

УДК 57.085.1: 634.862: 634.8.034

Индукция соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro* винограда (*Vitis vinifera* L.) отечественной и зарубежной селекции

© 2017 В.А. ЗЛЕНКО¹, В.В. ЛИХОВСКОЙ^{1,*}, В.А. ВОЛЫНКИН¹, П.А. ХВАТКОВ^{3,4}, И.А. ВАСЫЛЫК¹, С.В. ДОЛГОВ^{2,3,4}

¹ФГБУН «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия “Магарач”» (ВНИИВиВ «Магарач») Российской академии наук, Ялта, 298600

²ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова», Пушкинский филиал (ФИБХ) Российской академии наук, Московская область, Пушкино, 142290

³ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр» Российской академии наук, Ялта, 298648

⁴ФГБУН «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, 127550

e-mail: lihovskoy@gmail.com*

Поступила 02.03.2017 г.

Принята в печать 25.07.2017 г.

Выявлены принципиальные схемы и индивидуальные особенности субкультивирования проэмбриогенных каллусов, суспензий и соматических эмбриоидов четырех ранее неизученных столовых сортов винограда – Рута, Сфинкс, Кишмиш Е-342 и Interlaken seedless, а также двух технических сортов – Подарок Магарача и Бианка. Сорта Сфинкс, Рута и Interlaken seedless характеризовались массовым формированием эмбриоидов на среде НН в результате трехстадийной индукции соматического эмбриогенеза. Сорта Бианка, Подарок Магарача и Кишмиш Е-342 формировали эмбриоиды и проростки на среде ПГ в результате двухстадийной индукции соматического эмбриогенеза. Образование эмбриоидов у всех изучаемых сортов происходило с использованием 2,4-Д и 6-БАП в различных концентрациях. Альтернативные добавки – ТДЗ, НОУ и ПВП, предлагаемые рядом исследователей, не оказали положительного эффекта на индукцию соматического эмбриогенеза.

Ключевые слова: виноград, регуляторы роста, суспензионная культура, фенилаланин, эмбриоиды, *in vitro*.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-5-35-44

По объему производства виноград занимает первое место в мире среди плодовых и ягодных и седьмое среди всех сельскохозяйственных культур. В мировом сборе продукции садоводства доля винограда составляет в среднем 32,5%, из которых около половины приходится на урожай, выращенный в европейских странах.

Все промышленные насаждения винограда России сосредоточены в Крымском (Республика Крым и город федерального значения Севастополь) и Северо-Кавказском (Краснодарский край, Дагестан, Ставропольский край, Ростовская обл.) эколого-географических регионах. Природный потенциал этих территорий в основном

Список сокращений: 6-БАП – 6-бензиламинопури (бензиладенин); ГК₃ – гиббереллиновая кислота; 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; ИУК – индолилуксусная кислота; НУК – 1-нафилуксусная кислота; среда MS – среда Мурашиге-Скуга; среда НН – среда Нитча и Нитча; НОУ – нафтоксиуксусная кислота; ПВП – поливинилпирролидон 40000; ПГ – среда Зленко и Трошина; ТДЗ – тидиазурон (3-(1,2,3-тиадиазолин-5)-1-фенилмочевина); ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота; Phe – фенилаланин.

благоприятен для производства столовых, технических и универсальных сортов винограда разных сроков созревания [1]. Столовые сорта занимают всего 15% от общей площади посадок, 60% которых характеризуются поздними, 25% ранними и всего 6% (0,9% от общей площади виноградников Крыма) очень ранними сроками созревания. Виноград очень ранних сортов созревает в конце июля – середине августа, и средняя масса ягоды у этих сортов не превышает 6–8 г, что в совокупности обуславливает необходимость импорта столового винограда во время курортного сезона [2].

