

Н. М. Пивень, В. Б. Куксова, Л. В. Юзефович, О. К. Махорина

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В СЕЛЕКЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ ВИНОГРАДА

*Изучены возможности применения ряда методов клеточной инженерии для повышения эффективности селекционного процесса винограда. Разработанная методика микроклонирования *in vitro* с использованием индукции адвентивных побегов в присутствии БАП позволяет мультиплицировать генетически идентичный материал. Способ регенерации растений из каллусных тканей побегообразованием или посредством соматического эмбриогенеза может быть рекомендован для получения новых форм винограда, в частности тетраплоидов. Частота образования полиплоидных форм может быть увеличена вследствие обработки исходных и эмбриогенных каллусов гамма-лучами или колхицином.*

Введение. Развитие биотехнологии растений привело к интенсивному использованию методов клеточной и генетической инженерии применительно ко многим сельскохозяйственным видам. В виноградарстве существует целый ряд проблем, обусловленных длительным вегетационным периодом и высокой гетерозиготностью растений [1], для решения которых важен поиск нетрадиционных подходов, дополняющих и ускоряющих как сам процесс селекции, так и быструю интродукцию новых форм и сортов. Семенное размножение используется только при выведении новых сортов, причем для отбора нужных генотипов необходимо высевать тысячи семян. Виноградную лозу издавна размножают вегетативно черенками, отводками или прививками с целью сохранения сортовых признаков, однако для размножения вновь полученной ценной формы требуется достаточно длительное время. В настоящей статье приведены данные по разработке ряда клеточных технологий винограда, в частности, быстрого микроклонального размножения, регенерации растений из каллусных тканей посредством соматического эмбриогенеза и побегообразования, а также мутагенной обработки для селекции новых генетических форм. Представлены также некоторые результаты оценки растений, полученных с помощью предложенных клеточных технологий.

Материалы и методы. Растительный материал. В эксперименте использовали следующие сорта винограда: Подарок Магарача, Спартанец Магарача и Феркаль. Зеленые побеги стерилизовали в 70 %-ном растворе этанола (60 с), диациде (7—8 мин), а затем отмывали в стерильной дистиллированной воде. Стерилизованные почки проращивали на безгормональной среде Мурасиге и Скуга (MS) [2] и в экспериментах использовали только растения, выращиваемые *in vitro*.

Ускоренное микроклональное размножение. На первом этапе стерилизованные верхушечные и пазушные почки виноградской лозы помещали по одной в колбы Эрленмейера на модифицированную жидкую среду Харриса и Стивенсона (HS) [3], содержащую 3 мг/л БАП. Культивировали при 27 °С и 16-ч фотопериоде в течение 2 недель, после чего эксплантаты пассировали на свежую среду того же состава. Еще через 2 недели культуры пересаживали на модифицированную жидкую среду HS (второй этап), содержащую 2 мг/л БАП. При культивировании в тех же условиях на этой среде индуцировали пролиферацию множественных побегов. Пассирование на свежую среду осуществляли каждые 2 недели, разделяя пучок побегов на 2—5 частей. Сформировавшиеся побеги (1—3 см длиной) пересаживали в пробирки на безгормональную среду HS для укоренения, содержащую макросоли по MS [2], разбавленные 1 : 4, 75 мг/л мезоинозита, 15 г/л сахарозы и 10 мг/л Na-гумата. Полностью сформировавшиеся растения высаживали в почву.

Соматический эмбриогенез *in vitro*. Листья асептически выращиваемых растений помещали на агаризованную среду MS с 1—2 мг/л 2,4-Д и 0,1—5 мг/л БАП и культивировали в темноте при 27 °С на протяжении одного—двух месяцев. Сформировавшийся каллус переносили на среду того же состава, но содержащую 1—3 мг/л ИУК вместо 2,4-Д. Культивировали в тех же условиях с ежемесячным пасированием. Сформировавшиеся эмбриониды пересаживали на безгормональную среду MS и выращивали при 16-ч фотопериоде. Для стимулирования прорастания их предварительно инкубировали при 4 °С в течение 2—4 недель или сразу же высаживали на среду с гибберелловой кислотой (0,4 мг/л). Растения-регенеранты культивировали на безгормональной среде HS.

