживному середовищі з 5 мг/л АК, а за показником проліферація максимальна різниця була -17,40 у варіанті 15 (етіоляція 15 діб, промивання розчином АК перед стерилізацією та культивування на стандартному поживному середовищі). За впливом на показник довжина пагона найбільша достовірна різниця середніх (-2,40) також була у варіанті 16. За впливом на змінну «вміст поліфенолів»

визначили, що найкращою комбінацією був варіант 15, при цьому $p < 0.01$, а «різниця середніх» становила 2,57.

Застосування ПВП на етапі промивання з подальшим культивуванням експлантів на стандартному середовищі МС на світлі (варіант 8) є статистично підтвердженою комбінацією факторів, що дозволяє ще перед висаджуванням експлантів ефективно видалити надлишок поліфенольних речовин з тканин, в подальшому досягаючи високих показників приживання, проліферації вічок та інтенсивного розвитку пагонів. Так, різниця середніх за коефіцієнтом Тьюкі за показником проліферація складає 11,60, вміст поліфенолів – 1,64, довжина пагона – 2,25, $p < 0.01$. Імовірно, за умови етіоляції або ж вирощування на середовищі МС з ПВП, рівень необхідних для життєдіяльності поліфенолів не встигає досягти оптимального для розвитку рівня, тому проліферація та розвиток пагонів експлантів повільніші.

У результаті роботи було зроблено висновок, що найсприятливішим для проліферації вічок експлантів винограду сортів Аркадія та Загадка було промивання розчином АК (200 мг/л) перед стерилізацією, культивування на поживному середовищі з 5 мг/л АК або ж на стандартному поживному середовищі МС за умов етіоляції протягом 15 діб. Вміст поліфенольних сполук у зелених тканинах дослідних експлантів цих варіантів був меншим, ніж у контролі, як через 15, так і через 30 днів після введення (на 42,2-48,7%), а довжина пагонів перевищувала контрольні значення у 1,9-2,4 рази. Застосування ПВП (10 г/л) на етапі промивання з подальшим культивуванням експлантів на стандартному середовищі МС на світлі також позитивно впливало на проліферацію вічок експлантів, зокрема, довжина пагонів зростала у 2,6-2,8 рази, а вміст поліфенолів знижувався на 15,8-17,7%.

ВИКОРИСТАНІ ДЖЕРЕЛА

1. Система сертифікованого виноградного розсадництва України : [монографія] / Я. М. Гадзало, В. В. Власов, Н. А. Мулюкіна, Л. В. Джабурія, М. І. Тулаєва; ред.: В. В. Власов; НААН України, Нац. наук. центр "Ін-т виноградарства і виноробства ім. В.Є. Таїрова". - Київ : Аграр. наука, 2015. – 287 с.

2. Yancheva S., Marchev P., Yaneva V., Roichev V., Tsvetkov I. In vitro propagation of grape cultivars and rootstocks for production of pre-basic planting material. Bulgarian Journal of Agricultural Science. 2018. 24(5). P. 801–806.

3. Biotechnology of fruit and nut crops / edited by Richard E. Litz. Tropical Research and Education Center University of Florida USA CABI Publishing. 724 p. SB359.3.B549 2004 634.043).

4. Голодрига П. Я., Зленко В. А., Чекмарев Л. А. а др. Методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда. Ялта, 1986. 56 с.

5. Черевата Тетяна Михайлівна. Розробка і оптимізація прийомів клонального мікророзмноження для виробництва садивного матеріалу винограду : дис... канд. с.-г. наук: 06.01.08 / УААН; Національний науковий центр "Інститут виноградарства і виноробства ім. В.Є.Таїрова". — О., 2006. — 159арк. : рис., табл. — Бібліогр.: арк. 126-146

6. Зеленянська Наталя Миколаївна. Наукове обґрунтування та розробка сучасної технології вирощування садивного матеріалу винограду : автореф. дис. …. д-ра с.-г. наук : 06.01.08 / Нац. акад. аграр. наук України, Нац. наук. центр "Ін-т виноградарства і виноробства ім. В. Є. Таїрова".– Одеса : [б.в.], 2015.– 48 с.

7. Kim S-H, Kim S-K. Effect of cytokinins on in vitro growth of grapes (Vitis spp.). Journal of Plant Biotechnology. 2002;29(2): 123–127. DOI: 10.5010/JPB.2002.29.2.123

8. Бугаенко Бугаенко ЛО, Иванова-Ханина ЛВ. Морфогенез винограда в культуре in vitro. Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия: Биология, химия. 2011;24(63-2):73–82.). (Kim Kim S-H, Kim S-K. Effect of cytokinins on in vitro growth of grapes (Vitis spp.). Journal of Plant Biotechnology. 2002;29(2): 123–127. DOI: 10.5010/JPB.2002.29.2.123.

9. Kurmi Kurmi U. S., Sharma D. K., Tripathi M. K. et al. Plant regeneration of Vitis vinifera (L) via direct and indirect organogenesis from cultured nodal segments. Journal of Agricultural Technology. 2011. № 7(3). P. 721-737.

