

## ВПЛИВ ЗАСОЛЕННЯ НА ФОРМУВАННЯ ТА РІСТ КАЛУСНИХ КУЛЬТУР ВІНОГРАДУ В УМОВАХ КУЛЬТУРИ ТКАНИН IN VITRO

*Досліджено особливості росту та формування калусних культур підщепних сортів винограду на поживному середовищі, засоленому NaCl, NaHCO<sub>3</sub> та активним кальцієм. Визначено критичні концентрації солей та отримано солестійкі клітинні лінії підщеп, які досліджували. Отримано ембріогенний калус на поживному середовищі МС, доповненому 3,0 мг/л НОК, 0,5 мг/л БАП.*

**Ключові слова:** калусні культури, підщепні сорти винограду, засолення, ембріогенний калус.

Засолення ґрунту є одним з несприятливих факторів довкілля, який призводить до значного зниження врожайності багатьох сільськогосподарських культур, у тому числі і винограду. Згідно з літературними даними виноград може нормально рости та плодоносити на ґрунтах, які містять не більше 0,3-0,4 % шкідливих солей (від сухої маси ґрунту), серед яких значний вплив на рослини здійснює карбонат кальцію (активний кальцій) [1].

У зв'язку з загальним погіршенням екологічного стану ґрунтового покриву та широким використанням штучного зрошення зростає потреба в селекції стійких до засолення форм рослин. Застосування культури тканин in vitro відкриває широкі можливості для вивчення та селекції рослин на стійкість до стресових факторів, в тому числі і до засолення. Клітинна селекція стійких ліній рослин зазвичай складається з двох основних етапів – власне відбору стійких клітинних ліній на стресових середовищах та регенерації рослин з отриманих клітинних ліній [2]. Для клітинної селекції використовують калусні та суспензійні культури тканин рослин, соматичні ембріони, культуру пагонів та ін., які перевіряють на здатність витримувати відносно високі рівні засолення у поживному середовищі [3]. У більшості досліджень в якості стресового агента використовують NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> і MgSO<sub>4</sub>. Наприклад, під час клітинної селекції тютюну використовували солі морської води, маніт, хлориди та сульфати [4]. Вважають, що комплексне засолення дозволяє створити модель стресу, близьку до польових умов, та ефективніше проводити відбір [5].

Для винограду відомі дослідження, що стосуються клітинної селекції на стійкість до посухи, засолення та біотичного стресу. Встановлено, що ембріогенна культура винограду є ідеальною для клітинної селекції in vitro, оскільки до регенерації здатні окремі клітини, тому модифіковані ознаки можуть проявлятися у всіх тканинах рослин-регенерантів [6]. Селекцію винограду на стійкість до засолення NaCl проводили з використанням ембріогенних культур *V. rupestris* і культур пагонів *V. champini* та *V. vinifera*, однак з відібраних стійких культур не вдалось отримати солестійкі рослини [7]. Також для відбору гібридних форм підщеп винограду, стійких до NaCl, використовували культуру ізольованих зародків винограду [8]. У результаті культивування суспензій клітин винограду у стресовому середовищі з CaCO<sub>3</sub> та CaCl<sub>2</sub> отримали лінії винограду, стійкі до високої концентрації активного кальцію [9, 10]. Для успішного застосування методів клітинної селекції винограду необхідним є отримання ембріогенного калусу з подальшою регенерацією рослин з нього шляхом соматичного ембріогенезу [6, 10].

Таким чином, для винограду є актуальним отримання солестійких форм для наступного створення солестійких підщепних сортів. З огляду на це **метою нашої роботи** було вивчення впливу засолення на розвиток калусних культур винограду для подальшої клітинної селекції підщеп на солестійкість. Для досягнення мети були поставлені завдання – отримати калусні культури винограду, стійкі до різних типів засолення, та індукувати соматичний ембріогенез.

