

В.А.Волынкин, д.с.-х.н., зав. отделом селекции, генетики винограда и ампелографии,  
 В.А.Зленко, к.с.-х.н, научный сотрудник отдела селекции, генетики винограда и ампелографии,  
 А.А.Полулях, к.с.-х.н, старший научный сотрудник отдела селекции, генетики винограда и ампелографии,  
 В.В.Лиховской, зав. сектором питомниководства отдела селекции, генетики винограда и ампелографии  
 Национальный институт винограда и вина «Магарач» УААН

## СЕЛЕКЦИЯ МЕЖРОДОВЫХ ГИБРИДОВ ВИНОГРАДА СЕМЕЙСТВА *VITACEAE* НА ОСНОВЕ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АЛЛОПОЛИПЛОИДИИ И КУЛЬТУРЫ ЗАРОДЫШЕЙ *IN VITRO*

Эволюция у представителей видов рода *Vitis* и в целом родов семейства *Vitaceae* происходила на разных континентах под воздействием специфических биотических и абиотических факторов, влияющих на процесс естественного отбора. Так у дикорастущего винограда Европы *Vitis vinifera ssp. silvestris* Gmel., и у окультуренных сортов, относящихся к *Vitis vinifera ssp. sativa* D.C., не сформировались признаки устойчивости к филлоксере, возбудителю милдью, поскольку эти патогены впервые появились в Европе только в XIX веке. Они были завезены с американского континента, на котором на протяжении длительного времени протекла их сопряженная эволюция с формами винограда, происходящими также с американского континента.

Сохранение виноградарства в Европе на основе селекции осуществлялось в двух радикальных кардинально отличающихся направлениях: 1) создание филлоксероустойчивых подвоев (привитая культура винограда) и 2) выведение устойчивых с высокой продуктивностью и высоким качеством урожая сортов путем скрещивания американских видов с сортами *V. vinifera*. Однако если виды рода *Vitis* подрода *Euvitis* легко скрещиваются между собой, то получить гибриды между видом *V. vinifera* (подрод *Euvitis*, 38 хромосом) с видом *V. rotundifolia* Michaux (подрод *Muscadinia*, 40 хромосом) удалось с большим трудом [11]. Фертильности таких гибридных семян удалось достичь лишь только после их полиплоидизации (аллотетраплоидии) [12].

В 1922-1924 гг. Г.Д. Карпеченко экспериментально доказал возможность получения фертильных межродовых гибридов редьки и капусты методом аллополиплоидии (аллотетраплоидии) [4,5]. Но получение межродовых гибридов, применяя методы аллополиплоидии и культуры *in vitro* изолированных из семян зародышей, даже у культур растений, роды которых представлены широким спектром полиплоидных рядов, связано с большими трудностями из-за несовместимости различных ро-

*Используя метод аллополиплоидии и культуры зародышей in vitro, у винограда после межродовой гибридизации получены растения, но для установления истинности их межродового происхождения необходимы дополнительные молекулярно-генетический и цитогенетический анализы.*

дов, принадлежащих к одному семейству растений на генетическом (генетически нестабильных) и физиолого-биохимическом уровнях [6,8]. Также генетически нестабильными являются межродовые соматические гибриды, полученные в результате слияния протопластов в культуре *in vitro* [2].

Межродовые гибриды у семейства *Vitaceae* пока не получены. Создание же межродовых гибридов у винограда (хотя бы с частичным присутствием генов различных родов из-за возможной элиминации хромосом одного из них) позволит получить качественно новые иммунные к биотическим и абиотическим факторам среды генотипы. В последующем, урожай лучших из них как сортов, может иметь не только традиционное, но и новое направление использования, в частности в фармакологической и парфюмерной промышленности.

Целью исследований являлось создание гибридов между сортами *V. vinifera* (род *Vitis*, 2n=38 хромосом) и видами других родов (*Ampelopsis* и *Parthenocissus*, 2n = 40 хромосом) семейства *Vitaceae*: *Ampelopsis acontifolia* Lavalee, *Ampelopsis cordata* Michaux, *Ampelopsis serjaniefolia* Regel, *Parthenocissus inserta* Fritch и *Parthenocissus quinquefolia* Planch.

