

Національний науковий центр
«Інститут виноградарства і виноробства ім. В.Є.Таїрова»,
Україна

РОЗРОБКА МЕТОДИЧНИХ ПРИЙОМІВ ДЛЯ КУЛЬТУРИ ПИЛЯКІВ ВИНОГРАДУ IN VITRO

У статті наведені результати досліджень з культури пиляків винограду *in vitro*. З метою створення оптимальних умов для андрогенезу *in vitro* було вивчено вплив типу поживного середовища, температурного режиму культивування на приживлюваність пиляків, а також на процеси калюсогенезу та ембріогенезу. Виявлена доцільність комплексного використання поживного середовища Уайта та зниженої температури (4°C) на первинних етапах культивування експлантів.

Ключові слова: пиляки винограду, культура *in vitro*, поживне середовище, калюсогенез.

Сучасний розвиток селекційних методів орієнтований на експериментальні роботи з гаплоїдами. Гаплоїдні рослини є цінним генетичним матеріалом, який широко використовується в селекції [1, 2, 3]. Головний інтерес до гаплоїдів пов'язаний з можливістю їх використання в якості посередників для одержання гомозиготних рослин [4, 5]. Успішно застосовуються гаплоїди в біохімічній селекції на імунітет, стійкість до хвороб. Гаплоїдія може широко застосовуватися при кількісному генетичному аналізі сільськогосподарських рослин.

Завдяки використанню методів гаплоїдії можна вже протягом 1 - 2 років одержати широку інформацію про стійкість окремих гібридних комбінацій до основних хвороб та оцінку урожайності [6, 7]. Використання гаплоїдних рослин дає змогу прискорити селекційний процес на 3 - 6 років і більше [8].

Одним з найбільш ефективних методів є культура пиляків *in vitro* (андрогенез) [9]. Як відмічають Е. Р. Галієва, Н. Н. Круглова та інші [10] андроклінія, або андрогенез *in vitro* – це утворення в умовах культури *in vitro* рослин-регенерантів із морфогенетично компетентної клітини пиляка.

На даний час відомо, що культуру пиляків *in vitro* застосовують у більш ніж 200 видів рослин [9, 11]. Однак значущі результати одержані лише на деяких культурах (рис, ячмінь, пшениця, кукурудза, картопля, тютюн, рослини з сімейства хрестоцвітних) [3, 11, 12], причому, лише в одиничних процес одержання гаплоїдів наближається до рівня стандартної методики.

Досліджень з культури пиляків винограду в літературі зустрічається набагато менше, ніж з інших культур, що, очевидно, пов'язано із особливостями винограду як багаторічної рослини та його складною генетичною структурою. На сьогодні єдиної думки учених щодо технології культури пиляків винограду *in vitro* немає. Одержані результати досліджень є суперечливими.

Потрібна детальна розробка методичних прийомів для культури пиляків винограду *in vitro*. Розробки потребують питання підбору поживних середовищ та концентрацій фітогормонів для введення пиляків в культуру *in vitro*, подальшої індукції ембріогенезу, органогенезу. Актуальним є питання створення оптимальних умов культивування пиляків, використання різних прийомів для індукції калюсогенезу та органогенезу.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проводили в лабораторії культури тканин відділу розсадництва та розмноження винограду ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» на сортах винограду Ріпарія х Рупестріс 101-14 (РхР 101-14), Комета, Кардішах, Ярило, Загрей. Планування роботи та відбір вихідного матеріалу з кущів-донорів, які ростуть на селекційній ділянці ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» проводили спільно зі співробітником відділу селекції к.с.-г.н. Герус Л. В.

Квіткові бутони дослідних сортів ізолювали на початку періоду цвітіння, зранку та видержували їх при зниженій температурі (+4°C) в темряві на протязі 3, 6 і 10 днів. Бутони стерилізували за схемою, що була нами розроблена в процесі попередніх досліджень:

- Промивання проточною водою – 60 хв.;
- Обробка розчином хінозолу (2 г/л) – 15-20 хв.;
- Обробка розчином гіпохлориту натрію або розчином відбілювача “Білізна” – 10-12 хв.;
- Ополіскування 40% етанолом 30-40 сек.;

- Промивання стерильною дистильованою водою тричі по 5 хв.

