

ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СЕМЯН ВИНОГРАДА РАЗНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

И. А. ПАВЛОВА

ФГБУН «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт
виноградарства и виноделия «Магарач» РАН»,
ул. Кирова, 31, г. Ялта, Республика Крым, 298600, Россия,
e-mail: pavlovairina1965@gmail.com

АННОТАЦИЯ

Разработана технология культивирования зародыша *in vitro* без вычленения из семени. Фрагмент оболочки семени с прилегающими к зародышу тканями защищает зародыш от резкого воздействия питательной среды, что способствует снижению стрессовой нагрузки и постепенной его адаптации. Выявлен ряд общих особенностей прорастания семян, роста и развития растений: продолжительный период прорастания; большая доля аномальных проростков в потомстве; встречаемость полиэмбрионии; высокая степень летальности растений на ранних стадиях формирования. Путь реализации морфогенетического потенциала зависит от генотипа, морфологии проростка и гормонального стимулирования процессов роста и развития. Прямой морфогенез наблюдался у проростков, имеющих выраженное подсемядольное колено и семядольные листья. Манипулирование концентрациями БАП позволяло регулировать ход формирования растения: его непосредственное развитие; пролиферация множественных побегов с последующим их укоренением; формирование побегов из каллусной ткани посредством геммогенеза, эмбриоидогенеза. Чем менее жизнеспособно потомство, тем большая доля растений развивается посредством непрямого морфогенеза. Четыре сорта винограда раннего срока созревания селекции института «Магарач» получены с помощью разработанной технологии.

Ключевые слова: морфогенез, БАП, зародыш, проросток, растение, кластер, полиэмбриония.

ВВЕДЕНИЕ

Различные технологии, позволяющие индуцировать развитие зиготического зародыша, извлеченного из оплодотворенной семечки, объединяют под понятием «эмбриоспасение» [1]. В настоящее время они широко используются в программах селекции столового винограда, обеспечивая относительно высокую частоту развития зародыша, способствуя повышению эффективности селекции на тетраплоидном и гипотетраплоидном уровне [2, 3]. Стеноспермокарпические сорта винограда используют в качестве материнской формы в скрещиваниях с семенными и бессемянными опылителями [4–8]. Эффективность технологии зависит от генотипов родительских пар, периода после опыления, среды культивирования, биологически активных веществ, условий культивирования. Для ускорения отбора по признаку бессемянности на ювенильной стадии и повышения эффективности селекции в последнее время применяется отбор с помощью молекулярных маркеров [9].

В институте «Магарач» разработана технология культивирования зародыша без вычленения из семени [10, 11]. Сегмент оболочки семени с прилегающими к зародышу тканями защищает зародыш от резкого воздействия питательной среды, что способствует снижению стрессовой нагрузки и постепенной его адаптации. Данная технология успешно применялась для получения жизнеспособного потомства у стеноспермокарпических семян, неполноценных семян раннеспелых сортов винограда, полученных в результате гибридизации или инцухта.

Вследствие открывшихся возможностей отбора бессемянных форм с помощью молекулярных методов диагностики возникла очевидная необходимость в обобщении результатов исследований по индукции морфогенеза и получения генеративного жизнеспособного потомства в системе *in vitro* для дальнейшего использования в селекции на бессемянность и раннеспелость.

ОБЪЕКТЫ, УСЛОВИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материалом для исследований были семена винограда, полученные в результате гибридизации стеноспермокарпических и раннеспелых сортов с бессемянными и семенными