Применялся традиционный путь преодоления генетической несовместимости при межродовой гибридизации (разного количества диплоидного набора хромосом у исходных форм), заключающийся в методе аллополиплоидии – использовании для скрещивания полиплоидных родительских форм. Наличие парных хромосом каждого рода у гибридных семян необходимо для конъюгации между хромосомами в процессе прохождения мейоза и образования гамет, что может обеспечить фертиль-

ность гибридных семян [7]. Для достижения этой цели проводились эксперименты параллельно по двум направлениям.

Первое направление исследований заключалось в том, чтобы, воздействуя раствором колхицина на распускающиеся почки с зачаточными соцветиями последующим методом инцухта получить тетраплоидные семена, а затем и семена у сортов вида *V. vinifera* и у видов родов *Ampelopsis* и *Parthenocissus*. В дальнейшем, на 3-5-й годы, после вступления этих полиплоидных (тетраплоидных) семян в плодоношение, провести между ними межродовую гибридизацию с дальнейшим культивированием изолированных зародышей на ранних стадиях развития и выращиванием из них семян – межродовых гибридов.

С другой стороны, по данным Ш.Г. Топалэ [9] среди сортов *V. vinifera* найден тетраплоидный сорт Шасла Гро Куляр белая и сорта, у которых встречаются полиплоидные клетки при определенных погодных условиях (диплоидно-тетраплоидные цитохимеры): Пикпуль черный, Харты про Ливье, Баян ширей, Шабаш крупноядный, Шабаш, Рислинг рейнский, Мускат александрский и Яхеи (с женским типом цветка). Для получения полиплоидов путем обработки распускающихся почек колхицином использовались эти сорта – диплоидно-тетраплоидные цитохимеры, прогнозируя возможность образования полиплоидных клеток, которые у них будут более жизнеспособные и у этих сортов большая вероятность образования диплоидных гамет в результате мейоза.

Для определения соответствующих сроков и концентраций применения колхицина были проведены в 2006-2008 годах обработки почек в фазе распус-



кания. Для обработки применялись концентрации колхицина в растворе  $H_2O$ : 0,12; 0,25, и 0,5%. Изменения побегов и листьев наблюдались только в варианте обработки 0,5% раствором колхицина. Побеги имели утолщенную форму с короткими междоузлиями. Листья очень сильно отличались от контроля и имели гофрированную форму, с интенсивной темно-зеленой окраской. На два узла выше соцветия наблюдалось разветвление побегов. После разветвления развивались побеги обычной толщины и длины междоузлий, свойственной сорту. Таким образом, полученные побеги до ветвления, в результате обработки раствором колхицина в концентрации 0,5%, соответствовали по вышеизложенным морфологическим признакам полиплоидным формам. Раздвоенные побеги по морфологическим признакам, по всей вероятности, являлись диплоидными [1].

Для получения полиплоидных сеянцев почки растений родов *Ampelopsis* и *Parthenocissus*, а также инцухта миксоплоидных сортов *V. vinifera* весной на стадии распускания были обработаны 0,5 % раствором колхицина в воде с добавкой 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП). После инцухта соцветий у этих генотипов осенью были получены семена, которые различаются по форме и размерам у каждого генотипа (возможно в результате полиплоидизации). Всего получено семян: *Ampelopsis acutifolia* (1846 шт.), *Ampelopsis cordata* (2245 шт.), *Ampelopsis serjaniefolia* (1723 шт.), *Parthenocissus inserta* (1162 шт.) и *Parthenocissus quinquefolia* (701 шт.); у тетраплоида *Шасла Гро Куляр белая* (313 шт.), и у миксоплоидных сортов рода *Vitis* вид *V. vinifera*: Харты про Ливье (1061 шт.), Пикпуть черный (1276 шт.), Шабаш крупноягодный (432 шт.), Шабаш (1244 шт.), Рислинг рейнский (123 шт.) и Мускат александрийский (70 шт.). Эти семена будут высеяны и среди сеянцев, как по морфологическим признакам, так и методом цитогенетического анализа будут выделены полиплоидные сеянцы. В последующем, через 3-5 лет после вступления тетраплоидных сеянцев в пору плодоношения будет проводиться межродовая гибридизация между тетраплоидными сеянцами (род *Vitis* с родами *Ampelopsis* и *Parthenocissus*).