Роботи по введенню пиляків в культуру *in vitro* проводились в стерильних умовах ламінар-боксу. Із бутонів виділяли пиляки біло-жовтого (молочного) кольору. Від пиляків відділяли філамент і висаджували на експериментальні поживні середовища в чашки Петрі та культуральні склянки. В момент інокуляції на поживні середовища пиляки мали велику кількість сильновакуолізованих мікроспор.

В дослідженнях ми випробовували 2 варіанти середовищ: Мурасіге та Скуга (МС), Уайта. За прописом готували сольовий склад середовищ. У поживні середовища додавали:

- 1 мг/л ніотинової кислоти;
- 1 мг/л піридоксину;
- 1 мг/л тіаміну;
- 100 мг/л мезо-інозиту;
- 20 г/л сахарози;
- 1 мг/л 6-бензиламінопурина (6-БАП);
- 0,2 мг/л 2,4-дихлорфеноксіцтової кислоти (2,4-Д);
- 6,8 г/л агару.

Ми вивчали тривалу дію зниженої позитивної температури ($t=4^{\circ}\text{C}$) як фактора, що підвищує приживлюваність експлантів та регенераційні здібності винограду в культурі *in vitro* на різних поживних середовищах. Для цього половину об'єктів культивували на протязі 60 днів в темряві при $+4^{\circ}\text{C}$. Другу половину експлантів після введення в стерильну культуру розміщували в умовах темряві та температури $+25^{\circ}\text{C}$.

На 15-ий день від початку культивування визначали приживлюваність експлантів. Динаміку калюсогенезу визначали кожні 10 днів. Калюси з вираженими ознаками морфогенності пересаджували на середовища того ж складу, але із додаванням 0,2 мг/л ІОК. Культивування проводили в умовах культурального боксу при температурі $24-25^{\circ}\text{C}$.

Результати досліджень. Для удосконалення методу культури пиляків *in vitro* нами було вивчено вплив типу поживного середовища, температурного режиму культивування на приживлюваність експлантів, а також на процеси калюсогенезу та ембріогенезу.

Вплив типу поживного середовища на приживлюваність пиляків в культурі *in vitro*. Як показали результати досліджень, тип поживного середовища впливає на приживлюваність пиляків винограду, що досліджувались. При культивуванні експлантів при температурі 25°C найбільш висока приживлюваність пиляків була відмічена на середовищі Уайта (табл. 1). Так, в середньому у сорту Ярило приживлюваність складала 80,0 %, а у сорту Загрей – 50 %. Після введення на середовище Уайта пиляки довгий час залишались життєздатними, були біло-молочного кольору, швидко збільшувались у розмірах.

На середовищі МС пиляки частіше набували жовтого кольору, деколи спостерігалось побуріння середовища навкруги експланта. Приживлюваність була нижчою, ніж на середовищі Уайта. У сорту Загрей різниця між приживлюваністю на поживному середовищі МС і Уайта була незначною (табл. 1), а у сортів Кардішах та Р x Р 101-14 приживлюваність на середовищі МС була значно нижча, ніж на середовищі Уайта (40,0% і 67,0 % та 52,0% і 72% відповідно).

При культивуванні пиляків винограду в умовах знижених температур ($+4^{\circ}\text{C}$) та темноти були виявлені аналогічні закономірності залежності показника приживлюваності ініціальних експлантів від типу поживного середовища.

Всі дослідні сорти показали найвищий показник приживлюваності на поживному середовищі Уайта (табл. 1). Наприклад, на цьому середовищі у сорту Комета приживлюваність складала 92 % (максимальне значення), а в середньому по сортах — 82,8%.

На середовищі МС приживлюваність була значно нижчою і в середньому по сортах складала 72,8 %.

Таким чином, було встановлено, що тип поживного середовища суттєво впливає на показники приживлюваності пиляків винограду *in vitro*. Виявлено перевагу середовища Уайта у всіх дослідних варіантах.

Вплив температури культивування на приживлюваність пиляків в культурі *in vitro*. В результаті досліджень було встановлено позитивний вплив знижених температур на приживлюваність *in vitro*. Культивування експлантів при температурі 4°C в темряві на протязі 60 днів підвищувало приживлюваність пиляків в середньому на 13,0-14,0% в залежності від типу поживного середовища .