**Матеріали та методи досліджень.** Роботу виконували у групі культури тканин in vitro відділу розсадництва та розмноження винограду ННЦ „ІВіВ ім. В.Є. Таїрова”. Для досліджень обрали підщепні сорти селекції ННЦ „ІВіВ ім. В.Є. Таїрова” Добриня та Гарант. Експланти винограду

вводили у культуру тканин *in vitro* та розмножували за загальноприйнятою методикою, для роботи використовували мікроклони винограду III-V пасажів. Для отримання калусних культур пагони мікроклонів висаджували на поживне середовище Мурасіге та Скуга (МС), доповнене 2,0 мг/л НОК і 0,5 мг/л БАП та витримували у темряві 55-60 днів.

Для клітинної селекції винограду на стійкість до засолення калусні культури пересаджували на модифіковані поживні середовища МС, у яких створювали різні типи засолення: хлоридне - 0,25-1,00% NaCl; карбонатне - 6,3-7,5% CaCO<sub>3</sub>; содове - 0,05-0,10% NaHCO<sub>3</sub>. Контрольним було поживне середовище без додавання стресових агентів.

Для отримання стійких клітинних ліній винограду калус пасажували 2 рази на стресові середовища протягом 2-х місяців в умовах культурального боксу (температура 25-27 °С, освітлення 2000-2500 люкс 16 год.). Впродовж періоду культивування проводили обліки приживання та розвитку калусних тканин (маса, об'єм, вміст вологи).

Для індукції ембріогенезу виділені калусні лінії винограду переносили на поживні середовища МС, які відрізнялись за вмістом гормонів - 3,0 мг/л НОК, 0,5 мг/л БАП та 2,0 мг/л НОК, 1,0 мг/л БАП та культивували на світлі (в умовах культурального боксу) та без освітлення (у термостаті при температурі 25°C).

**Результати досліджень.** На контрольному поживному середовищі підщепи винограду формували гетерогенний калус великого розміру, який складався з пухких глобул сірого, жовтуватого або бежевого кольору. У деяких калусних ліній сорту Добриня також спостерігали появу глобул зеленуватого відтінку, а у підщепи Гарант – окремих зон малого розміру рожевого забарвлення на поверхні тканин (рис. 1).

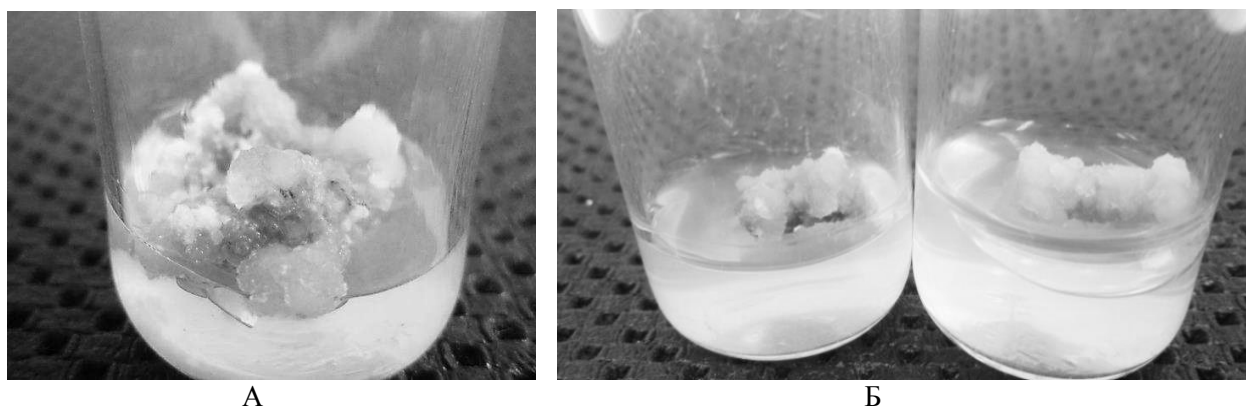


Рис. 1. Калусні культури підщепи Добриня на середовищі для індукції калусогенезу (А) та на середовищі для клітинної селекції (Б) – варіант 0,75% NaCl (зліва) та контроль.