опылителями (37 популяций, 1200 семян). Семена культивировали в соответствии с разработанной методикой [10, 11]. Их выделяли из ягод, обрабатывали холодом в течение 30 дней при температуре +5 °С. Стерилизацию семян осуществляли 96%-ным спиртом-ректификатом в течение 40 с, затем 0,1%-ным диоксидом – 8 мин с последующей трехкратной промывкой автоклавированной дистиллированной водой на протяжении 10 мин. В условиях ламинарного бокса после стерилизации и механической манипуляции по отсеканию халазальной части сегмент семени с зародышем вводили в культуру и культивировали на модифицированной среде Нича и Нича (Nitsch and Nitsch (NN), 1969), содержащей (в мг/л): NH_4NO_3 – 720; KNO_3 – 950; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 185; KH_2PO_4 – 85; CaCl_2 – 166; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 28; $\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 37; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 25; H_3BO_3 – 10; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 10; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,025; витамины: никотиновая кислота – 0,5; пиридоксин-НCl – 5,5; тиамин-НCl – 5,5; мезоинозит – 100; сахароза – 20 000; агар-агар – 7000. Содержание в среде 6-бензиламинопурина (БАП) – 0,5 мг/л [12]. Культивирование зародышей с сегментом семени проводили в темноте при +24...+25 °С. По мере прорастания семян проводили дальнейшие операции. Для последующего роста и развития проростков в стерильных условиях их пересаживали на среду Н, содержащую (в мг/л): NH_4NO_3 – 308; KNO_3 – 922; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 597; KH_2PO_4 – 122; CaCl_2 – 331; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 28; $\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 37; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 22,3; H_3BO_3 – 6,2; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 8,6; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,025; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,025; KJ – 0,83; мезоинозит – 20; никотиновую кислоту – 0,5; пиридоксина-НCl – 0,2; тиамина-НCl – 0,1; сахарозу – 10 000; агар-агар – 7000 [11]. Среда была безгормональная или с добавлением гибберелловой кислоты (ГА) в концентрации 0,25–0,30 мг/л. Для развития растений из аномальных проростков использовали среды Н с разным содержанием БАП: 0,20; 0,25; 0,40; 0,50 мг/л. Культивирование проростков, растений осуществляли на свету, при 16-часовом фотопериоде, интенсивностью 1500–2000 лк и температуре +27 °С. С целью сохранения полученного материала растения размножали микрочеренкованием (среда Н с 0,1 мг/л α -нафтилуксусной кислоты (НУК)), затем адаптировали и доращивали с использованием гидропонной культуры.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе исследований получены растения в основном от стеноспермокарпических семян, относящихся к III категории бессемянности по классификации К. В. Смирнова [13]. Но даже единичные проростки и растения, полученные из семян II категории бессемянности, указывают на возможность дальнейшей работы с этой категорией бессемянных форм. На эффективность прорастания влиял срок изоляции семян. Критерием служило начало размягчения ягоды. Отдельные стеноспермокарпические сорта сохраняли некоторую долю жизнеспособных семян и в период физиологической зрелости ягоды [14]. Дифференциация стеноспермокарпических сортообразцов винограда по экспрессии в культуре семян *in vitro* позволила определить оптимальные исходные формы для проведения дальнейших экспериментов и селекционной работы. Например, в качестве материнских форм целесообразно использовать такие сорта, как Ялтинский бессемянный, Южнобережный, Венера и др. Высокие результаты прорастания семян и развития растений в условиях *in vitro* зафиксированы при использовании сорта Флора в качестве материнской формы в скрещиваниях [15].

В процессе исследований выявлены некоторые особенности прорастания семян винограда в условиях *in vitro*. Так, при прорастании из надрезанной части появлялись сначала семядольные листья, а затем уже подсемядольное колено и корешок, тогда как в норме из кювика появляется корешок, а затем подсемядольное колено, последними от семенной кожуры освобождаются семядольные листья (рис. 1). И если по каким-либо причинам зародыш самостоятельно неспособен к прорастанию, то отсекание халазальной части играет в этом процессе решающую роль. Такой путь прорастания характерен для большей части стеноспермокарпических семян. У ранних сортов 50 % семян проросло обычным способом. Другой особенностью прорастания является нарушение ориентации в пространстве (тропизм), корешок растет вертикально вверх, а семядольные листья находятся на питательной среде. Это явление неоднократно наблюдалось при

проращении стеноспермокарпических семян. Часто и после пересадки на новую среду растение сохраняло эту ориентацию, что приводило к гибели. У столового винограда семенные покровы более плотные, при обычном проращении они не открывались, что не давало возможности развернуться семядольным листьям. Механическое удаление покровов затруднено, в дальнейшем это приводило к усыханию подсемядольного колена и гибели растения.