Приживлюваність пиляків винограду в культурі *in vitro* на різних поживних середовищах при $t=25^{\circ}\text{C}$ і $t=4^{\circ}\text{C}$, %

температура	25°C		4°C	
Поживне середовище	Уайта	МС	Уайта	МС
сорт винограду				
РхР 101-14	72,0	52,0	83,0	60,0
Комета	80,0	73,0	92,0	82,0
Кардішах	67,0	40,0	82,0	75,0
Ярило	80,0	78,0	90,0	80,0
Загрей	50,0	45,0	67,0	67,0
Середнє по сортах	69,8	58,4	82,8	72,8

Так, на середовищі МС приживлюваність пиляків при температурі 25°C складала в середньому по сортах 58,4 %, а при температурі 4°C – 72,8 % відповідно. На середовищі Уайта приживлюваність пиляків *in vitro* в умовах культурального боксу ($t=25^{\circ}\text{C}$) складала 50-80 % або 69,8 % в середньому по сортах, а при культивуванні в холодильній камері ($t=4^{\circ}\text{C}$) відповідно 67-92 % або 82,8 % в середньому по сортах (табл. 1).

Така залежність приживлюваності пиляків винограду *in vitro* від температурного режиму культивування та складу поживного середовища спостерігалась у всіх дослідних сортів винограду. Цікаво, що у сорту Загрей, який відрізнявся досить низькою приживлюваністю пиляків у всіх дослідних варіантах, холодова обробка сприяла покращенню цього показника на 17% і 22% в залежності від типу поживного середовища.

Слід відмітити, що при культивуванні у холоді експланти довше зберігали життєздатність, мали прозоро-молочний колір, набухали та збільшувались в об'ємі. Спостерігалось зменшення бактеріального та грибового зараження, виділення фенольних сполук в середовище з експланту.

Вплив типу поживного середовища на процеси калусогенезу та ембріогенезу пиляків винограду. На 25–30 день після початку культивування спостерігали індукцію калусогенезу. Пиляки набухали. Через стінки пиляків утворювався калус. Якщо при введенні в культуру *in vitro* тичиночна нитка була не повністю видалена, то як правило, у цьому місці швидше та частіше утворювався світлий, часто рихлий калус, і без ознак ембріогенності.

Калюси, які утворились із пиляків, швидко збільшувались у розмірах, утворюючи згустки прозоро-білого кольору. Деякі калюси мали чітко виражений ембріогенний характер та вузли кремове-білого кольору і морфогенетичні утворення у формі невеликих глобул.

Як показали дослідження, при культивуванні експлантів при температурі 25°C кращим поживним середовищем для всіх досліджуваних сортів винограду виявилось середовище Уайта. Так, наприклад, у сорту Комета в цьому варіанті отримано 21,3% ембріогенних калюсів. Дуже добрі результати одержані на цьому середовищі і у сортів Кардішах (14,3%) та Загрей (10,0%). В середньому по сортах кількість утворених калюсів з ознаками ембріогенності досягала 9,9%.

На середовищі МС інтенсивне калусоутворення було відмічене, але, на жаль, це не сприяло утворенню ембріодів та організованому росту проростків. У сортів РхР101-14, Кардішах і Загрей на середовищі МС ембріогенні калюси не утворювались. А у сортів Комета і Ярило було одержано одиночні калюси, відповідно 0,9% та 2,2% ембріогенних калюсів.

При культивуванні експлантів в темряві і при температурі 4°C виявлено аналогічну залежність утворення ембріогенних калюсів від типу поживного середовища.

На середовищі МС одержані більш високі результати. Кращі результати зафіксовані у сорту Загрей (21,7%), що дозволяє зробити висновок про можливість використання цього середовища для культури пиляків *in vitro* цього сорту.

Більш інтенсивне утворення ембріогених калюсів зафіксовано на середовищі Уайта. У всіх даних сортах в цьому варіанті отримані кращі результати. Так, у сорту Комета було отримано 41,0% ембріогених калюсів, а у сорту Загрей - 30,0%. В середньому по сортах показник утворення ембріогених калюсів складав 20,7%.

На нашу думку, застосування поживного середовища Уайта сприяло покращенню показників приживлюваності, швидкому росту тканин експлантів та їх морфогенетичній диференціації в порівнянні з іншими поживними середовищами.

