УДК 834.835:631.532.3

# ПРИЕМЫ ОПТИМИЗАЦИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПЫЛЬНИКОВ ВИНОГРАДА IN VITRO

# ELABORATION OF METHODOLOGICAL TECHNIQUES FOR GRAPES ANTHERS IN CULTURE IN VITRO

*Н.И. Теслюк*

Национальный научный центр
«Институт виноградарства и виноделия
им. В.Е.Таирова» Одесса, Украина

*N.I. Teslyuk*

National research center "V. E. Tairov
Institute of viticulture and winemaking"
Odessa, Ukraine

**Аннотация.** 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 (4ºС) на начальных этапах культивирования эксплантов пыльников в культуре in vitro, определена оптимальная питательная среда. Определено преимущество полужидкой среды Уайта с добавлением 2 мг/л 6-БАП.

**Summary.** The article introduces research results on the topic of grapes anthers in culture in vitro. The possibility to obtain productive embryonic calluses and shoots from grapes anthers in vitro has been determined. For this purpose the White nutrient medium in the complex with lower temperature (4°C) has been proposed and used for the first time at the initial stages of explants cultivation. The advantage of White nutrient medium with addition of 2 mg/l 6-BA has been defined.

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

**Key words:** grapes anthers, culture in vitro, nutrient medium, callusogenesis, embryogenesis.

Современное развитие селекционных методов ориентировано на экспериментальные работы с гаплоидами. Виноградное растение представляет сложный гетерозиготный организм. Гаплоиды и гомозиготные диплоиды, полученные из культуры пыльников, важны для генетического анализа и улучшения продукции [1]. Андрогенез in vitro позволяет получить анеуплоиды из многих сортов, которые важны для генетики вида, а также жизнеспособные анэуплоиды, которые были неизвестны ранее [2].

Труды авторов [3, 4] свидетельствуют о том, что для культуры винограда в принципе возможно получение дигаплоидов в пыльниковой культуре. Впервые это было показано у Gresshoff R., Doy C. [3]. Японские исследователи Hirabayashi и др., [5] получили каллус (неопределенной плоидности) при культивировании пыльников *V. thunbergii* и путем изменения среды и условий выращивания вызывали образование побегов и корешков. В более поздних работах эти авторы [4, 5] говорят о

получении растений из 7 сортов *V. viniefera*, а также из нескольких гибридов и видов путем соматического эмбриогенеза из каллусов пыльникового происхождения. Результаты по индукции каллусо- и морфогенеза приведены в работах Mauro et al. [6], Stamp and Meredith [7], Lebrun et al [8].

Исследований по культуре пыльников винограда в литературе встречается намного меньше, чем по другим культурам, что, возможно, связанно с особенностями винограда как многолетней культуры и его сложной генетической структурой. На сегодняшнее время у исследователей нет единого мнения по вопросам технологии культуры пыльников винограда in vitro. Анализ литературных источников свидетельствует, что необходимо повысить эффективность биотехнологии получения растений-регенерантов винограда in vitro, расширить возможности управления отдельными этапами индукции эмбриоидов и их дальнейшего развития.

Нами [9] и соавторами [10] в предыдущих работах было предложено для культуры пыльников in vitro использовать питательную среду Уайта. Также исследовали влияние сниженных положительных температур на процессы приживаемости и каллусогенеза инициальных эксплантов пыльников при длительном культивировании in vitro. Но необходима детальная разработка оптимальных методических приемов для культуры пыльников различных сортов винограда in vitro.

**Целью** данного исследования были вопросы подбора и создания оптимальных условий культивирования пыльников винограда in vitro, в особенности для сортов новой селекции нашего института, а также использование различных приемов для индукции каллусогенеза и эмбриогенеза в пыльниковой культуре.

