

ГЕНЕТИКА, СЕЛЕКЦІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 634.2.02: 575.222.7: 581.145.21

ПРЕОДОЛЕНИЕ НЕЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ГИБРИДНЫХ СЕМЯН ПРИ СТЕНОСПЕРМОКАРПИИ У ВИНОГРАДА

© 2009 г. И. А. Павлова, В. П. Клименко

Национальный институт винограда и вина «Магарач»
Украинской академии аграрных наук
(Ялта, Украина)

Стеноспермокарпические семена винограда культивировали в условиях *in vitro*, выявлены особенности прорастания таких семян. В потомстве определенных исходных форм обнаружена полиэмбриония. Установлена зависимость развития аномальных проростков от концентрации бензиламинопурина (БАП) в питательной среде. Предлагается схема регулирования морфогенеза растений *in vitro* с целью повышения жизнеспособности генеративного потомства винограда.

Ключевые слова: *Vitis L.*, стеноспермокарпия, культура семян *in vitro*, бессемянность, полиэмбриония

На протяжении нескольких десятков лет в растениеводстве широко используются методы биотехнологии, основанные на культивировании *in vitro* органов, тканей, клеток и изолированных протопластов. Применение биотехнологических методов позволяет выполнять такие селекционные задачи, для решения которых традиционные методы недостаточно эффективны. Одним из ограничивающих факторов селекции винограда на бессемянность является низкая фертильность и нежизнеспособность семян стеноспермокарпических сортов (Spiegel-Roy et al., 1985). Применение методов *in vitro* позволяет преодолевать постзиготическую абортивность и индуцировать рост и развитие зародышей на искусственных питательных средах (Aguero et al., 1995).

Наиболее перспективной является технология культивирования зародышей *in ovulo in vitro*, которая позволяет индуцировать развитие зародыша без повреждения, обеспечивая естественное прорастание на питательной среде с различными фитогормонами (Ramming et al.,

2000). Несмотря на проведенные исследования по культивированию стеноспермокарпических семян, нет единого мнения о сроках введения материала в условия *in vitro*, составе питательных сред, влиянии исходных форм на индукцию развития растений.

Цель данной работы – разработка подходов к преодолению нежизнеспособности стеноспермокарпических семян винограда на основе выявленных особенностей их прорастания в культуре *in vitro*.

МЕТОДИКА

Материалом для исследования служили гибридные семена растений рода *Vitis* (Tournef.) Linn., полученные от скрещивания стеноспермокарпических сортов и гибридов селекции института "Магарач" с бессемянными и семенными опылителями отечественной и зарубежной селекции в 1999-2005 гг.

Сбор материала проводили в период физиологической зрелости ягод. Определяли класс бессемянности стеноспермокарпических сортообразцов (Смирнов, 1979). Для этого оценивали величину и количество рудиментарных семян в ягодах, их покровы. Согласно существующей классификации первым классом бессемянности считается полное отсутствие семян

Адрес для корреспонденции: Клименко Виктор Павлович, Национальный институт винограда и вина "Магарач" УААН, ул. Кирова, 31, г. Ялта, Автономная республика Крым, 98600, Украина;
e-mail: vik_klim@rambler.ru

в ягоде, вторым – небольшое количество рудиментарных семян в ягоде и их незначительные размеры, третьим – относительно большое количество рудиментарных семян в ягоде и их крупные размеры.

Исследованный материал оценивали по экспрессии в условиях *in vitro* (Павлова, Клименко, 2003). По экспрессии в культуре семян *in vitro* исследованные сортообразцы винограда можно отнести к трем категориям. К первой категории относят стеноспермокарпические сортообразцы винограда, семена которых к периоду физиологической зрелости ягоды содержат в основном лишь покровы и непригодны для культивирования. Вторая категория представлена исходными формами, у которых в условиях *in vitro* прорастает незначительная часть семян и формируются единичные растения. Сортообразцы, жизнеспособность потомства которых достигает 30%, относят к третьей категории, при этом доля выполненных семян составляет более 40%, прорастание семян – более 50%.

Получение растений из стеноспермокарпических семян винограда осуществляли в соответствии с разработанной методикой (Декларационный патент ..., 2006; Патент 17919А ..., 1997). В стерильных условиях из ягод выделяли семена. С целью стерилизации семена обрабатывали спиртом в течение 40 с, затем 0,1% диоксидом в течение 8 мин с последующей трехкратной промывкой автоклавированной дистиллированной водой в течение 10 мин. В условиях ламинарного бокса после стерилизации и механической манипуляции по отсеканию хвостовой части фрагмент семени с предполагаемым зародышем вводили в культуру.