Бессемянные столовые сорта винограда обладают высокой потребительской привлекательностью. Однако их доля среди остальных столовых сортов не превышает 1,3%. Это связано с низким показателем транспортабельности и невозможностью длительного хранения, а также небольшим размером ягод [3]. Для преодоления мелкоягодности бессемянных и семенных сортов используют два основных подхода. Первый заключается в обработке генеративных органов и завязей растения физиологически активными веществами (например, гиббереллином [4, 5], который обычно синтезируется в семенах [6]). Второй путь основан на гибридизации или полиплоидизации растений [7, 8]. В ряде случаев обработка колхицином меристемных тканей апикальных почек в культуре *in vitro* приводила к развитию химерных по плоидности растений [9], способных к образованию более крупных плодов [10, 11]. Так, в результате обработки агрегатов (<850 мкм) проэмбриогенных клеток 0,2%-ным раствором колхицина с 1%-ным димексидом были получены тетраплоидные проростки винограда сорта Mencia [12]. Однако колхицин производит сильное стрессовое воздействие на клетки экспланта, в связи с чем регенерация растения является одним из критических этапов всей процедуры аутополиплоидизации.

Таким образом, разработка крупноплодного бессемянного столового сорта винограда представляется сложной и актуальной задачей. Поэтому, прежде чем начинать исследования в этой сфере, необходимо провести ряд экспериментов, направленных на разработку протокола эффективной и стабильной регенерации целых растений в культуре *in vitro* [13].

Ряд авторов отмечают, что для успешного получения проэмбриогенного каллуса из фрагментов листовых пластинок или черешков листьев винограда наиболее подходящей является среда Нитча–Нитча (НН) [14], дополненная 2,4-Д в концентрации 0,5 [15], 1,0 [10–12, 16–19] или

2,0 мг/л [20] совместно с 6-БАП в концентрации 0,5 [10, 15, 16], 1,0 [20, 21] или 2,0 мг/л [11, 17, 18] или ТДЗ в концентрации 1,0 мг/л [12, 16] в присутствии 3%-ной [15, 21] или 6%-ной [10–13, 17, 18] сахарозы. Для индукции соматического эмбриогенеза каллус пассируют на среде НН [14], дополненной 6-БАП в концентрации от 0,5 [10, 11, 17–19] до 1,0 мг/л [12, 20] с добавлением НОУ в концентрации от 1,0 [16, 17] до 2,0 мг/л [10, 11, 18] или НУК в концентрации 1,0 мг/л [10, 15, 21] или 1,0 мг/л ИУК [11, 12, 18, 20] в присутствии 3%-ной [15, 19, 21] или 6%-ной [10–12, 17, 18] сахарозы.

Однако ввиду высокой гетерозиготности винограда соматический эмбриогенез разных его генотипов происходит с существенно различной эффективностью. Для повышения эффективности регенерации ряда сортов исследователи обогащали среду следующими компонентами: гидролизатом казеина (0,1%) [12, 18], активированным углем (0,25%) [11, 12, 17, 18, 20], ПВП (0,5%) [22], фенилаланином (5,0 мг/л) [23], ГК₃ (0,5 мг/л) [20, 24] и глутамином (50 мг/л) [15].

Широкий круг исследователей отмечают также, что у разных сортов винограда физиологические аспекты индукции соматического эмбриогенеза могут существенно различаться [10–12, 14–24], что обуславливает использование различных концентраций разнообразных регуляторов роста и иных органических добавок для эффективного образования эмбриоидов.

В связи с вышесказанным, целью настоящего исследования стала разработка протоколов соматического эмбриогенеза в культуре тканей *in vitro* ранее неизученных селекционно-ценных для республики Крым сортов винограда зарубежной (Interlaken seedless, Кишмиш Е-342) и отечественной (Рута, Сфинкс, Бианка и Подарок Магарача) селекции.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Использовали шесть генотипов винограда: два технических сорта (Бианка и Подарок Магарача), и четыре столовых сорта – Рута и Сфинкс (крупноягодные сорта с развитыми семенами в плодах), а также Кишмиш Е-342 и Interlaken seedless (мелкоягодные бессемянные сорта) (табл. 1).