**Материалы и методы исследований.** Исследования проводили в лаборатории культуры тканей отдела питомниководства и размножения винограда ННЦ «ИВиВ им. В.Е. Таирова» на сортах Рипария × Рупестрис 101–14 (Р×Р 101-14), Комета, Кардишах, Ярило, Загрей. Планирование работы и отбор исходного материала из кустов – доноров, которые растут на селекционном участке института, проводили совместно с сотрудниками отдела селекции. Цветочные бутоны исследуемых сортов изолировали в начале цветения, утром и выдерживали при сниженной температуре (+4Cº) и темноте в течении 7 дней. Бутоны стерилизовали по схеме, что была разработана нами в процессе предыдущих исследований [11]:

– Промывание проточной водой – 60 мин.;

– Обработка раствором хинозола (2 г/л) – 15–20 мин.;

– Обработка раствором гипохлорита натрия или раствором отбеливателя “Белизна” 10 мин.;

– Ополаскивание 40% этанолом 30-40 сек.;

– Промывание стерильной дистиллированной водой трижды по 5 мин.

Работы по введению пыльников в культуру in vitro проводились в стерильных условиях ламинар-бокса. Из бутонов выделяли пыльники бело-желтого цвета. Выделяли филамент и высаживали на экспериментальные питательные среды. В момент инокуляции на питательные среды пыльники имели большое количество сильно вакуолизированных микроспор.

В исследованиях мы апробировали 2 варианта питательных сред: Мурасиге и Скуга (МС) и Уайта. Во все варианты питательных сред добавляли:

1мг/л никотиновой кислоты;

1мг/л пиридоксина;

1мг/л тиамина;

100 мг/л мезо-инозита;

20 г/л сахарозы;

2 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП);

0,2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д);

6,8 г/л агара.

Мы изучали продолжительное действие сниженной положительной температуры (t=4 Cº) как фактор, повышающий приживаемость эксплантов и регенерационные способности винограда в культуре in vitro на различных питательных средах. Для этого половину объектов культивировали в течении 60 дней в темноте при +4 Cº. Вторую половину эксплантов после введения в стерильную культуру размещали в условия темноты и температуры +25 Cº.

На 15 день от начала культивирования определяли приживаемость эксплантов. Динамику каллусогенеза определяли каждые 10 дней. Каллусы с выраженными признаками морфогенности пересаживали на среды того же состава, но с добавлением 0,2 индолил-уксусной кислоты (ИУК). Культивирование проводили в условиях культурального бокса при температуре 24–25° С.

**Результаты исследований.** Для усовершенствования метода культуры пыльников in vitro нами было изучено влияние типа питательной среды, температурного режима культивирования на приживаемость эксплантов, а также на процессы каллусогенеза и эмбриогенеза.

**Влияние типа питательной среды на приживаемость пыльников в культуре in vitro.** Как показали результаты исследований, тип питательной среды влияет на приживаемость пыльников винограда, исследуемых сортов. При культивировании эксплантов при температуре 25ºС самая высокая приживаемость пыльников была отмечена на среде Уайта (рис.1). В среднем у сорта Ярило приживаемость составляла

80,0%, а у сорта Загрей – 50%. После введения на среду Уайта пыльники длительное время оставались жизнеспособными, были молочно-белого цвета, быстро увеличивались в размерах.