Проращивание семян осуществляли в темноте при температуре +25-27°C на модифицированной среде Нич-Нича с добавлением фитогормонов бензиламинопурина (БАП) в концентрации 0,5 мг/л и гибберелловой кислоты (ГК) в концентрации 2,5 мг/л (Декларационный патент ..., 2006; Nisch, Nisch, 1969). Культивирование проростков и формирование растений проводили на свету при освещенности 1600 кд·ср/м² и температуре +27°C на среде Нич-Нича (Патент 17919А ..., 1997; Nisch, Nisch, 1969).

Для приготовления питательных сред использовали соли и гормоны фирмы "Sigma" (США). В работе использовали установку обеспыливания УО-БГ и стерилизатор паровой ГК-10 производства Тюменского завода меди-

цинского оборудования и инструментов (Россия), а также рН-метр рН/ЕС/TDS фирмы "Hanna" (Германия). Культивирование растений проводили в световой комнате на стеллажах, оборудованных лампами дневного света.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Всего было осуществлено 35 скрещиваний. Однако материал для исследования в виде стеноспермокарпических семян получен только в 15 скрещиваниях (табл. 1).

В результате гибридизации получено 2493 шт. стеноспермокарпических семян, но в целом доля выполненных семян оказалась невысокой и составила 15,9%. По классификации бессемянности материал в основном отнесен к 3-му классу. У исходных форм, относящихся ко 2-му классу бессемянности, семена были представлены лишь покровами и являлись по существу рудиментами. Такие семена не пригодны для культивирования и в дальнейших исследованиях не использованы. Исключение составляло потомство от скрещивания М. № 25-82-1 × Фромуаса албэ.

При скрещивании сорта Ялтинский бессемянный завязываемость семян оказалась наиболее высокой. При скрещивании гибрида М. № 44-II-58-15 получено небольшое число семян, значительная часть из которых были выполненными.

По экспрессии в условиях *in vitro* исследуемый материал в основном отнесен ко второй категории, которая в большей степени представляет интерес для дальнейших исследований. Исходя из этого, из общего количества материала для культивирования использовали только семь комбинаций скрещивания.

В условиях *in vitro* семена начинали прорастать через несколько недель после введения в культуру. Результаты показали, что период прорастания значительно варьировал (табл. 2).

Доля прорастания семян в условиях *in vitro* варьировала в зависимости от исходных форм. Наиболее высокий процент прорастания отмечен у комбинации скрещивания М. № 44-II-58-15 × № 68-2-10, самый низкий показатель прорастания – в потомстве от скрещивания М. № 25-82-1 × Фромуаса албэ. Следовательно, к моменту физиологической зрелости ягоды стеноспермокарпических сортообразцов 3-го класса бессемянности сохраняют определенную долю семян, способных к прорастанию в условиях *in vitro*. Более ранние сроки сбора

ПРЕОДОЛЕНИЕ НЕЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ

Таблица 1

**Стеноспермокарпические семена винограда,
полученные в результате гибридизации 1999-2001 гг.**

| Комбинация скрещивания | | Год скрещивания | Общее количество семян, шт. | Класс бессемянности | Категория по экспрессии в культуре <i>in vitro</i> | Доля выполненных семян, % |
|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------------------|---------------------|--|---------------------------|
| Материнская форма | Отцовская форма | | | | | |
| Кишмиш лучистый | Ляна | 2001 | 8 | 3 | 1 | 0,0 |
| М. № 25-82-1 | Фромуаса албэ | 1999 | 123 | 2 | 2 | 11,4±1,3 |
| М. № 25-82-1 | № 67-28-14 | 2000 | 131 | 2 | 1 | 9,1±1,2 |
| М. № 44-II-58-15 | М. № 25-82-1 | 2000 | 16 | 3 | 2 | 25,0±3,3 |
| М. № 44-II-58-15 | № 68-2-10 | 2000 | 15 | 3 | 2 | 27,3±3,4 |
| М. № 5-93-56 | Венера | 2000 | 173 | 2 | 1 | 0,0 |
| М. № 5-93-56 | № 313 | 2000 | 130 | 2 | 1 | 0,0 |
| Пивденно-бережный | № 1-15-3-1 | 2000 | 46 | 3 | 2 | 9,1±1,9 |
| Пивденно-бережный | № 313 | 2000 | 15 | 3 | 1 | 0,0 |
| Ялтинский бессемянный | Венера | 2001 | 162 | 3 | 2 | 30,4±1,0 |
| Ялтинский бессемянный | Фромуаса албэ | 1999 | 320 | 3 | 2 | 24,3±0,7 |
| Ялтинский бессемянный | № 1-15-3-1 | 2000 | 101 | 3 | 2 | 20,1±1,3 |
| Ялтинский бессемянный | R 73 | 2000 | 368 | 3 | 2 | 30,2±0,7 |
| Ялтинский бессемянный | R 73 | 2001 | 326 | 3 | 2 | 38,4±0,7 |
| Ялтинский бессемянный | RF 48 | 2000 | 559 | 3 | 2 | 13,2±0,5 |