Внесення хлориду натрію до поживного середовища призводило до істотного зменшення показників приживання калусних культур винограду. Так, кількість життєздатних калусів винограду сорту Гарант на середовищі з 0,25-0,75% NaCl становила 62,5-75,4% від кількості висаджених, а у підщепи Добриня відповідно – 75,0-93,8%, тоді як у контролі приживалось 100% культур (табл.). Внесення 1,0% NaCl у середовище призводило до зменшення показників приживання калусних культур до 33,5% у сорту Гарант та 53,3% у сорту Добриня, ріст культур з часом пригнічувався. Інтенсивний ріст калусних тканин спостерігали лише у варіантах з 0,25-0,50% NaCl – їх об'єм становив 1,7-2,2 см<sup>3</sup>, а маса дорівнювала 1,306-1,924 г. Зростання кількості хлориду натрію у середовищі призводило до істотного зменшення маси та об'єму калусів. Обводнення тканин також зменшувалось пропорційно до вмісту солей у поживному середовищі.

Для отримання стійких до карбонатного засолення культур винограду калуси підщеп висаджували на середовище з вмістом 6,3-7,5 % активного кальцію. У сорту Гарант через 2 місяці культивування у варіанті 6,3 % CaCO<sub>3</sub> залишилось 77,8 % життєздатних культур, а у варіанті 7,5 % CaCO<sub>3</sub> - 66,7 %. У підщепи Добриня показники приживання у вказаних варіантах були вищими та становили відповідно 95,8 та 82,5 %. Калус мав бежеве та коричневе забарвлення, пухку структуру та глобулярні утворення на поверхні. Культури були невеликого розміру, їх маса зменшувалась у 1,7-1,8 рази у сорту Гарант та у 1,4-1,6 рази у підщепи Добриня порівняно з контролем, хоча об'єм змінювався під впливом засолення незначно. Вміст вологи у тканинах на середовищах з активним кальцієм знижувався і складав 93,79-95,81 %, що на 2,1-3,6 % менше, ніж у контролі.

На середовищі з содовим засоленням кількість розвинених калусів підщепи Гарант значно зменшувалась та становила 55,6-66,7 %. Маса калусу зменшувалась у 1,4-2,8 рази порівняно з контрольними показниками, вміст води також знижувався. Калус мав бежеве та коричневе забарвлення, були наявні темно-коричневі ділянки, що є ознаками старіння. Подібне було характерним і для підщепи Добриня, однак у варіанті 0,050 %  $\text{NaHCO}_3$  прижились усі висаджені культури, їх ріст значно пригнічувався – маса вологого калусу була в 1,9 рази меншою порівняно з контрольними культурами, а вміст води знижувався на 3,9 %. У варіантах з 0,075 і 0,100 %  $\text{NaHCO}_3$  життєздатних культур залишилось менше (відповідно 90,0 та 50,5 % від початкової кількості), але їх показники маси, об'єму та кількості води були більшими, ніж у попередньому варіанті.

Таблиця

**Показники розвитку калусу підщепних сортів винограду на засолених стресових середовищах (через 2 місяці культивування)**