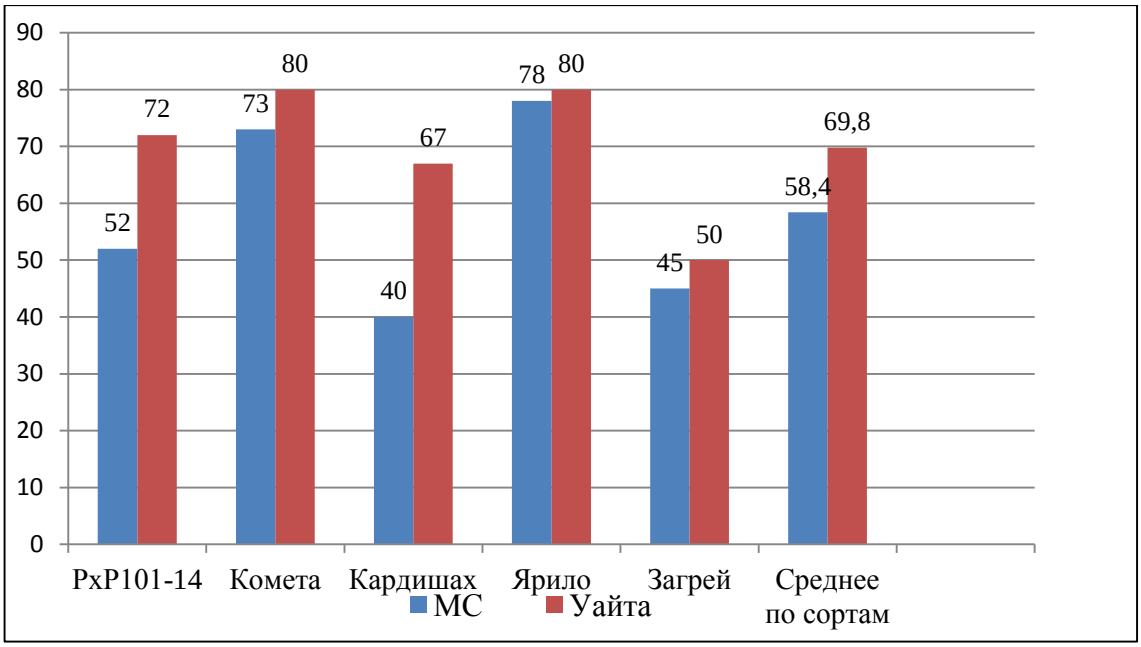


**Рис. 1. Приживаемость пыльников винограда в культуре in vitro на различных питательных средах при t=25ºС, %.**

На питательной среде МС пыльники чаще приобретали желтый цвет, отмечалось побурение среды вокруг экспланта. Приживаемость была ниже, чем на среде Уайта. У сорта Загрей различия по приживаемости на средах МС и Уайта были незначительными (рис.1), а у сортов Кардишах и Р×Р 101–14 приживаемость на среде МС была значительно ниже, чем на среде Уайта (40,0% і 67,0 % и 52,0% и 72% соответственно).

При культивировании пыльников винограда в условиях сниженных температур (+4ºС) и темноты были обнаружены аналогичные закономерности зависимости показателя приживаемости инициальных эксплантов от типа питательной среды. Все исследуемые сорта показали самые высокие показатели приживаемости на питательной среде Уайта (рис. 2). Например, на этой среде у сорта Комета приживаемость составляла 92% (максимальное значение), а в среднем по сортам – 82,8%. На среде МС приживаемость была значительно ниже и в среднем по сортам составляла 72,8 %.