Обработка гамма-лучами и колхицином. В качестве исходного материала использованы эксплантаты листьев, междоузлий, пазушных почек сорта Подарок Магарача, обработанных перед посадкой на питательную среду различными дозами гамма-лучей (Co^{60} -пушка)—5, 10, 40, 100, 500 Гр. Каллусные ткани на первом и втором этапах эмбриондогенеза обрабатывали теми же дозами или высаживали на среде с колхицином в концентрации 0,01 % и культивировали на протяжении 10 дней. В дальнейшем каллусы переносили на среды без колхицина для получения эмбрионидов.

Индукция морфогенеза. Каллусные ткани винограда сорта Феркаль, культивируемые на средах II этапа эмбриондогенеза, переносили на регенерационные среды MS с различными комбинациями фитогормонов, а именно: 1, 2, 5 мг/л зеатина в сочетании с 0,2 мг/л ИУК, а также на среды только с 2 мг/л БАП, 1 мг/л зеатина и 0,2 мг/л ИУК. После образования на каллусах зеленых бугорков в дальнейшем продолжали культивировать на среде того же состава, но с добавлением 0,01 мг/л гибберелловой кислоты. Образовавшиеся побеги укореняли на среде MS без фитогормонов.

Цитологический анализ растений-регенерантов. 10-14-дневные корешки асептически выращиваемых растений обрабатывали 0,03 %-ным колхицином (2,5 ч), фиксировали смесью Карнуа (этанол:уксусная кислота—3:1) в течение 4—5 ч и окрашивали 1 %-ным ацетоорсенном при 4 °С в течение 5—6 дней. Количество хромосом подсчитывали на временных давленных препаратах кончиков корешков.

Результаты и обсуждение. Ускоренное микроклональное размножение. Ускоренное размножение *in vitro* отличается от обычного черенкования этапом интенсивного побегообразования с использованием богатых питательных сред с высокими концентрациями цитокининов, что обеспечивает снятие апикального доминирования и образование массы побегов. Наиболее эффективным в настоящее время признан метод, описанный в работах [3, 4], модификацию которого использовали для размножения сортов Подарок Магарача и Спартавец Магарача. Стадии микроклонального размножения винограда (сорт Подарок Магарача) *in vitro* представлены на рис. 1 (а — начало пролиферации адвентивных побегов на среде с 3 мг/л БАП; б — кластер адвентивных побегов на среде с 2 мг/л БАП; в — укоренение побегов и формирование растений; г — растения-регенеранты, высаженные в торфо-почвенную смесь; д — грозди микроклонально размноженных растений на третий год высадки в поле). В табл. 1 приведены результаты эффективности микроклонального размножения на стадии двух первых пассажей. Для сорта Спартавец Магарача в качестве эксплантатов использованы почки асептически выращиваемых растений, а для сорта Подарок Магарача — вновь простерилизованные почки, что обусловило рабочую потерю эксплантатов и отразилось на эффективности размножения сорта Подарок Магарача на втором пассаже. На среде с 2 мг/л БАП в течение 4—6 двухнедельных циклов было индуцировано обильное побегообразование. Сформировавшиеся зеленые побеги пересаживали на твердую питательную среду без фитогормонов, но с добав-

ением 10 мг/л гумата натрия, который способствовал формированию мощной корневой системы практически у 100 % регенерантов, что значительно облегчало адаптацию растений при высадке в почву. Двух- и трехлетние растения высаживали в мешочки с торфом и помещали в условия высокой влажности и температуры 26—29 °С. Ранее [3, 4] сообщалось о трудностях укоренения регенерантов и в связи с этим о частичных потерях при высадке в почву. Предложенная нами методика

позволяет практически полностью исключить потери на этапе адаптации к условиям *in vivo*.

На примере сорта Подарок Магарача проведена оценка идентичности регенерантов. Все они, как и исходная форма, имели диплоидный набор хромосом. Не обнаружено отличий по 15 позициям морфологического анализа листьев, форма гроздей также не отличалась от контрольных (см. рис. 1, *д*).

Индукция морфогенеза у подвойного сорта Феркаль. В недавно появившихся статьях по индукции морфогенеза описаны эксперименты по регенерации побегов на черешках листьев и листовой ткани *Vitis «Calawba»* [5], листьях подвоев Кобер 5ББ, СО4, 41Б [6], на гипокотылях и семядолях соматических эмбрионов *Vitis vinifera* сортов *Sultana* и *Grenache*, гибрида *Glorynive* [7].