Для исследования вызревшую лозу заготавливали на селекционных и ампелографических участках ВНИИВиВ «Магарач» и проращивали в сосудах с водой. Для введения в культуру *in vitro* производили стерилизацию полученных зеленых побегов

Агробиологические показатели использованных сортов винограда

Agrobiological characteristics of grapes varieties used

Сорт	Предназначение	Окраска ягод	Дифференциация по сроку созревания	Дата наступления технической зрелости	Индекс продуктивности*, г/побег	Средняя масса грозди, г	Средняя масса ягоды, г	Показатель строения**	Ягодный показатель***
Interlaken seedless	Столовый (бессемянный)	Желто-зеленая	Очень ранний	5.08	191,0	150	1,7	32,3	67,4
Кишмиш E-342	Столовый (бессемянный)	Желто-зеленая	Очень ранний	5.08	201,0	248	2,9	30,1	45,0
Рута	Столовый	Розовая	Ранний	17.08	127,0	335	6,5	66,5	27,8
Сфинкс	Столовый	Темно-синяя	Ранний	18.08	523,0	340	7,7	41,5	21,7
Подарок Магарача	Технический	Желто-зеленая	Средний	15.09	58,3	160	1,8	16,3	60,7
Бианка	Технический	Желто-зеленая	Средний	20.09	67,8	120	1,5	19,8	91,5

*Количество сырой массы грозди в расчете на один развитый побег (Index of productivity is raw mass of grape bunch per developed shoot).

**Отношение массы ягод к массе гребней в грозди (Index of structure is ratio of berries mass to bunch crest mass).

***Число ягод, приходящееся на 100 г грозди (Berry index is number of berries per 100 g of bunch).

путем выдерживания в течение 10 с в 96%-ном этиловом спирте и затем 10 мин в растворе диоксида (1,86 мМ $C_{21}H_{38}ClN^* \cdot H_2O$, 1,25 мМ C_2H_5HgCl) (Alfa Chemicals Ltd, Великобритания) [25]. Далее побеги нарезали на одноглазковые черенки и фрагменты листовой пластинки, черешков листьев и междоузлий [25]. Полученный растительный материал помещали в культуральные сосуды на жидкую среду НН с добавлением 1 мг/л 6-БАП (Applichem, Германия, НН1) для культивирования одноглазковых черенков и 1 мг/л 2,4-Д + 1 мг/л 6-БАП (НН2) для индукции каллусогенеза из фрагментов тканей растения [26].

После 2 мес. культивирования на среде НН1 из одноглазковых черенков развивались побеги с листьями, из которых получали фрагменты листовой пластинки, черешков листьев и междоузлий. На среде НН2 наблюдалось утолщение эксплантов или образование каллусной ткани. Все полученные экспланты (свежеполученные на среде НН1 и культивированные на среде НН2) высаживали на различные агаризованные среды (64 варианта в трехкратной повторности для каждого варианта, три чашки Петри по 10 эксплантов в каждой) с целью получения проэмбрионной

калусной ткани (I этап индукции соматического эмбриогенеза). Все варианты сред содержали в качестве основы среду НН, дополненную 3%-ной сахарозой. Варьировали пять следующих факторов: наличие или отсутствие комплекса витаминов НН (0,05 мг/л биотина, 0,5 мг/л фолиевой кислоты, 5,0 мг/л никотиновой кислоты, 0,5 мг/л пиридоксина, 0,5 мг/л тиамина и 2,0 мг/л глицина) (две градации фактора); концентрация 2,4-Д и 6-БАП, равное 1,0 мг/л + 1,0 мг/л или 2,0 мг/л + 2,0 мг/л, соответственно (две градации фактора); концентрация ТДЗ 0,0, 0,2, 0,5 или 1,0 мг/л (четыре градации фактора); наличие или отсутствие комплекса ПВП + Phe (5,0 г/л + 5,0 мг/л, соответственно) (две градации фактора) и концентрация НОУ 0,0 или 1,0 мг/л (две градации фактора).

После 4 мес. культивирования в темноте при 25–27 °С отбирали гомогенную желтую или светло-коричневую каллусную ткань и пересаживали на жидкие среды для II этапа индукции соматического эмбриогенеза – инициации проэмбрионных клеточных суспензий. Всего таких сред было протестировано 18 вариантов (в трехкратной повторности для каждого варианта – три группы по 30 культуральных стаканов с одной каллусной

*ClN – хлор + азот.