Вплив температурного режиму культивування на процеси калюсогенезу та ембріогенезу пиляків винограду in vitro. Порівняльний аналіз результатів, отриманих при культивуванні в різних температурних режимах, показав видимі переваги використання знижених позитивних температур в культурі пиляків винограду in vitro (табл. 2). Встановлено, що така обробка сприяє не тільки поліпшенню приживлюваності пиляків, але й збільшенню утворення ембріогених калюсів.

Таблиця 2

Утворення ембріогених калюсів у пиляків винограду в культурі in vitro на різних поживних середовищах при t=25°C і t=4°C, %

температура	25°C		4°C	
Поживне середовище сорт винограду	Уайта	МС	Уайта	МС
РхР 101-14	2,8	0	5,0	0
Комета	21,3	0,9	41,0	15,0
Кардішах	14,3	0	15,3	11,0
Ярило	1,1	2,2	12,2	3,3
Загрей	10,0	0	30,0	21,7
Середнє по сортах	9,9	0,6	20,7	10,2

Найкращі результати були отримані на середовищі Уайта і в середньому по сортах склали 9,9% (температура 25°C) та 20,7% (температура 4°C). Культивування при зниженій температурі призвело до збільшення продукування ембріогених калюсів в середньому по сортах на 10,8%.

Застосування зниженої температури культивування дозволило отримати калюси з ознаками ембріогенності на середовищі МС. Так, якщо при температурі 25°C у сортів Кардішах, Загрей на цьому середовищі калюси не утворювались, то при температурі 4°C було одержано 15,0% і 21,7% калюсів. У сорту РхР 101-14 на середовищі МС ембріогенні калюси на утворювались. В середньому по сортах на середовищі МС утворювалось 0,6% (температура 25°C) та 10,2% (температура 4°C).

Таким чином, культивування пиляків при зниженій температурі суттєво підвищує утворення ембріогених калюсів у всіх дослідних варіантах.

Сортова специфічність в культурі пиляків винограду in vitro. За результатами досліджень було виявлено сортову специфічність культури пиляків in vitro. Різні сорти винограду по-різному відкликаються на культуру пиляків in vitro, по-різному реагують на тип поживного середовища та умови культивування.

При температурі культивування 25°C найбільша приживлюваність пиляків була відмічена у сортів Ярило та Комета (табл. 1). Більш низька приживлюваність була відмічена у пиляків сортів Кардішах та РхР 101-14 і низька у сорту Загрей.

При температурі 4°C не тільки значно збільшувалась приживлюваність пиляків у всіх дослідних сортах, але й значно зменшувалася розбіжність значень цього показника. У сортів з низьким рівнем приживлюваності пиляків in vitro (Загрей, Кардішах) збільшення показника складало 17-35 %.

При температурі 4°C різниця по приживлюваності між експериментальними сортами

вирівнювалась. Даний показник приймав значення не менше, ніж 60,0 %, а в середньому по сортах досягав 55,2 %. Таким чином, для підвищення приживлюваності ініціальних експлантів пиляків винограду *in vitro* доцільно використання знижених позитивних температур.

В результаті роботи виявлено, що при однакових умовах досліджувані сорти по-різному продукували калюс та ембріоїди. Найбільш продуктивними виявились сорти Комета, Кардішах, Загрей. При культивуванні в умовах культурального боксу у сорту Комета в середньому по середовищам було отримано 11,1% ембріогенних калюсів, а у сорту РхР 101-14 всього 1,4%.

Як вже зазначалось вище, при культивуванні з температурою 4°C кількість утворених ембріогенних калюсів у всіх дослідних варіантах збільшувалась. Але, якщо при температурі 4°C показники приживлюваності різних сортів вирівнювались, то при підрахунку ембріогенних калюсів відмінності між сортами зберігались і навіть більш чітко проявлялись.

Висновки. В результаті досліджень встановлена можливість одержання продуктивних ембріогенних калюсів із пиляків винограду різних сортів. Для первинних етапів культивування пиляків в культурі *in vitro* вивчено вплив знижених позитивних температур (4°C). Показано доцільність використання такого прийому для підвищення приживлюваності та індукції калюсогенезу та ембріогенезу пиляків.

Встановлено оптимальність поживного середовища Уайта та його позитивний вплив на основні процеси культури пиляків винограду *in vitro*.