В наших экспериментах был индуцирован стеблевой морфогенез на каллусных тканях сорта Феркаль, которые были перенесены со сред, содержащих БАП и ИУК, на регенерационные среды, включающие 1 мг/л зеатина с 0,2 мг/л ИУК, или только 2 мг/л БАП без ауксина. В течение одного—двух месяцев на каллусах появлялись почки. Каллусы с образовавшимися почками пе-



рис. 1

ренили на среду с добавлением 0,01 мг/л гибберелловой кислоты для дальнейшего роста побегов. На рис. 3 показан морфогенез почек и побегов у сорта Феркаль (*a* — образование почек на каллусной ткани листьев; *б* — рост побега на среде с добавлением гибберелловой кислоты). Причем следует отметить, что у подвойного сорта Феркаль удалось индуцировать как стеблевой морфогенез, так и эмбриогенез *in vitro*.

Это свидетельствует о высокой регенерационной способности генотипа сорта Феркаль.

Соматический эмбриогенез *in vitro*. В настоящее время имеется лишь несколько сообщений о регенерации растений винограда путем соматического эмбриогенеза из вегетативных тканей (например,

[8--10]). Данные о факторах, влияющих на этот процесс, пока фрагментарны и часто противоречивы. Поэтому методика регенерации для каждого вида, а иногда и сорта, должна быть выработана особо. Общая схема индукции соматического эмбриогенеза у винограда сортов Подарок Магарача и Феркаль, которой мы придерживались, приведена

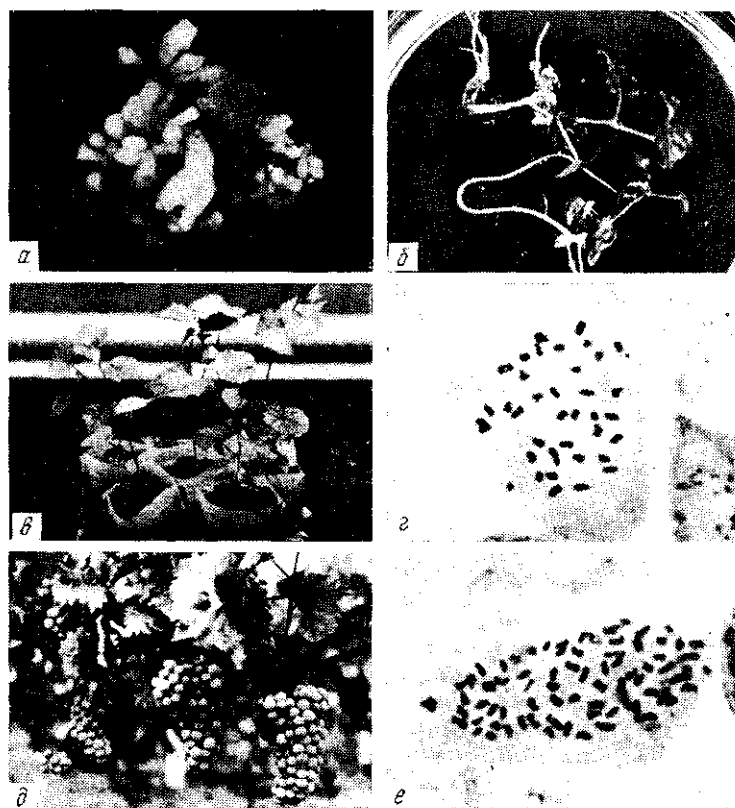


Рис. 2

в табл. 2, где представлены эффективные сочетания концентраций фитогормонов для каждого сорта. На рис. 2 приведены стадии получения растений путем индуцированного эмбриоидогенеза у сорта Подарок Магарача (а — формирование соматических эмбрионидов в каллусной ткани на среде с НУК и БАП; б — проростки из соматических эмбрионидов; в — растения из эмбрионидов, подготовленные к высадке в поле в паке-

Таблица 1
Эффективность микрклонального размножения на первом и втором пассажах культивирования эксплантатов винограда

Сорт Пассаж	Число эксплантатов	Число образовавшихся узлов кущения			
		Предполагаемое	%	Фактически полученное	%
Подарок Магарача					
I	11	55	100	43	78
II	15	75	100	65	87
Спартанец					
I	43	215	100	58	26
II	65	325	100	286	88

тах с торфом; *г* — соматклон № 92 в поле с гроздьями; *д* — диплоидный набор хромосом ($2n=2x=38$) в корешках растения-регенеранта № Э92; *е* — тетраплоидный набор хромосом ($2n=4x=76$) в корешках растения-регенеранта № Э115).