структурой в каждом), которые различались тремя факторами: концентрация сахарозы 2, 4 или 6% (три градации фактора); наличие одного из вариантов комплекса регуляторов роста, состоящего из 1 мг/л 2,4-Д + 1 мг/л 6-БАП, 2 мг/л 2,4-Д + 2 мг/л 6-БАП или 2 мг/л 2,4-Д + 0,2 мг/л 6-БАП (три градации фактора) и наличие или отсутствие комплекса 5,0 г/л ПВП + 5,0 мг/л Phe (две градации фактора). Также в эксперименте был предусмотрен вариант, при котором проэбриогенные каллусные ткани переносили со среды I этапа непосредственно на среду III этапа, минуя среду II этапа индукции соматического эмбриогенеза.

После 8 нед культивирования в темноте в образовавшихся на II этапе суспензионных культурах меняли среду. Для этого в культуральные стаканы с суспензией клеток добавляли восьмикратный объем стерильной воды, около 30 с ожидали осаждения агрегатов, затем сливали жидкость и к оставшемуся в стаканах осадку добавляли свежую среду для III этапа индукции соматического эмбриогенеза. Было предусмотрено 32 варианта сред (в трехкратной повторности для каждого варианта, три группы по 10 культуральных стаканов со всеми образовавшимися структурами в каждом). Все варианты содержали 0,5 мг/л 6-БАП, но различались по содержанию следующих компонентов: использовали среду НН с витаминным комплексом, НН без витаминов, ПГ или среду MS (четыре градации фактора). Среды на основе НН имели следующий состав: НН без витаминов [14]; НН с витаминами (мг/л) – биотин (0,05), фолиевая кислота (0,5), никотиновая кислота (5,0), пиридоксин (0,5), тиамин (0,5) и глицин (2,0); ПГ (мг/л) – NH_4NO_3 (308,8), KNO_3 (922,0), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (597,0), KH_2PO_4 (82,0), CaCl_2 (331,0), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (13,9), $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ (18,7), H_3BO_3 (3,2), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,0125), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0125), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (8,45), Na_2MoO_4 (0,125), KJ (0,42), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4,3), мезоинозит (20), тиамин (0,1), пиридоксин (0,2), никотиновая кислота (0,5), глицин (2,0), и 10,0 г/л сахарозы [27, 28]; MS [29]. Кроме того, варьировали содержание ТДЗ (0,0 или 0,5 мг/л) (две градации фактора), концентрацию НОУ (0,0 или 1,0 мг/л) (две градации фактора), содержание Phe (0,0 или 5,0 мг/л) (две градации фактора), а также концентрацию ПВП (0,0 или 5,0 г/л, две градации фактора).

Суспензионные культуры выращивали в течение 4 мес. в темноте. В это время происходило образование эмбриоидов белого цвета. Затем для инициации развития торпедовидных эмбриоидов (IV этап) культуры переносили на жид-

кую среду, имеющую следующий состав: ПГ + 0,1 мг/л ИУК + 5,0 мг/л Phe + 30 мг/л гумата Na.

После 2 мес. культивирования среду снова заменяли на ПГ + 0,2 мг/л 6-БАП + 0,2 мг/л ГК₃ (V этап) и культивировали суспензию в течение 2–3 нед при освещенности 55 мкМ фотонов/(м²·с) для индукции развития проростков из образовавшихся торпедовидных эмбриоидов.

Развившиеся проростки и не успевшие развиться эмбриоиды переносили на агаризованную среду для VI этапа соматического эмбриогенеза (MS с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП). Эмбриоиды и проростки равномерно распределяли по всей поверхности твердой среды, погружали на глубину 2–4 мм и культивировали в течение 2–3 мес. После этого развившиеся из проростков побеги разрезали на 2–3-глазковые экспланты с листьями и высаживали на агаризованную среду для VII этапа культивирования *in vitro* (ПГ + 0,05 мг/л ИУК) – укоренения регенерантов.