Таблица 2

Особенности прорастания гибридных стеноспермокарпических семян винограда в культуре *in vitro*

| Комбинация скрещивания | | Год скрещивания | Период прорастания, дни | Прорастание семян, % | Выживаемость растений, % | Количество множественных проростков, % |
|------------------------|-----------------|-----------------|-------------------------|----------------------|--------------------------|--|
| Материнская форма | Отцовская форма | | | | | |
| М. № 25-82-1 | Фромуаса албэ | 1999 | 87±9 | 15,4±1,9 | 50,0±8,3 | 0,0 |
| М. № 44-II-58-15 | № 68-2-10 | 2000 | 28±16 | 26,7±3,5 | 100,0 | 0,0 |
| Ялтинский бессемянный | Венера | 2001 | 130±5 | 8,1±1,0 | 50,0±4,3 | 25,0±1,5 |
| Ялтинский бессемянный | Фромуаса албэ | 1999 | 103±4 | 10,4±0,8 | 0,0 | 12,5±1,2 |
| Ялтинский бессемянный | R 73 | 2000 | 110±3 | 10,9±0,7 | 50,0±2,9 | 16,7 ±1,0 |
| Ялтинский бессемянный | R 73 | 2001 | 107±3 | 11,3±0,6 | 50,0±2,7 | 7,1±1,0 |
| Ялтинский бессемянный | RF 48 | 2000 | 86±4 | 5,5±0,8 | 25,0±3,5 | 25,0 ±1,2 |

Влияние концентрации 6-бензиламинопурина на развитие растений винограда *in vitro* комбинации скрещивания Ялтинский бессемянный × Фромуаса албэ

| Среда | Концентрация БАП, мг/л | Количество проростков, шт. | Количество каллусов, % | Количество эмбриондов, % | Частота геммогенеза, % | Количество единичных побегов, % | Количество множественных побегов, % | Количество полученных растений, % |
|-------|------------------------|----------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 0,50 | 17 | 82,4±2,6 | 35,3±6,1 | 17,6±2,9 | 0,0 | 5,9±4,6 | 0,0 |
| 2 | 0,25 | 18 | 5,6±2,5 | 0,0 | 0,0 | 61,1±10,1 | 33,3±4,5 | 94,4±15,6 |

материала, по всей видимости, приведут к повышению показателей жизнеспособности семян.

Далеко не все проростки развиваются в растения, часть проростков оказалась нежизнеспособной. Выживание растений в популяциях варьировало от 0 до 100%.

Проростки, имеющие аномалии в строении осевых органов, как правило, являются нежизнеспособными. Формирование растений происходило не во всех популяциях. Так, при скрещивании Ялтинский бессемянный × Фромуаса албэ получены только аномальные проростки, развитие которых необходимо стимулировать фитогормонами (Tsolova, Atanassov, 1994). Культивирование на среде 1, содержащей БАП в концентрации 0,5 мг/л, не привело к формированию побегов (табл. 3). Наблюдалось каллусообразование и индукция вторичных эмбриондов. Учитывая данные обстоятельства,

снизили концентрацию БАП в среде до 0,25 мг/л (среда 2). Это позволило получить множественные побеги и в остальных популяциях.