Эмбриогенный каллус был получен на средах с 2,4-Д и БАП, что согласуется с данными, приведенными ранее [8—10]. Формирование соматических эмбрионидов стимулировали НУК и БАП. В работе [9]



Рис. 3

эмбриониды развивались в каллусной ткани при наличии в питательной среде НУК. Различия как состава, так и концентраций фитогормонов, необходимых для индукции соматического эмбриогенеза, еще раз свидетельствуют о зависимости эффективности регенерации *in vitro* от генотипа растений. Так, на втором этапе эмбриогенеза сорту Подарок Магарача было достаточно добавления 2 мг/л НУК и 0,1 мг/л БАП для индукции появления эмбрионидов, в то время как для подвоя Феркаль необходимо было увеличить как концентрации НУК до 3 мг/л, так и концентрацию БАП до 3—5 мг/л. Следует также отметить, что подбор регуляторов роста и их концентраций для произвольного генотипа винограда необходимо осуществлять на каждом этапе индукции эмбриогенеза [11, 12].

После пересадки зрелых эмбрионидов на безгормональную среду MS в условиях освещения часть из них формировала семядольные листья и нормальные побеги, однако большинство погибало. Часто наблюдалось развитие вторичных эмбрионидов в районе корневого апекса. Эффективными условиями для нормального формирования растений оказались предварительное охлаждение эмбрионидов при 4 °С в течение

Таблица 2

Регенерация растений винограда путем соматического эмбриогенеза *in vitro*

Стадия эмбриогенеза	Сорт	Регуляторы роста (мг/л)
Индукция каллуса	Подарок Магарача	2,4-Д (2) + БАП (0,1)
	Феркаль	2,4-Д (2) + БАП (0,5)
Образование эмбрионидов	Подарок Магарача	НУК (2) + БАП (0,1)
	Феркаль	НУК (3) + БАП (3,5)
Формирование растений	Подарок Магарача	Безгормональная среда с инкубацией при 4 °С или гибберелловая кислота (0,4)
	Феркаль	

Таблица 3

Выход тетраплоидных растений винограда (Подарок Магарача) при регенерации посредством соматического эмбриогенеза из каллусов листьев

Эксперимент	Число регенерировавших растений	Число регенерировавших тетраплоидов	Частота появления тетраплоидов, %
Регенерация растений без обработки	200	5	2,5
Гамма-облучение каллусов	67	5	7,4
соматических эмбриондов	142	11	7,7
Обработка колхицином каллусов	65	3	4,5
соматических эмбриондов	27	1	3,7

2—4 недели или высадка эмбриондов на среду, содержащую гибберелловую кислоту, что согласуется с данными, приведенными в работе [10].

Цитологический анализ 200 полученных регенерантов выявил наличие пяти тетраплоидных клонов, которые, кроме того, отличались от родительской формы морфологией листа и более мощным габитусом. Среди диплоидных клонов в процессе полевых испытаний также обнаружены формы с измененной морфологией листа. На рис. 3 изображены метафазные пластинки тетраплоидного и диплоидного соматоклонов винограда сорта Подарок Магарача. Возникновение полиплоидов, а также наличие морфологически измененных растений среди регенерантов, полученных путем индуцированного эмбриогенеза, являются проявлением соматоклональной изменчивости в культуре ткани винограда. И хотя частота спонтанно появляющихся полиплоидов достаточно высока (2,5%), их выход может быть значительно увеличен за счет предварительной обработки эмбриогенного каллуса и непосредственно эмбриондов гамма-лучами или колхицином (табл. 3). Как показали результаты экспериментов по обработке гамма-лучами различных эксплантатов, наибольшее количество полиплоидов формировалось после обработки сравнительно низкими дозами до 40 Гр (см. табл. 3). Частота образования полиплоидов после обработки колхицином была выше, чем в контрольной группе, однако значительно уступала количеству полученных полиплоидных растений после обработки гамма-лучами.

Таким образом, изложенные результаты убедительно свидетельствуют о том, что применение методов культуры *in vitro* способствует расширению возможностей классического селекционного процесса винограда. Микроклональное размножение позволяет осуществлять быстрое тиражирование ценного селекционного материала и вырастить растения, не отличающиеся от исходной формы. В то же время для выведения новых форм винограда могут быть рекомендованы способы регенерации растений путем стеблевого морфогенеза или соматического эмбриогенеза, а также методы индуцированного мутагенеза *in vitro*. С помощью обработки гамма-лучами или при колхицировании эмбриогенных каллусов удается получить полиплоиды (тетраплоиды) у винограда, что может быть использовано в селекции для улучшения сортов.