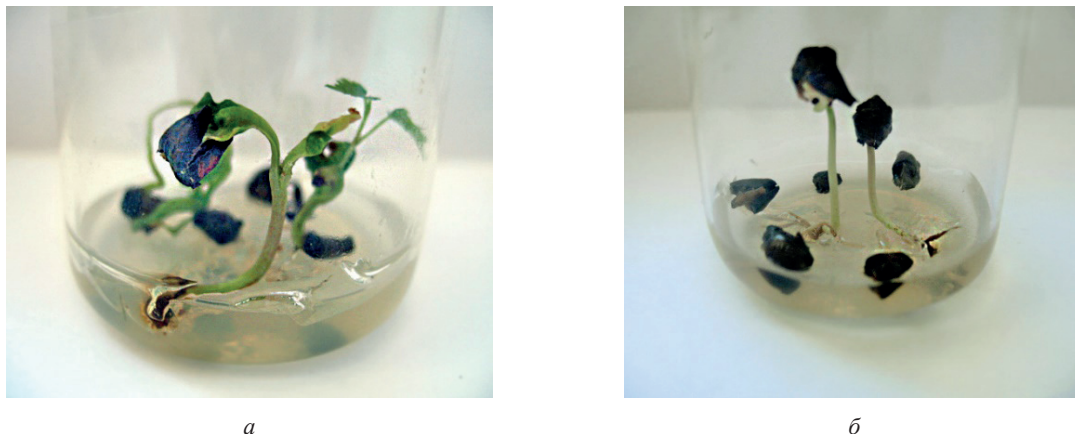


Рис. 1. Проращение: *а* – стеноспермокарпических семян; *б* – семян раннеспелого сорта

У раннеспелых сортов наблюдался в основном прямой морфогенез, часть проростков развивалась в растения в результате непосредственного роста осевых органов. Показатель проращения в среднем составил 46,9 %. Отклонения от нормального развития, различные аномалии семядольных листьев, подсемядольного колена, каллусообразование, формирование множественных побегов, что характерно для проростков, развивающихся в условиях *in vitro*, фиксировали в единичных случаях. Растения развивались с крепким побегом, относительно крупной листовой пластинкой и мощной корневой системой. Отмечен высокий процент (71,1 %) развития растений от проростков. В отдельных случаях образования для растений требовалось пять этапов культивирования с индукцией образования кластеров почек (прямой органогенез) [16].

В ходе исследования установлено два пути реализации морфогенетического потенциала генеративного потомства винограда: прямой и непрямой (рис. 2).

Путь реализации морфогенетического потенциала генотипа зависел и от морфологии проростка. Прямой морфогенез наблюдался у проростков с выраженным гипокотилем и семядольными листьями. Доля таких проростков в потомстве стеноспермокарпических семян была невелика, их дальнейшее развитие проходило без гормональной стимуляции. Проростки с аномальным строением осевых органов чувствительны к содержанию БАП в культуре [14].

Прямой морфогенез у аномальных проростков, при котором формировался один или несколько побегов, наблюдался на средах с 0,25 мг/л БАП. У отдельных аномальных проростков формирование растений путем непрямого морфогенеза отмечали после снижения в пассажах концентрации БАП с 0,5 до 0,25 мг/л (рис. 2). Непрямой морфогенез, при котором формировались кластеры вторичных эмбриоидов, происходил после нескольких субкультур на средах с 0,5, 0,4 и 0,2 мг/л БАП. Образование побегов индуцировали на отдельных структурах кластеров путем длительного культивирования субкультур на средах с 0,4 мг/л БАП (рис. 3).

В ходе исследований обнаружено явление полиэмбрионии, которое у винограда встречается и в полевых условиях, однако крайне редко. Оно было характерно как для стеноспермокарпических семян, так и семян раннеспелых сортов. В комбинациях, где Ялтинский бессемянный являлся материнской формой, экспрессия полиэмбрионии проявилась наиболее значительно. В ходе культивирования множественных проростков наблюдалась высокая степень летальности. Из двух проростков обычно продолжал дальнейший рост и развитие только один. Множественные проростки в большей части имели аномальное строение, часто образовывали кластеры (рис. 4).