Статистическую оценку данных проводили методом дисперсионного анализа ($p \leq 0,05$) с последующим кластерным анализом по критерию Дункана ($p \leq 0,05$). Эффективность тестируемых вариантов сред на I, II и III этапах оценивали по среднему количеству эмбриоидов, полученных для каждого варианта на IV этапе. Так как в ряде вариантов соматический эмбриогенез не был отмечен, для устранения нулевых значений в дисперсионном анализе данные преобразовывали способом $\sqrt{X+1}$ [30], где X – количество эмбриоидов, полученных в эксперименте.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Было установлено, что предпочтительным типом экспланта для получения проэмбриогенного каллуса являются фрагменты листовой пластинки и черешков листьев, предварительно культивированные в течение 2 мес. на среде НН2. Статистически достоверно показано, что для формирования проэмбриогенных тканей у 5 из 6 исследуемых сортов винограда (Бианка, Подарок Магарача, Рута, Сфинкс и Interlaken seedless) необходимо присутствие в среде 2,4-Д и 6-БАП в концентрации по 1 мг/л каждого. Формирование проэмбриогенных структур из эксплантов винограда сорта Кишмиш Е-342 потребовало добавления в среду 2,4-Д и 6-БАП в концентрации по 2 мг/л. Полученные проэмбриогенные ткани имели рыхлую консистенцию и обладали желтой или светло-коричневой окраской. Также они имели сходное гистологическое строение (клетки

Среднее число эмбриоидов по изучаемым сортам винограда, образовавшихся из эксплантов на IV этапе эксперимента, в зависимости от компонентов среды на I этапе индукции соматического эмбриогенеза

Mean number of embryooids on the studied varieties of grapes formed from explants at IV stage of the experiment depending on the components of medium during induction of somatic embryogenesis

Сорт	Среда НН с витаминным комплексом + 2,4-Д + 6-БАП, по 1 мг/л, с ТДЗ, мг/л				Среда НН с витаминным комплексом + 2,4-Д + 6-БАП, по 2 мг/л, с ТДЗ, мг/л			
	0,0	0,2	0,5	1,0	0,0	0,2	0,5	1,0
Подарок Магарача	1670	1080	0	0	0	0	0	0
Interlaken seedless	41	0	0	0	0	0	0	0
Рута	2230	0	0	0	0	0	0	0
Сфинкс	800	9	0	0	0	0	0	0
Бианка	0	0	0	1060	0	0	0	0
Кишмиш Е-342	0	0	0	0	0	0	1333	0
Среднее число эмбриоидов на IV этапе со всех сортов	790,2 с	181,5 b	0,0 a	176,7 b	0,0 a	0,0 a	222,2 b	0,0 a

Примечание: здесь и в табл. 3 и 4 среднее число эмбриоидов на IV этапе эмбриогенеза указано для оценки эффективности вариантов сред; a, b, c – достоверно различающиеся ранги критерия Дункана для уровня значимости $p = 0,95$. Приведены только эффективные варианты сред; прочие варианты, согласно условиям эксперимента, имеют значение 0,0a (например, все варианты с использованием 5,0 г/л ПВП + 5,0 мг/л ФА, а также все варианты с использованием среды НН без витаминного комплекса).

Footnote: here and in Table 3 and Table 4, mean number of embryooids at IV stage of embryogenesis is shown to assess the efficiency of medium variants; (a)–(c), distinctly different data clusters according to evaluation of multiple means by the Duncan's criterion for significance level $p = 0,95$. Effective medium variants are only shown; other variants have values of 0,0 a according to the experimental conditions (for instance all variants using 5,0 g/L PVP + 5,0 mg/L Phe, and also all variants with the use of NN medium without vitamin complex were inefficient).