Резюме

Вивчені можливості використання ряду методів клітинної інженерії для підвищення ефективності селекційного процесу винограду. Розроблена методика мікроклонування *in vitro* з індукцією адвентивних пагонів в присутності БАП дозволяє швидко розмножувати генетично ідентичний матеріал. Спосіб регенерації рослин із калусних тканин шляхом пагоноутворення або соматичного ембріогенезу можна рекомендувати для одержання нових форм винограду, зокрема тетраплоїдів. Частота виникнення поліплоїдних форм може бути збільшена за рахунок обробки первинних та ембріогенних калусів гама-опроміненням чи колхіцином.

Summary

The possibilities of application of some cell engineering methods for grape breeding were studied. The method of microclonal propagation *in vitro* using adventitious shoot formation by 6-benzylaminopurine allows to multiply genetically identical plant material. The methods of plant regeneration from callus tissues via organogenesis or somatic embryogenesis can be recommended for creation of new genotypes in particular tetraploids. The frequency of polyploid plant formation can be increased by mutagenic treatments of forming or embryogenic calli with gamma-rays or colchicine.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Monette P. L. Grapevine (*Vitis vinifera* L.) // Biotechnol. Agr. and Forest. Crops II.— 1988.— 6.— P. 3—37.
2. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.*— 1962.— 15, N 3.— P. 473—497.
3. Harris R. F., Stevenson J. H. *In vitro* propagation of *Vitis* // *Vitis*.— 1982.— 21, N 1.— P. 22—33.
4. Chee R., Pool R. M., Bucher D. A method for large scale *in vitro* propagation of *Vitis* // N. Y. Food and Life Sci. Bull.— 1984.— N 109.— P. 1—9.
5. Cheng Z. M., Reisch B. I. Shoot regeneration from petioles and leaves of *Vitis* × *tabruscana* «Catawba» // *Plant Cell Repts.*— 1989.— 8.— P. 403—406.
6. Clog E., Bass P., Walter B. Plant regeneration by organogenesis in *Vitis* rootstock species // *Plant Cell Repts.*— 1990.— 8, N 3.— P. 726—728.
7. Vilaplana M., Mullins M. S. Regeneration of grapevines (*Vitis* spp.) *in vitro*: formation of adventitious buds on hypocotyls and cotyledons of somatic embryos // *J. Plant Physiol.*— 1989.— 134, N 3.— P. 413—419.
8. Krul W. R., Worley J. F. Formation of adventitious embryos in callus cultures of «Seyval», a French hybrid grape // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*— 1977.— 102, N 3.— P. 360—363.
9. Stamp J. A., Meredith C. P. Somatic embryogenesis from leaves and anthers of grapevine // *Sci. Hort.*— 1988.— 35.— P. 235—250.
10. *Endogenous gibberellin-like substances in somatic embryos of grape (Vitis vinifera* × *Vitis rupestris*) in relation to embryogenesis and the chilling requirement for subsequent development of mature embryos / K. Takeno, M. Koshioka, R. P. Pharis et al. // *Plant Physiol.*— 1983.— 73, N 3.— P. 803—808.
11. Соматический эмбриоидогенез в культуре ткани винограда / А. О. Марченко, П. Я. Голодрига, В. П. Клименко, Н. М. Пивень // *Физиология и биохимия культ. раст.*— 1987.— 19, № 4.— С. 408—411.
12. Марченко А. О. Индуцированный эмбриоидогенез в культуре ткани винограда: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Казань, 1990.— 16 с.

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН УССР,
Киев

Получено 14.01.91

УДК 575.224+576.5

М. К. Зубко, Е. И. Зубко, Ф. В. Капранов

ИНДУКЦИЯ ХЛОРОФИЛЛДЕФЕКТНЫХ МУТАНТОВ ТАБАКА — МАРКЕРОВ ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Гамма-облучением семян и гаплоидных протопластов *Nicotiana tabacum* индуцированы хлорофиллдефектные мутанты с различным фенотипом. Для части из них доказан цитоплазматический или геномный тип наследования хлорофиллдефектности. Опыты по слиянию протопластов *N. tabacum*, *Atropa belladonna*, *Hyoscyamus niger* и *Scopolia carniolica* показали, что мутанты типа *albina* могут быть успешно вовлечены в программу по близкородственной и отдаленной соматической гибридизации.

Предложена простая и эффективная методика для слияния протопластов, лишенных хлорофилла.

© М. К. Зубко, Е. И. Зубко, Ф. В. Капранов, 1991.