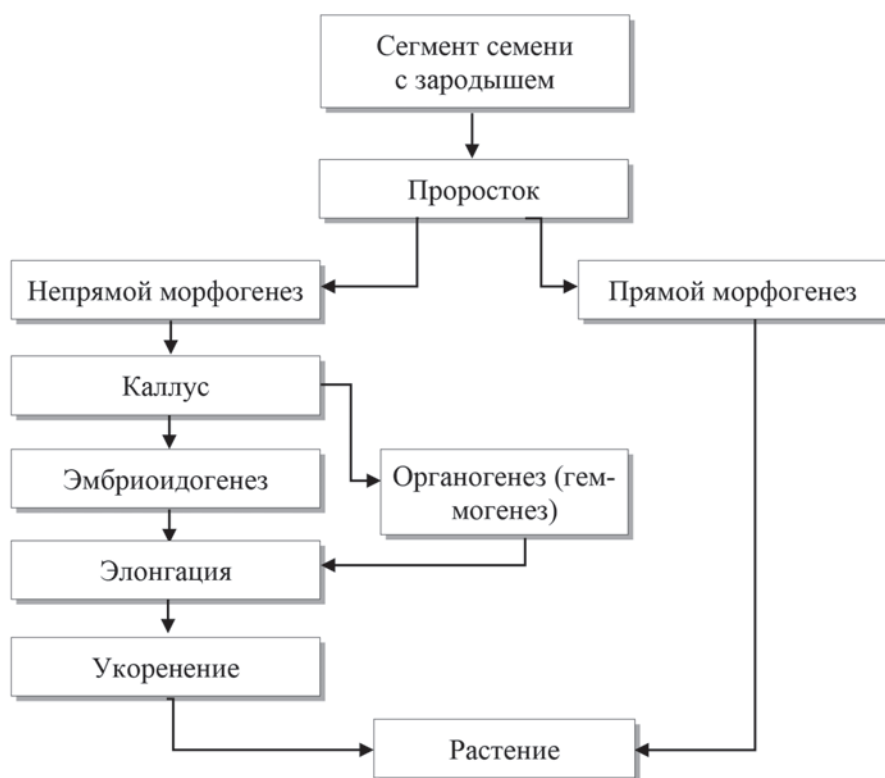


Рис. 2. Схема реализации морфогенетического потенциала семенного потомства винограда



Рис. 3. Развитие аномальных и множественных проростков винограда

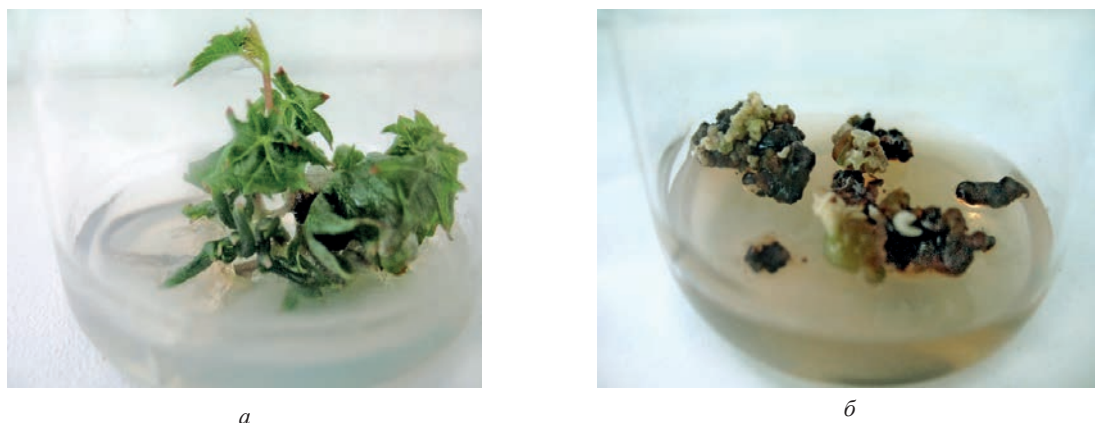


Рис. 4. Развитие полиэмбрионных семян винограда:
а – множественные проростки; б – кластеры вторичных эмбрионов

Культивирование в условиях *in vitro* позволило создать не только оптимальные условия для проращивания семян, но и способствовало регулированию процессов роста и развития, путей морфогенеза. Чем менее жизнеспособное потомство, тем бóльшая доля растений развивается посредством непрямого морфогенеза в результате образования каллуса с последующей регенерацией в направлении органогенеза или эмбриоидогенеза.

Полученные в ходе исследований растения перед адаптацией размножали *in vitro* микроочисткой, затем уже полученные таким образом саженцы новых гибридных форм адаптировали к условиям *ex vitro* и доращивали до стандартных размеров (рис. 5). Изучение новых селекционных форм на селекционных участках позволило выделить перспективные столовые и бессемянные гибриды винограда. В настоящее время в перечне сортов селекции института «Магарач» четыре сорта винограда раннего срока созревания, полученные вследствие культивирования семян *in vitro*: Солнечная гроздь, Мускат Крыма, Черноморец, Заря.