шаровидной формы, слабо связанные друг с другом, с очень малым количеством или полным отсутствием плазмодесм и большими межклеточными пространствами, заполненными жидкостью) с описанными ранее в научной литературе проэмбриогенными каллусами гречихи, риса и банана [31–34]. В целом для индукции проэмбриогенных структур исследуемых сортов необходимо было наличие в среде НН витаминного комплекса (см. раздел «Условия эксперимента») и 2,4-Д совместно 6-БАП в оптимальных концентрациях (табл. 2); ТДЗ, ПВП, НОУ или Phe значимого влияния на процессы каллусогенеза не оказывали.

Два исследуемых сорта винограда Бианка и Кишмиш Е-342 в дальнейшем успешно формировали эмбриоиды (1060 шт и 1333 шт, соответственно) и проростки только в случае, если проэмбриогенные каллусные ткани переносили со среды I этапа непосредственно на среду III этапа, минуя среду для II этапа индукции соматического эмбриогенеза. Сорта Сфинкс и Interlaken seedless, наоборот, образовывали соматические эмбрио-

иды менее эффективно (9 и 5, соответственно), если в протоколе культивирования отсутствовал II этап индукции соматического эмбриогенеза. Сорт Подарок Магарача характеризовался сравнимыми результатами как при наличии второго этапа, так и в его отсутствие. Три сорта, которым второй этап действительно был необходим – это Сфинкс, Рута и Interlaken seedless. Они требовали проведения II этапа культивирования проэмбриогенных каллусов на среде НН + 2,0 мг/л 2,4-Д + 0,2 мг/л 6-БАП, обогащенной 2%-ной (Interlaken seedless) и 6%-ной (Сфинкс и Рута) сахарозой, для формирования эмбриогенной суспензии агрегатов клеток (табл. 3). Выход проростков в конце эксперимента у сортов Сфинкс и Interlaken seedless в случае устранения II этапа индукции эмбриогенеза уменьшался в 3–4 раза (в среднем с 40 до 10 проростков у сорта Сфинкс и с 10 до 3 у сорта Interlaken seedless). Сорт Рута образовывал эмбриоиды, а затем и проростки только в случае пребывания на II этапе эмбриогенеза на среде НН + 2,0 мг/л 2,4-Д + 0,2 мг/л 6-БАП,

Среднее число эмбриоидов по изучаемым сортам винограда, образовавшихся из эксплантов на IV этапе эксперимента, в зависимости от содержания сахарозы в среде на II этапе индукции соматического эмбриогенеза

Mean number of embryoids of studied grapes varieties formed from explants at IV stage of experiment depending of sucrose content at II stage of somatic embryogenesis induction

Сорт	Среда НН без витаминного комплекса, обогащенная сахарозой			Среда НН без витаминного комплекса, содержащая 5,0 г/л ПВП + 5,0 мг/л Phe и обогащенная сахарозой		
	2%	4%	6%	2%	4%	6%
Interlaken seedless	36	0	0	0	0	0
Сфинкс	0	302	498	0	0	0
Рута	0	0	2230	0	0	0
Подарок Магарача	0	0	0	0	0	1670
Среднее число эмбриоидов, полученных на IV этапе	9 b	75,5 b	682,0 c	0,0 a	0,0 a	417,5 c

Примечание: жирным шрифтом выделены показатели среднего количества эмбриоидов, полученных на IV этапе во всех повторностях для 4 из 6 сортов (Бианка и Кишмиш Е-342 формировали эмбриоиды только при переносе проэмбриогенных каллусов со среды I этапа непосредственно на среду III этапа, минуя пребывание на среде для II этапа); a, b, c – см. примечание к табл. 2. Приведены только эффективные варианты сред с использованием 2,0 мг/л 2,4-Д и 0,2 мг/л 6-БАП, прочие варианты были нерезультативны (например, все варианты с использованием 1,0 мг/л 2,4-Д + 1,0 мг/л 6-БАП и 2,0 мг/л 2,4-Д + 2,0 мг/л –БАП).

Footnote: mean numbers of embryoids obtained at stage IV in all repetitions for 4 varieties of 6 are typed bold (Bianca and Sultana grape E-342 varieties only formed embryoids when transferred from stage I medium directly to stage III medium bypassing stage II medium). Efficient medium variants are only shown; other variants were inefficient (for instance, all variants using 2,4-D (1.0 mg/L + 6-BAP (1.0 mg/L) and using 2,4-D (2.0 mg/L + 6-BAP (2.0 mg/L).