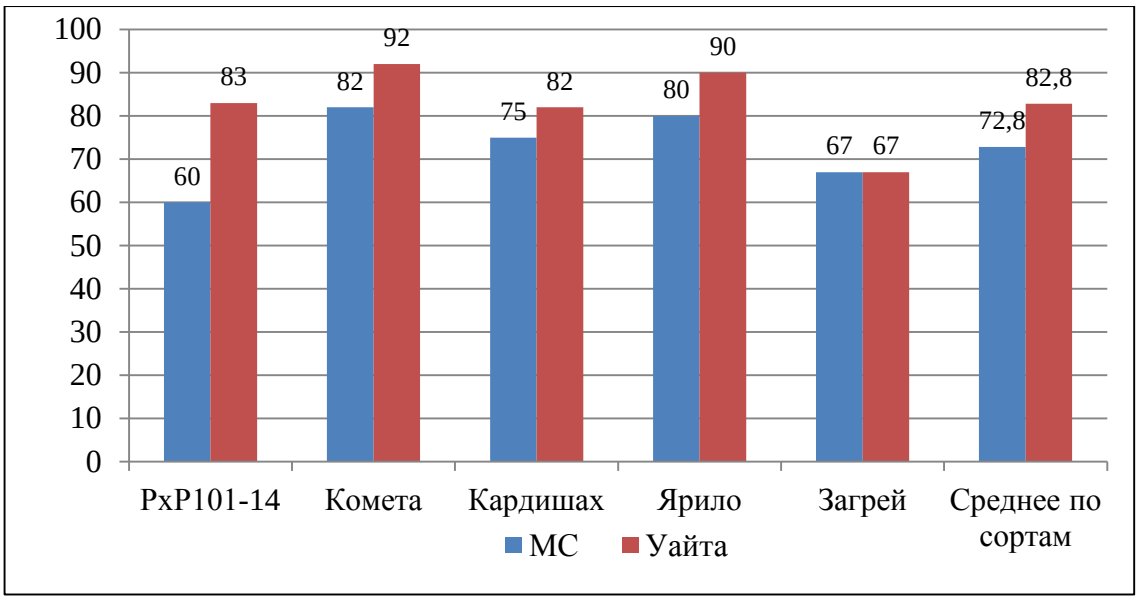


**Рис. 2. Приживаемость пыльников винограда в культуре in vitro на различных питательных средах при t=4ºС, %**

Таким образом, было установлено, что тип питательной среды существенно влияет на показатели приживаемости пыльников винограда in vitro. Обнаружены преимущества среды Уайта во всех опытных вариантах.

**Влияние температуры культивирования на приживаемость пыльников в культуре in vitro.** В результате исследований было установлено положительное влияние сниженных температур культивирования на приживаемость пыльников in vitro. Культивирование эксплантов при температуре 4ºС в темноте в течении 60 дней повышало приживаемость пыльников в среднем на 13,0–14,0% в зависимости от типа питательной среды.

Так, на среде МС приживаемость при температуре 25ºС составляла в среднем по сортам 58,4%, а при температуре 4ºС – 72,8 % соответственно. На среде Уайта приживаемость пыльников в условиях культурального бокса (t=25ºС) составляла 50–80 % или 69,8 % в среднем по сортам, а при культивировании в холодильной камере (t=4ºС) соответственно 67–92 % или 82,8 % в среднем по сортам. Интересно, что у сорта Загрей, который отличался довольно низкой приживаемостью пыльников, холодовая обработка способствовала повышению этого показателя на 17% и 22% в зависимости от типа питательной среды.

Нужно отметить, что при культивировании в холоде экспланты дольше сохраняли жизнеспособность, имели прозрачно-молочный цвет, набухали и увеличивались в объеме. Наблюдалось уменьшение бактериального и грибкового заражения, выделения фенольных

соединений в среду из эксплантов.

**Влияние типа питательной среды на процессы каллусогенеза и эмбриогенеза пыльников винограда.** На 25–30 дни от начала культивирования мы наблюдали индукцию каллусогенеза. Пыльники набухали, образовывался каллус.

Каллусы, которые образовывались из пыльников, быстро увеличивались в размерах, образовывая сгустки прозрачно-белого цвета. Некоторые каллусы имели четко выраженных эмбриогенный характер и узлы кремово-белого цвета, морфогенетические образования в виде небольших глобул.

Как показали исследования, при культивировании эксплантов при температуре 25ºС лучшей питательной средой для всех исследуемых сортов винограда оказалась среда Уайта. Например, у сорта Комета в этом варианте получено 21,3 % эмбриогенных каллусов (рис. 3). Очень хорошие результаты получены на этой среде и у сорта Кардишах (14,3 %) и Загрей (10,0 %). В среднем по сортам количество образованных эмбриогенных каллусов достигало 9,9 %.

На среде МС интенсивное каллусообразование было отмечено, но, к сожалению, это не способствовало образованию эмбриоидов и росту проростков. У сортов Р×Р101-14, Кардишах, и Загрей на среде МС эмбриогенные каллусы не образовывались. А у сортов Комета и Ярило были получены одиночные каллусы, соответственно 0,9 % и 2,2 %.