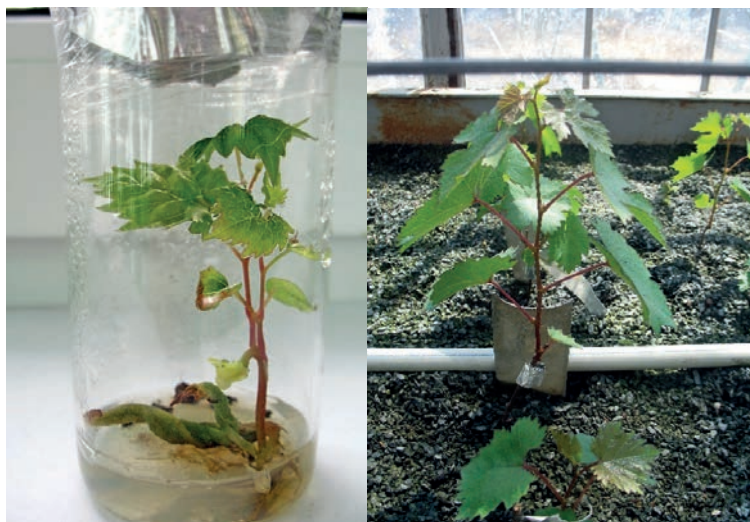


Рис. 5. Растение винограда, полученное в культуре из стеноспермокарпического семени *in vitro* и *ex vitro*

Таким образом, проведенный анализ результатов исследований показал, что селекция винограда на бессемянность и раннеспелость остается востребованной и технологичной, а с использованием молекулярно-генетических методов диагностики позволит еще в культуре выделить бессемянные формы. Данные исследования в институте «Магарач» проведены при изучении гибридных популяций винограда в полевых условиях [17]. Применение в перспективе маркер-ассоциированной селекции на бессемянность при отборе в гибридных популяциях *in vitro* даст воз-

возможность полностью исключить семенные гибридные формы винограда из опытных популяций и соответственно сократить занимаемые площади, трудовые и энергетические ресурсы в 2 раза на период от 3–4 лет и более.