Другое направление наших исследований также с применением методов аллотетраплоидии и культуры *in vitro* незрелых зародышей, выделенных из незрелых семян, направлено на ускорение межродовой гибридизации. Исследовались следующие генотипы винограда: 1) естественный тетраплоидный сорт Шасла Гро Куляр белая (обоеполюй, проводилась кастрация цветков); 2) миксоплоидный сорт Яхеи (женский тип цветка); 3) миксоплоидные сорта Харты про Ливье и Пикпуть черный (обоеполюе, проводилась кастрация цветков). Эти генотипы были обработаны колхицином на стадии распускания почек с находящимися в них зачаточными соцветиями для полиплоидизации яйцеклеток. Соцветия этих сортов – относящихся к роду *Vitis* были опылены пыльцой видов *Ampelopsis acutifolia* и *Parthenocissus inserta* взятой от соцветий, развившихся на побегах, которые в свою очередь развились

из почек, обработанных колхицином на стадии распускания.

Так как в семенах, полученных в результате межродовой гибридизации, наблюдается гибель зародышей из-за физиолого-биохимической несовместимости различных родов, в нашем эксперименте семена собирались на ранних стадиях после оплодотворения. Собранные на 40 день после гибридизации незрелые ягоды хранились в холодильнике в течение 8-12 недель при  $-2^{\circ}C$ . Затем из ягод выделялись семена, которые стерилизовались 10% «Доместас» в течение 12-15 мин., затем 96% спиртом 10-20 сек. и промывались 4-5 раза стерильной водой. Семена в чашках Петри в ламинарном боксе разрезались поперек и носики семян (части семян, в которых находились зародыши) были высажены в 3 варианта жидкой среды, различающихся между собой содержанием регуляторов роста: 1) 0,2 мг/л БАП для развития из глобулярных зародышей сердцевидных; 2) 0,1 мг/л  $\beta$ -индолуксусной кислоты (ИУК) и 30 мг/л гумата Na для превращения сердцевидных зародышей в торпедовидные; 3) 0,2 мг/л гибберелловой кислоты ( $GA_3$ ) и 0,2 мг/л БАП для развития проростков с зелеными семядолями и гипокотильями из торпедовидных зародышей. Основа жидкой среды состояла из среды для размножения растений [3] следующего состава макроэлементов: 308 мг/л  $NH_4NO_3$ , 922 мг/л  $KNO_3$ , 597 мг/л  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 82 мг/л  $KH_2PO_4$ , 331 мг/л  $CaCl_2$ ; микроэлементы и Fe-EDTA [10], 20 мг/л мезоинозита, 0,5 мг/л никотиновой кислоты и 10 г/л сахарозы, но с повышенным содержанием витаминов тиамина и пиридоксина (по 5 мг/л); pH каждого варианта среды перед автоклавированием (1 атм, 25 мин) было доведено NaOH до 5,6.

При разрезании семян перед высадкой на 3 варианта жидких сред были выявлены специфические сорто-биологические особенности. У сорта Яхеи при межродовой гибридизации образуются пустые семена (без зародышей и эндосперма); у сортов Шасла Гро Куляр белая и Харты про Ливье – как пустые семена, так и с эндоспермом, но проростки не развивались, а у сорта Пикпуть черный почти все семена были с эндоспермом, но при этом редко происходило развитие проростков и редко образовывались у них побеги. В результате скрещивания сорта Пикпуть черный с *Ampelopsis acutifolia* из 69 частей семян с эндоспермом после 40 дней культивирования на 3-х вариантах жидких сред выросло только 20 проростков (30%). При этом 17 из них были зе-

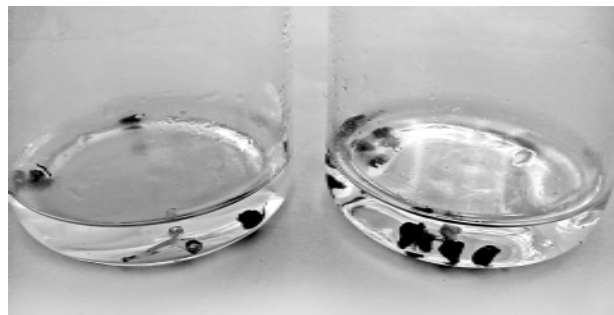


Рис. 1. Семена разрезаны поперек и передние части семян с зародышами высажены на жидкие среды.