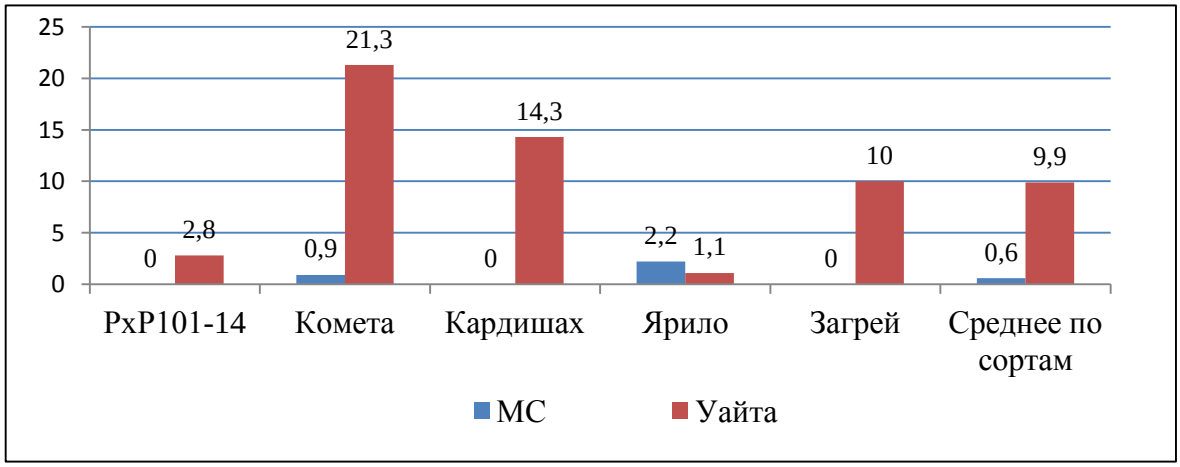


**Рис. 3. Образование эмбриогенных каллусов пыльников винограда в культуре in vitro на различных питательных средах при t=25 ºС,%.**

При культивировании эксплантов в темноте и при температуре 4ºС обнаружена аналогичная зависимость образования эмбриогенных

каллусов от типа питательной среды (рис.4). Более интенсивное образование каллусов зафиксировано на среде Уайта. У всех исследуемых сортов в этом варианте получены лучшие результаты. Так, у сорта Комета, было получено 41,0% эмбриогенных каллусов, а у сорта Загрей – 30,0%. В среднем по сортам показатель образования эмбриогенных каллусов составляла 20,7%.

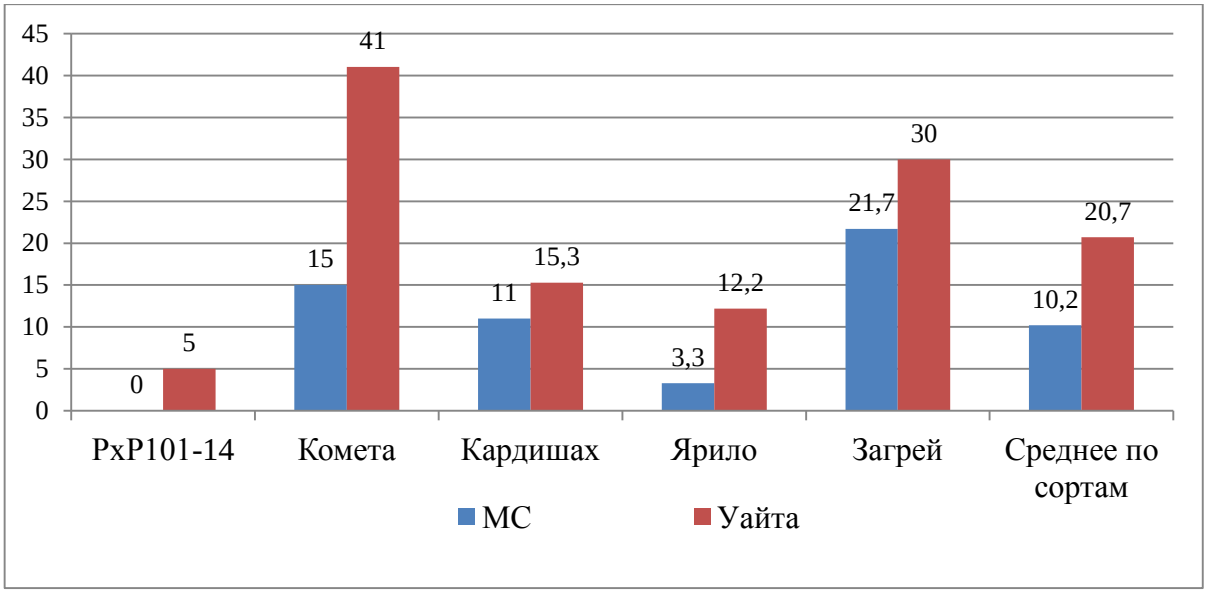


**Рис. 4. Образование эмбриогенных каллусов пыльников винограда в культуре in vitro на различных питательных средах при t = 4ºС, %**

По нашему мнению, использование питательной среды Уайта способствовало улучшению показателей приживаемости, быстрому росту тканей эксплантов и их морфогенетической дифференциации в сравнении с другими средами.