Варіант	Приживання через 2 міс., %	Об'єм калусу, $\text{см}^3$	Маса вологого калусу, г	Вміст води, %
<b>Гарант</b>				
Контроль	100,0	2,9	2,338	97,25
0,25% NaCl	75,4	2,1	1,820	96,50
0,50% NaCl	62,5	1,7	1,306	94,81
0,75% NaCl	62,5	0,9	0,750	93,70
1,00% NaCl	33,5	0,4	0,280	92,60
6,3% $\text{CaCO}_3$	77,8	3,2	1,302	93,79
7,5% $\text{CaCO}_3$	66,7	2,7	1,410	94,58
0,050% $\text{NaHCO}_3$	66,7	1,7	1,622	95,39
0,075% $\text{NaHCO}_3$	63,6	1,2	1,213	95,35
0,100% $\text{NaHCO}_3$	55,6	1,5	0,844	92,18
<b>Добриня</b>				
Контроль	100,0	3,1	2,418	97,91
0,25% NaCl	93,8	2,2	1,924	97,62
0,50% NaCl	75,0	1,7	1,481	96,51
0,75% NaCl	78,8	1,0	0,704	94,37
1,00% NaCl	53,3	0,5	0,327	93,11
6,3% $\text{CaCO}_3$	95,8	2,9	1,716	95,81
7,5% $\text{CaCO}_3$	82,5	2,7	1,540	94,60
0,050% $\text{NaHCO}_3$	100,0	1,0	1,249	94,05
0,075% $\text{NaHCO}_3$	90,0	2,0	1,570	95,90
0,100% $\text{NaHCO}_3$	50,5	1,2	1,814	96,18

На основі досліджень встановили критичні концентрації солей для розвитку калусних культур. Для сорту Гарант критичним є засолення середовища 0,50 % NaCl, 7,5 %  $\text{CaCO}_3$ , 0,075 %  $\text{NaHCO}_3$ , для підщепи Добриня - 0,75 % NaCl, 0,100 %  $\text{NaHCO}_3$ , а для визначення критичної для цього сорту концентрації активного кальцію дослідження необхідно продовжити. У результаті досліджень виділили стійкі клітинні лінії винограду, які повторно пасажували на засолених середовищах.

Отримані калусні культури винограду пересаджували на ембріогенні поживні середовища та розміщували в боксі з освітленням або у термостаті без освітлення. Спостереження показали, що культивування калусів на світлі призводило до утворення ембріогенних зон лише в одиничних випадках. Культивування калусів без освітлення у термостаті, навпаки, сприяло індукції ембріогенезу (рис. 2).

Протягом 2 місяців культивування у частини калусних культур обох сортів спостерігали формування коренів або коренеподібних утворень, на поверхні з'являлись пірамідальні утворення,

глобули та потенційно ембріогенні ділянки світлого кольору, більш інтенсивно це відбувалось на середовищі з 3,0 мг/л НОК, 0,5 мг/л БАП. Так, у підщепного сорту Гарант на ембріогенних середовищах вдалось отримати пірамідальні утворення у 23,1% культур. Калус мав середні розміри, сіре або коричневе забарвлення, на поверхні було по кілька коренеподібних тонких утворень бежевого кольору. У сорту Добриня також отримали калус з ембріогенними зонами, у 25% висаджених калусів спостерігали появу глобул різної форми світло-сірого кольору, білих ембріогенних ділянок та окремих коренів. В подальшому планується продовжити роботу для отримання соматичних ембріодів та рослин-регенерантів стійких клітинних ліній.



Рис. 2. Проембріогенний калус підщепного сорту Гарант.