Гибридное потомство сорта Ялтинский бессемянный оказалось чувствительным к изменениям концентрации БАП в среде. Выяснилось, что незначительная часть аномальных проростков перерождается в каллус и происходит формирование побегов посредством геммогенеза. Установлена зависимость направления развития аномальных проростков от концентрации БАП в питательной среде. Учитывая эти особенности, можно существенно интенсифицировать процесс формирования растений (рисунки).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные ранее исследования по использованию культуры *in vitro* для преодоления постзиготической абортивности у винограда в основном сводились к разработке методик ку-

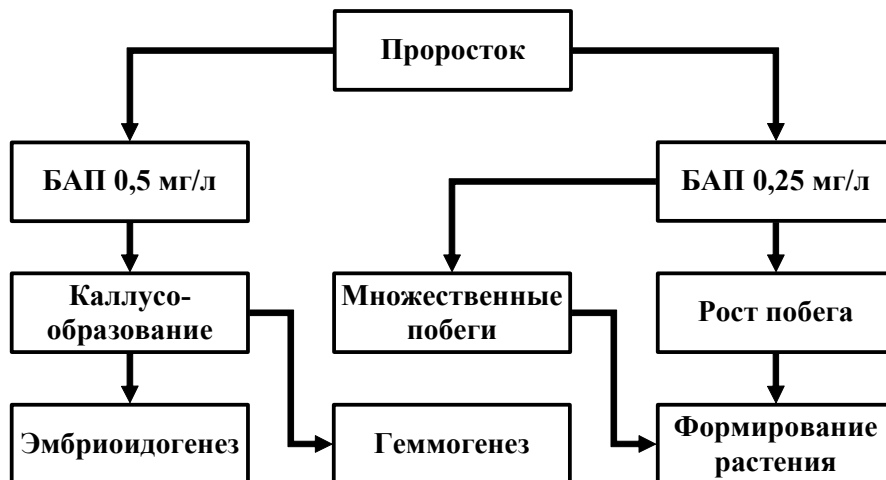


Схема регулирования морфогенеза растений *in vitro* с целью повышения жизнеспособности генеративного потомства винограда.

ПРЕОДОЛЕНИЕ НЕЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ

льтивирования и получению растений от стеноспермокарпических сортов винограда (Ramming et al., 2000; Spiegel-Roy et al., 1985; Tso-lova, Atanassov, 1994). При этом фактически не уделялось внимание морфогенезу растений в условиях *in vitro*.

Научная новизна данной работы заключается, прежде всего, в интенсификации процесса формирования растений и повышении жизнеспособности аномальных проростков посредством управления их развитием.

По всей видимости, условие, является ли опылитель бессемянным или семенным, не оказывает существенного влияния на образование и выполненность стеноспермокарпических семян. Однако пригодным для культивирования оказался в основном материал, полученный в результате скрещиваний бессемянных материнских форм с семенными опылителями.

В дальнейшем следует обратить внимание, прежде всего, на подбор исходных форм для комбинаций скрещивания типа «бессемянный × бессемянный», поскольку закономерности наследования признака бессемянности у винограда таковы, что наибольшая вероятность получения желательных бессемянных гибридных форм существует именно в результате проведения таких скрещиваний (Клименко и др. 1997).

Гибель растений на ранней стадии развития связана, возможно, с недостатком питания или морфофизиологическими нарушениями. В потомстве большинства комбинаций скрещивания не менее 25% проростков развилось в растения, что позволяет рекомендовать данные исходные формы для дальнейшей работы.

Хотя в основном получены растения из стеноспермокарпических семян, относящихся к 3-му классу бессемянности, случаи получения единичных проростков и растений из семян 2-го класса бессемянности указывают на возможность дальнейшей работы и с этой группой бессемянных форм.

Во всех популяциях, полученных в результате скрещивания сорта Ялтинский бессемянный, обнаружена полиэмбриония с достаточно высокой частотой встречаемости. Отмечено образование двух и более проростков из одного семени. Предполагается, что полиэмбриония – один из возможных путей получения гаплоидов (Tsolova, Atanassov, 1994). Природа множественных проростков может быть различной, степень их генетической однородности

предстоит выяснить в дальнейших исследованиях.

Таким образом, не все скрещивания стеноспермокарпических исходных форм винограда приводят к получению семенного материала, пригодного для культивирования в условиях *in vitro*. Множественные проростки встречаются в потомстве определенных материнских форм. Направление развития аномальных проростков зависит от концентрации БАП в питательной среде, что способствует интенсификации процесса формирования растений. Удовлетворительное выживание потомства позволяет рекомендовать исследованные исходные формы для дальнейшей работы.