**Влияние температурного режима культивирования на процессы каллусогенеза и эмбриогенеза пыльников винограда in vitro.** Сравнительный анализ результатов, полученных при культивировании в различных температурных режимах, показал видимые преимущества использования сниженных положительных температур в культуре пыльников винограда in vitro (Рис. 3, 4). Установлено, что такая обработка способствует не только улучшению приживаемости пыльников, но и улучшению продуктивности каллусогенеза.

Наилучшие результаты были получены на среде Уайта и в среднем по сортам составляли 9,9% (температура 25ºС) и 20,7% (температура 4ºС). Культивирование при сниженной температуре привело к увеличению продуцирования эмбриогенных каллусов в среднем по сортам на 10,8%.

Применение сниженной температуры культивирования позволило

получить каллусы с признаками эмбриогенности на среде МС. Так, если при t=25ºС у сортов Кардишах, Загрей на этой среде каллусы не образовывались, то при t = 4ºС было получено 15,0% и 21,7% каллусов. В среднем по сортам на среде МС образовалось 0,6% каллусов (температура 25ºС) и 10,2% (температура 4ºС).

**Сортовая специфичность в культуре пыльников винограда in vitro.** Разные сорта винограда по-разному отзываются на культуру пыльников in vitro, по-разному реагируют на тип питательной среды и условия культивирования. При температуре 25°С наибольшая приживаемость была отмечена у сортов Ярило и Комета. При температуре 4ºС не только значительно увеличивалась приживаемость пыльников у всех исследуемых сортах, но и значительно уменьшался разброс значений этого показателя. У сортов с низким уровнем приживаемости пыльников in vitro (Загрей, Кардишах) увеличение показателя составляло 17–35%. При температуре культивирования 4ºС различия по приживаемости между экспериментальными сортами выравнивались. Таким образом, для повышения приживаемости инициальных эксплантов пыльников целесообразно использование сниженных положительных температур культивирования.

В результате работы установлено, что при одинаковых условиях экспериментальные сорта по-разному продуцировали каллусы и эмбриоиды. Наиболее продуктивными оказались сорта Комета, Кардишах, Загрей. При культивировании в условиях культурального бокса у сорта Комета в среднем по средам было получено 11,1% эмбриоидов, а у сорта Р×Р 101-14 всего 1,4%. Как уже указывалось выше, при культивировании при температуре 4ºС количество образованных эмбриогенных каллусов во всех вариантах исследования увеличивалось. Но, если при t = 4ºС показатели приживаемости различных сортов выравнивались, то при подсчете эмбриогенных каллусов отличия между сотами сохранялись, и даже более четко проявлялись.

**Выводы.** В результате исследований установлена возможность получения продуктивних эмбриогенных каллусов из пыльников винограда различных сортов. Для первичных этапов культивирования пыльников в культуре in vitro изучено влияние сниженной положительной температуры (4ºС). Показана целесообразность использования такого приема для повышения приживаемости и индукции каллусогенеза и эмбриогенеза пыльников.

Установлена оптимальность питательной среды Уайта и ее положительное влияние на основные процессы культивирования пыльников винограда in vitro.

Для использования культуры пыльников в селекционных работах целесообразно комплексное использование питательной среды Уайта и

сниженной температуры (4ºС) на первичных этапах культивирования эксплантов. Это позволит увеличить жизнеспособность и продуктивность пыльников, увеличит вероятность получения ценного генетического материала винограда.

Литература


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. Теслюк Н. І. Застосування методів культури in vitro у виноградарстві / Н. І. Теслюк // Аграрний вісник Причорномор'я. Зб. наук. праць біол. та с-г науки. – Одеса: ОДАУ, 2002. – № 18. – С. 155 – 159.
10. Стыцко С. А. Культивирование пыльников винограда in vitro / С. А. Стыцко, Л. В. Глотова // Виноделие и виноградарство. – 2001. – № 4. – С. 36 – 37.
11. Теслюк Н.И. Усовершенствование методов культуры in vitro для селекции и размножения винограда. Автореф. канд. дис., Одесса, 2009.