### *Література*

1. Унгурян В. Г. Почва и виноград / В. Г. Унгурян. – Кишинев: Штиинца, 1979. – 212 с.
2. Войнов Н. А. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс] : электрон. учеб. пособие / Н.А. Войнов, Т.Г. Волова, Н.В. Зобова и др.; под науч. ред. Т. Г. Воловой. – Электрон. дан. (12 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2009. – (Современные проблемы и методы биотехнологии : УМКД № 1323-2008 / рук. творч. Унгурян коллектива Т.Г. Волова). – 1 электрон. опт. диск (DVD). – Систем. требования: Intel Pentium, 1 ГГц ; 512 Мб оперативной памяти ; 50 Мб свободного дискового пространства ; привод DVD ; операционная система Microsoft Windows XP SP 2 / Vista (32 бит) ; Adobe Reader 7.0 (или аналогичный продукт для чтения файлов формата pdf).
3. Woodward A. J. The effect of salt stress and abscisic acid on proline production, chlorophyll content and growth of in vitro propagated shoots of *Eucalyptus camaldulensis* / A. J. Woodward, I. J. Bennett // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 2005. – Vol. 82. – Pp. 189–200.
4. Chen Y. Effects of salinity stresses on tobacco. I. The growth of *N. tabacum* callus cultures under seawater, NaCl, and manitol stresses / Y. Chen, E. Zahavi, P. Barak, N. Ummiel // *Z. Pflanzenphysiol.* – 1980. – Bd. 98. – Pp. 141–153.
5. Rai K.M. Developing stress tolerant plants through in vitro selection—An overview of the recent progress / K.M. Rai, R.K. Kalia et al. // *Environmental and Experimental Botany.* – 2011. – Vol. 71 – Pp. 89–98.
6. *Biotechnology of fruit and nut crops* / edited by Richard E. Litz. – CABI Publishing: Tropical Research and Education Center University of Florida USA, 2004. - 724 p.
7. Lebrun L. Selection in vitro for NaCl-tolerance in *Vitis rupestris* Scheele / L. Lebrun, K. Rajasekaran, M.G. Mullins // *Annals of Botany.* – 1985. – Vol. 56. – Pp. 733–739.
8. Мандыч О. М. Использование эмбриокультуры в клеточной селекции винограда на устойчивость к повышенным концентрациям хлорида натрия / О. М. Мандыч, А. В. Омельченко, А. М. Бугара // *Сучасні проблеми біології, екології та хімії: мат. конф., присвяченої 20-річчю біологічного факультету ЗНУ (Запоріжжя, 29 березня - 01 квітн 207 р.). - Запоріжжя, 2007. – Ч. 2. - С. 504-505.*
9. Зленко В. А. Математическое планирование эксперимента с целью оптимизации концентрации веществ в питательной среде для развития каллусной ткани винограда с последующей селекцией на клеточном уровне / В. А. Зленко, В. А. Котиков, Л. П. Трошин // *Биотехнология.* – 2005. – № 6. – С. 63-73.

10. Зленко В. А. Регенерация растений путем соматического эмбриогенеза из суспензий клеток винограда и селекция на клеточном уровне *in vitro* / В. А. Зленко, В. А. Котиков, Л. П. Трошин // Современные достижения биотехнологии в виноградарстве и других отраслях сельского хозяйства: мат. конф. 29-30 июня 2005 г. – Новочеркасск, 2005. – С. 32-35.

*Зеленянская Н. Н., Подуст Н. В., Гоголинская Е. И.*

**Влияние засоления на формирование и рост каллусных культур винограда  
в условиях культуры тканей *in vitro***

*Исследованы особенности роста и формирования каллусных культур подвойных сортов винограда на питательной среде, содержащей соли NaCl, NaHCO<sub>3</sub> и активный кальций. Определены критические концентрации солей и получены солеустойчивые клеточные линии изучаемых подвоев. Получен эмбриогенный каллус на питательной среде MS с 3,0 мг/л НУК 0,5 мг/л БАП.*

**Ключевые слова:** каллусные культуры, подвойные сорта винограда, засоление, эмбриогенный каллус.

*N. N. Zelenyanskaya, N. V. Podust, E. I. Gogulinskaya*

**Salinity influence on the formation and growth callus cultures of grapes  
in the tissue culture *in vitro***

*The features of the growth and formation of grape rootstock varieties callus cultures on a nutrient medium containing salt NaCl, NaHCO<sub>3</sub> and active calcium were investigated. The critical concentrations of salts were determined and the salt-resistant cell lines of rootstock were obtained. The embryogenic callus on MS medium with 3.0 mg/L NAA 0.5 mg/L BAP was obtained.*

**Keywords:** callus culture, grape rootstock, salinity, embryogenic callus.