Рис. 2. Морфологические отклонения в развитии.



Рис. 3. Образование побегов.

леними, у трех из которых развились побеги (21%). Три проростка были с белыми семядолями и гипокотильями (15% альбиносов от всех развившихся проростков). Из 72 частей семян с эндоспермом скрещивания Пикпуть черный с *Parthenocissus inserta* выросло меньше как проростков (2 зеленых и 1 белый проросток), так и побегов из них (1 побег) (рис. 1).

У всех семян с развившимся эндоспермом, полученных в результате межродовых скрещиваний в большей или меньшей степени был выражен некроз оболочек семян и эндосперма, что указывает на физиологическую несовместимость родов на биохимическом уровне. Следует заключить, что в дальнейшем необходимо собирать и высаживать семена на более ранних этапах их развития (10, 15 и 20 дней после гибридизации). Проростки пересажены на питательную твердую среду для развития у них побегов и корней. Состав концентраций компонентов этой среды отличается от приведенной выше основы среды более низкой концентрацией витаминов (0,1 мг/л тиамина и 0,2 мг/л пиридоксина), добавкой 30 мг/л гума-

та Na, 7,5 г/л агара и концентрацией регуляторов роста: 0,15 мг/л ИУК, 0,005 мг/л  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты (НУК) и 0,001 мг/л БАП; значение pH было доведено NaOH до 6,0-6,2 перед добавкой агара и автоклавированием. Как на жидких средах, так и на твердой среде, на которую были пересажены проростки, наблюдается дальнейшее их аномальное развитие (рис. 2) и рост побегов у некоторых из них (рис. 3).

Окончательный вывод о том, что полученные растения являются межродовыми гибридами, или оплодотворение произошло в результате случайного попадания пыльцы сортов рода *Vitis*, или произошла частичная или полная элиминация хромосом одного из родов, можно будет сделать после молекулярно-генетического и цитогенетического анализов исходных материнских форм и растений, развившихся из гибридных семян в культуре зародышей *in vitro*.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волынкин В.А., Зленко В.А., Лиховской В.В. Селекция винограда на бессемянность, крупноплодность и раннеспелость на полиплоидном уровне// Труды НИВиВ «Магарач». - 2009. - Т. XXXIX. - С.5-10.
2. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Клеточная инженерия растений. - К., 1984. - 160 с.
3. Зленко В.А. Диагностика хозяйственно-ценных признаков и клональное микроразмножение винограда *in vitro*. - Автореф. дис. канд. с.-х. наук, Ялта. - 1991. - 22 с.
4. Карпеченко Г.Д. Полиплоидные гибриды *Raphanus sativus* L. x *Brassica oleraceae* L.// Тр. По прикл. ботанике, генетике и селекции. - 1927. - Т.17. - №3. - С.393-398.
5. Карпеченко Г.Д. Теория отдаленной гибридизации. - М.-Л., 1935. - 64 с.
6. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. - К., 2005. - 724 с.
7. Лобашев М.Е. Генетика. - Л., 1967. - 751 с.

8. Першина Л.А., Шумный В.К. Проблемы использования методов *in vitro* при отдаленной гибридизации злаков// Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. - М., 1991. - С.102-114.

9. Топалэ Ш.Г. Полиплоидия у винограда. Систематика, кариология, цитогенетика. - Кишинев, 1983. - 215 с.

10. Murashige T. Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture// *Physiol. Plant.* - 1962. - V.15. - P.473-497.

11. Patel G.I., Olmo H.P. Cytogenetics of *Vitis*: I. The hybrid *V. vinifera* x *V. rotundifolia*// *Amer. J. Bot.* - 1955. - V. 42. - P.36-42.

12. Patel G.I., Olmo H.P. Induction of polyploidy in sterile  $F_1$  hybrid of *Vitis vinifera* L. and *Vitis rotundifolia* Michx// *Phyton* (B.A.). - 1956. - V.7. - № 2. - P.12-15.

Поступила 20.03.2009  
©В.А.Волынкин, 2009  
©В.А.Зленко, 2009  
©А.А.Полулях, 2009  
©В.В.Лиховской, 2009