Для використання культури пиляків в селекційних роботах рекомендовано комплексне використання поживного середовища Уайта та зниженої температури (4°C) на первинних етапах культивування експлантів. Це дозволить збільшити життєздатність та продуктивність пиляків, збільшити вірогідність одержання цінного, цікавого генетичного матеріалу винограду.

Література

1. Игнатова С. А. Клеточные биотехнологии: основа, достижения, практическое использование, проблемы / С. А. Игнатова // Геном растений : IV междунар. конф., 10-13 июня 2003 г. : тезисы докл. – Одесса: Южный биотехнологический центр в растениеводстве (Украина), 2003. – 83 с.
2. Клуше В. Гаплоиды в селекции растений / В. Клуше, Г. Венцель. – М. : Колос, 1980. – 128 с.
3. Новак Ф. Й. Индукция гаплоидов в культуре тканей и их значение в селекции растений / Ф. Й. Новак // Культура клеток растений и биотехнология. – М. : Наука, 1986. – С. 159 – 167.
4. Dunwell I. M. Cereal Tissue and Cell Culture / I. M. Dunwell, S. W. J. Bright, M. J. Jones // Martinus Nijhoff, The Hague. – 1985. – P. 84 – 86.
5. Rangan T. S. Ovary, ovule and nucellus culture / T. S. Rangan; ed. V. M. Johri // Exp. Embryol. Vascular plant. – 1982. – P. 105 – 129.
6. Махновская М. Л. Перспективы использования биотехнологии в селекции на устойчивость / М. Л. Махновская, Л. С. Шепель // Геном растений : сборник тезисов IV междунар. конф. 10-13 июня 2003 г. – Одесса, Южный биотехнологический центр в растениеводстве, 2003. – С. 64.
7. Новая технология селекции ячменя с использованием гаплоидии / [Наволоцкий В. Д., Сечняк Л. К., Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А.] // Вестник сельскохозяйственной науки. – 1985. – № 5. – С. 34 – 35.
8. Касаева К. А. Применение биотехнологических методов в селекции растений / К. А. Касаева // «Обзор МС Агропромформ» 1.1.1. – 1989. – 56 с. – (171 библ.).
9. Білінська О. В. Генотипові особливості індукції гаплоїдів (*H. vulgare L.*) методом культури пиляків *in vitro*: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук.: спец. / О. В. Білінська. – Харків, 1997. – 18 с.
10. Галиева Э. Р. Влияние низких положительных температур на индукцию эмбриогенеза и формирование регенерантов в культуре *in vitro* пыльников пшеницы / Э. Р. Галиева, Н. Н. Круглова, С. Н. Абрамов // Физиология и биохимия культурных растений. – 2005. – Т. 37, № 2. – С. 132 – 137.
11. Maheshwari S. C. Haploids from pollen grains. Retrospect and prospect. / S. C. Maheshwari, A. Rashid, A. K. Tyagi // Amer. J. Bot. – 1982. – Vol. 69, №5. – P. 865 – 879.
12. Keller W.A. Haploids from gemetophytic cells-recent development and future prospects / W. A. Keller, P. G. Arnison, Cardy B. J. // Plant tissue and cell culture. – N.Y. : 1987. – Vol. 3. – P. 223 – 241.

Н. И. Теслюк

Разработка методических приемов для культуры пыльников винограда *in vitro*

*В статье представлены результаты исследований по культуре пыльников винограда *in vitro*. С целью определения оптимальных условий для андрогенеза *in vitro* изучено влияние типа питательной среды, температурного режима культивирования на приживаемость пыльников, а также на процессы каллусогенеза и эмбриогенеза. Показана целесообразность комплексного использования питательной среды Уайта и сниженной температуры (4°C) на первых этапах культивирования.*

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

N. I. Teslyuk

Elaboration of methodological techniques for grapes anthers in culture *in vitro*

*The article introduces research results on topic of grapes anthers in culture *in vitro*. For the purpose of detecting optimal conditions for *in vitro* androgenesis the issue under study was the influence of nutrient medium type and temperature conditions of cultivation on anthers establishment as well as on processes of callusogenesis and embryogenesis. Reasonability of complex use of White nutrient medium and reduced temperature (4°C) at the first stage of cultivation is shown.*

Keywords: grapes anthers, culture *in vitro*, nutrient medium, callusogenesis.