ЛИТЕРАТУРА

- Клименко В.П., Трошин Л.П., Мелконян М.В. Идентифицированные гены винограда // Виноград и вино России. – 1997. – Т. 1. – С. 20-21.
- Павлова И.А., Клименко В.П. Дифференциация стеноспермокарпических сортообразцов винограда по экспрессии в культуре семян *in vitro* // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Серія Біологія. – 2003. – Вип. 3 (2). – С. 92-96.
- Смирнов К.В. Бессемянность у винограда и селекция бессемянных сортов // Проблемы виноградарства. Итоги науки и техники ВИНИТИ. Серия Растениеводство. – М., 1979. – Т. 4. – С. 3-49.
- Деклараційний патент на корисну модель 14365 України. Спосіб отримання рослин винограду від вихідних форм з низькою фертильністю / І.О. Павлова, В.П. Клименко. – № 10662; Заявл. 11.11.2005; Опубл. 15.05.2006, Бюл. № 5.
- Патент 17919А України, МПК6 А01Н 4/00, А01Н 1/04. Спосіб вирощування рослин з важкопророщуваного насіння і відбору стійких генотипів на рівні зародків / В.А. Зленко, І.В. Котіков, Л.П. Трошин, І.О. Павлова. – № 95010191; Заявл. 11.01.1995; Опубл. 03.06.1997, Бюл. № 5. – С. 3.1.18.-3.1.19.
- Aguero C., Riquelme C., Tizio R. Embryo rescue from seedless grapevines (*Vitis vinifera* L.) treated with growth retardants // Vitis. – 1995. – V. 34. – P. 73-76.
- Nisch J.P., Nisch C. Haploid plants from pollen grains // Science. – 1969. – V. 163. – P. 85-87.
- Ramming D.W., Emershed R.L., Tarailo R. A stenospermocarpic seedless *Vitis vinifera* × *Vitis rotundifolia* hybrid developed by embryo rescue // Hort. Sci. – 2000. – V. 35, № 4. – P. 732-734.

ПАВЛОВА, КЛИМЕНКО

Spiegel-Roy P., Sahar N., Baron J., Levi U. In vitro culture and plant formation from grape cultivars with abortive ovules and seeds // J. Am. Soc. Hort. Sci. – 1985. – V. 110, № 1. – P. 109-112.

*Tsolova B., Atanassov A. Induction of polyembryony and secondary embryogenesis in culture for embryo rescue of stenospermocarpic genotypes of *Vitis vinifera* L. // Vitis. – 1994. – V. 33. – P. 55-56.*

*Поступила в редакцію
12.03.2009 з.*

**OVERCOMING OF NONVIABILITY OF HYBRID SEEDS
AT GRAPE STENOSPERMOCARPY**

I. O. Pavlova, V. P. Klimenko

*National Institute of Vine and Wine «Magarach»
of Ukrainian Academy of Agrarian Sciences
(Yalta, Ukraine)*

The stenospermocarpic seeds of grape were cultivated in the *in vitro* culture. The features of germination of such seeds have been revealed. The polyembryony was discovered in progeny of certain parents. The dependence of development of anomalous seedlings from the concentration of BAP in medium has been established. The scheme of adjusting of plant morphogenesis *in vitro* with the purpose of increasing of viability of grape generative progeny is offered.

Key words: *Vitis L., stenospermocarpic, seed culture in vitro, seedlessness, polyembryony*

**ПОДОЛАННЯ НЕЖИТТЄЗДАТНОСТІ ГІБРИДНОГО НАСІННЯ
ПРИ СТЕНОСПЕРМОКАРПІЇ У ВИНОГРАДУ**

I. O. Павлова, В. П. Клименко

*Національний інститут винограду і вина «Магарач»
Української академії аграрних наук
(Ялта, Україна)*

Стеноспермокарпічне насіння винограду культивували в умовах *in vitro*, виявлені особливості проростання такого насіння. У потомстві певних вихідних форм виявлена поліембріонія. Встановлена залежність розвитку аномальних проростків від концентрації бензиламінопурину (БАП) в живильному середовищі. Пропонується схема регулювання морфогенезу рослин *in vitro* з метою підвищення життєздатності генеративного потомства винограду.

Ключові слова: *Vitis L., стеноспермокарпія, культура насіння in vitro, безнасінність, поліембріонія*