ВЫВОДЫ

Проведенный анализ результатов исследований показал, что в селекции винограда на бессемянность и раннеспелость для получения жизнеспособного потомства целесообразно использование разработанного способа, который включает культивирование зародыша с сегментом семени, полученного в результате отсечения халазальной части, в контролируемых условиях *in vitro* на модифицированных средах. Путь реализации морфогенетического потенциала гибридного потомства в системе *in vitro* зависел от генотипа, морфологии проростка и гормонального стимулирования процессов роста и развития. Чем менее жизнеспособно потомство, тем большая доля растений развивается посредством непрямого морфогенеза, что необходимо учитывать в дальнейшем.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. The state-of-the-art of grapevine biotechnology and new breeding technologies (NBTS) / L. D. Costa, M. Malnoy, D. Lecourieux [et al.] // *OENO One*. – 2019. – Vol. 53, № 2. – P. 205–228. – DOI: 10.20870/oeno-one.2019.53.2.2405.
2. The process of embryo abortion of stenospermocarpic grape and it develops into plantlet *in vitro* using embryo rescue / S. Li, K. Liu, S. Yu [et al.] // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. – 2020. – Vol. 143. – P. 389–409. – DOI: 10.1007/s11240-020-01926-y.
3. Ismail, A. S. M. *In vitro* embryo rescue of flame seedless grape / A. S. M. Ismail, E. H. El-Bassel, Bahan M. Khalil // *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*. – 2021. – Vol. 21, № 2. – P. 98–107. – DOI: 10.5829/idosi.aejaes.2021.98.107.
4. *In vitro* embryo rescue for the production of hypotetraploids after cross between hypotetraploid and tetraploid grape cultivars / S. H. Kim, J. H. Kwon, Y. S. Park, J. Y. Heo // *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. – 2020. – Vol. 48, № 1. – P. 503–508. – DOI: 10.15835/nbha48111795.
5. The correlation between embryo rescue and hormonal changes in seedless grapes / G. Li, K. Li, Yi. Lu [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. – 2024. – Vol. 15. – P. 1460886. – DOI: 10.3389/fpls.2024.1460886.
6. An optimized procedure for plant recovery from somatic embryos significantly facilitates the genetic improvement of *Vitis* / Z. T. Li, K.-H. Kim, S. A. Dhekney [et al.] // *Horticulture Research*. – 2014. – Vol. 27. – P. 1–7. – DOI: 10.1038/hortres.2014.27.
7. Study on improving plantlet development and embryo germination rates in *in vitro* embryo rescue of seedless grapevine / Y. T. Jiao, Z. Q. Li, K. Y. Xu [et al.] // *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. – 2018. – Vol. 46. – P. 39–53. – DOI: 10.1080/01140671.2017.1338301.
8. *In vitro* germination to overcome dormancy in seeds of ‘Red Globe’, ‘Italia’ and ‘Niagara Rosada’ grapes / A. L. Generoso, A. P. Viana, V. S. Carvalho, O. D. Costa Júnior // *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*. – 2019. – Vol. 41. – P. 1–6. – DOI: 10.1590/0100-29452019495.
9. Breeding for cold-resistant, seedless grapes from Chinese wild *Vitis amurensis* using embryo rescue / Q. Liu, J. Zhang, Y. Wang [et al.] // *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. – 2016. – Vol. 44. – № 2. – P. 136–151. – DOI: 10.1080/01140671.2016.1153489.
10. Патент 17919А, МПК 6 А01Н4/00, А01Н1/04. Спосіб вирощування рослин з важко пророщуваного насіння і відбору стійких генотипів на рівні зародків : № 95010191 : заявлено 11.01.1995 : опубл. 03.06.1997 / Зленко В. А., Котіков І. В., Трошин Л. П., Павлова І. О. ; заявники : Зленко В. А., Котіков І. В., Трошин Л. П., Павлова І. О. – 2 с.
11. Деклараційний патент на корисну модель № 14365. Спосіб отримання рослин винограду від вихідних форм з низькою фертильністю : № 10662 : заявлено 11.11.2005 : опубл. 15.05.2006 / Павлова І. О., Клименко В. П. ; заявники : Павлова І. О., Клименко В. П. – 2 с.
12. Nitsch, J. P. Haploid plants from pollen grains / J. P. Nitsch, C. Nitsch // *Science*. – 1969. – № 163. – P. 85–87.
13. Смирнов, К. В. Бессемянность у винограда и селекция бессемянных сортов / К. В. Смирнов // *Проблемы виноградарства. Итоги науки и техники ВИНТИ. Серия растениеводство*. – 1979. – Т. 4. – С. 3–49.
14. Павлова, И. А. Преодоление нежизнеспособности гибридных семян при стenospermocarпии у винограда / И. А. Павлова, В. П. Клименко // *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія*. – 2009. – Вип. 3 (18). – С. 69–74.
15. Павлова, И. А. Селекция столового винограда на раннеспелость с применением методов *in vitro* / И. А. Павлова, В. В. Лиховской // *«Магарач». Виноградарство и виноделие*. – 2013. – № 4. – С. 4–6.
16. Влияние генотипа и регуляторов роста на развитие растений из зиготических зародышей недоразвитых семян винограда в культуре *in vitro* / В. А. Зленко, И. А. Павлова, В. П. Клименко [и др.] // *«Магарач». Виноградарство и виноделие*. – 2023. – Т. 25, № 4. – С. 334–339. – DOI: 10.34919/IM.2023.90.97.

17. Концептуальное развитие генетики и селекции винограда / В. В. Лиховской, В. А. Волынкин, А. А. Полулях [и др.] // Бюллетень ГНБС. – 2024. – Вып. 152. – С. 57–65.

SUMMARY OF *IN VITRO* CULTIVATION RESULTS OF GRAPE SEEDS OF DIFFERENT ORIGINS

I. A. PAVLOVA

Abstract

A technology for *in vitro* embryo cultivation without extraction from the seed has been developed. A seed coat fragment with tissues adjacent to the embryo protects it from abrupt exposure to the culture medium, reducing stress and promoting gradual adaptation. Several common features of seed germination, seedling growth, and plant development were identified: a prolonged germination period; a high proportion of abnormal seedlings; occurrence of polyembryony; and a high rate of plant lethality at early developmental stages. The pathway for realization of morphogenetic potential depended on genotype, seedling morphology, and hormonal stimulation of growth and development processes. Direct morphogenesis was observed in seedlings with a well-developed hypocotyl and cotyledonary leaves. Manipulation of BAP concentrations enabled control over the plant formation process, including: direct plant development, proliferation of multiple shoots followed by rooting, and shoot formation from callus tissue via gemmogenesis or embryoidogenesis. The less viable the progeny, the more frequently plants developed through indirect morphogenesis. Four early-maturing grape cultivars bred by the Magarach Institute were obtained using the developed technology.

Keywords: morphogenesis, BAP, embryo, seedling, plant, cluster, polyembryony.

Поступила в редакцию 03.03.2025