10. Blythe E. K., Sibley J. L., Tilt K. M., Ruter J. M. Methods of Auxin Application in Cutting Propagation: A Review of 70 Years of Scientific Discovery and Commercial Practice. J. Environ. Hort. 2007. № 25(3). P. 166–185.

11. Liu C., Fan H., Zhang J., Wu J., Zhou M. 2024. Combating browning: mechanisms and management strategies in in vitro culture of economic woody plants. Forestry Research, 4:e032 https://doi.org/10.48130/forres-0024-0026

12. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацька В.В. Технология микроклонального размножения растений. Киев: Наук. думка, 1992. 232 с.

13. Скрипченко Н.В. Динаміка вмісту фенольних речовин в пагонах актинідії та регенераційна здатність при розмноженні. Вісник харківського національного аграрного університету. Серія «Біологія». 2009. Вип. 1 (16). С.

63–67.

14. Чечуй О. Ф. Біохімія рослин: навчальний посібник / О.Ф. Чечуй. – Харків: ХНАУ ім. В. В. Докучаєва, – ХНАУ, 2021. – 159 с.

15. Krishna H., Sairam R.K., Singh S.K., Patel V.B., Sharma R.R., Grover M., Nain L., Sachdev A. 2008. Mango explants browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. Scientia Horticulturae, 118(2):132-138. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.05.040

16. Robards R., Antolovich M. (1997). Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. A review. Analyst., 122:11–34. doi: 10.1039/A606499J

17. Saengnil K., Lueangprasert K., Uthaibutra J. 2006. Control of enzymatic browning of harvested 'hong huay' litchi fruit with hot water and oxalic acid dips. Science Asia,, 32(4):345–350. doi: 10.2306/scienceasia1513–1874.2006.32.345

18. Dineshbabu K., Sathiamoorthy N., Chezhiyan N., Kapil D., Singh N. 2002. In vitro establishment of gynodioecious papaya variety CO-7 influenced by age of mother plants. Orissa Journal of Horticulture, 30(1):5-7.

19. Ahmad I., Hussian T., Ashraf I., Nefees M., Marayam M.R., Iqbal M. 2013. Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences, 13(4): 539-547.

20. Reustle G., Natter I. 1994. Effect of polyvinylpyrrolidone and activated charcoal on formation of microcallus from grapevine protoplasts (Vitis sp.). Vitis, 33(3): 117–121.

21. Amente G., Chimdessa E. 2021. Control of browning in plant tissue culture: A review. Journal of Scientific Agriculture, 5:67-71. doi: 10.25081/jsa.2021.v5.7266

22. Ali H.M., El-Gizawy A.M., El-Bassiouny R.E., Saleh M.A. 2015. Browning inhibition mechanisms by cysteine, ascorbic acid and citric acid, and identifying PPO-catechol-cysteine reaction products. Journal of food science and technology, 52(6):3651–3659. doi: 10.1007/s13197-0-1437-0

23. Ko W.H., Su C.C., Chen C.L., Chao C.P. 2009. Control of lethal browning of tissue culture plantlets of Cavendish banana cv. Formosana with ascorbic acid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 96(2):137–141. doi: 10.1007/s11240-008-9469-7

24. Rao H., Shao Z., Liu H., Wu Y., Qian P. 2015. Effect of browning inhibitors on callus subculture of phenolic compounds, enzyme and gene expression of grape. Plant Physiology Journal, 51:1322−30.

25. Ali N., Afrasiab H., Anwar S. 2017. Micropropagation and acclimatization of european varieties of grapes (Vitis vinifera L). International Journal of Advances in Biology (IJAB), 4 (1/2/3): ?. DOI : 10.5121/ijab.2017.4301 01

26. Qiu W., Fekete S., Todd T., Kovács L. 2004. Facilitation of microshoot tip propagation of Vitis aestivalis var. Norton by combined application of an antioxidant and cytokinins. American Journal of Enology and Viticulture, 55(1): 112-114.

27. Nanda A., Melnyk C.W. 2018 The role of plant hormones during grafting. Journal of Plant Research, 131(1):P.49-58.

28. Zhou Q., Gao B., Li W.-F., Mao J., Yang S.-J., Li W., Ma Z.-H., Zhao X., Chen B.-H. 2020. Effects of exogenous growth regulators and bud picking on grafting of grapevine hard branches. Scientia Horticulturae, 264:109-86.

29. Sharma H.C., Sharma R.R., Goswami A.M. 1995. Effect of etiolation on polyphenol oxidase activity in shoots of grape and its subsequent in vitro survival. Indian Journal of Horticulture, 52 (2):104-107.

30. Gray, 2008 Gray D., Li Z., Dutt M., Dhekney S. Transgenic plants from shoot apical meristems of Vitis vinifera L. “Thompson Seedless” via Agrobacterium-mediated transformation. Plant Cell Reports. 2008. Vol. 26 (12). P. 2101-10. DOI:10.1007/s00299-007-0424-6