обогащенной 6% сахарозы. Добавление ПВП совместно с Phe не оказывало статистически значимого влияния на инициацию эмбриогенеза в суспензиях исследуемых сортов (см. табл. 3).

Было установлено, что присутствие НОУ и ТДЗ в средах III этапа нежелательно, а добавление ПВП, как совместно с Phe, так и отдельно от него, значимого эффекта на процессы соматического эмбриогенеза не оказывало. Три исследуемые сорта (Сфинкс, Рута и Interlaken seedless) массово формировали эмбриоиды и проростки при использовании на данном этапе эмбриогенеза среды НН без витаминного комплекса (в присутствии 0,5 мг/л 6-БАП); добавление Phe к данной среде не оказывало значимого эффекта на соматический эмбриогенез (табл. 4).

Другие сорта (Бианка, Подарок Магарача и Кишмиш Е-342) наиболее эффективно образовывали эмбриоиды и проростки на среде ПГ (в присутствии 0,5 мг/л 6-БАП), а добавление 5,0 мг/л Phe в 2 раза увеличивало их выход (см. табл. 4). Так, если из суспензий сорта Киш-

миш Е-342 после пребывания на среде ПГ + 0,5 мг/л 6-БАП в среднем образовалось 500 эмбриоидов и 10 проростков, то на среде ПГ + 0,5 мг/л 6-БАП + 5,0 мг/л Phe из того же количества эксплантов развивалось 800 эмбриоидов и 23 проростка. Использование сред MS и НН с витаминным комплексом вне зависимости от прочих добавок (регуляторы роста, фенилаланин, поливинилпирролидон) было нерезультативно.

Таким образом, в результате проведенной работы были определены наиболее эффективные протоколы индукции соматического эмбриогенеза селекционно-ценных сортов винограда зарубежной (Interlaken seedless, Кишмиш Е-342) и отечественной (Рута, Сфинкс, Бианка и Подарок Магарача) селекции, что открывает перспективы их широкого использования в отечественном виноградарстве.

Результаты проведенной работы по подбору условий культивирования *in vitro* тканей использованных сортов винограда суммированы на рисунке.

ИНДУКЦИЯ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* ВИНОГРАДА


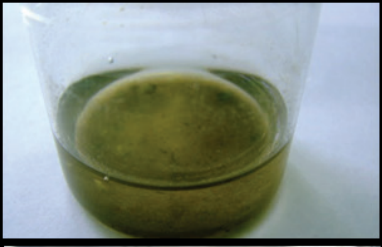

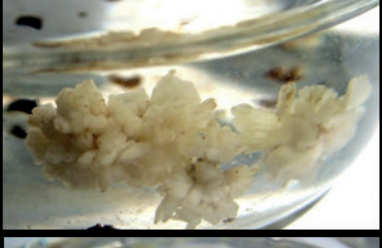



Этапы эмбриогенеза	Бианка, Подарок Магарача	Кишмиш E-342	Сфинкс, Рута, Interlaken Seedless
 I этап Проэмбриогенные каллусы	НН + 1,0 мг/л 2,4-Д + 1,0 мг/л 6-БАП	НН + 2,0 мг/л 2,4-Д + 2,0 мг/л 6-БАП	НН + 1,0 мг/л 2,4-Д + 1,0 мг/л 6-БАП
 II этап Эмбриогенная суспензионная культура			НН + 6% сахара-розы + 2,0 мг/л 2,4-Д + 0,2 мг/л 6-БАП
 III этап Развитие глобулярных эмбриоидов	ПГ + 0,5 мг/л 6-БАП + 5,0 мг/л ФА		НН без витаминного комплекса + 0,5 мг/л 6-БАП
 IV этап Развитие торпедовидных эмбриоидов	ПГ + 0,1 мг/л ИУК + 5,0 мг/л ФА + 30 мг/л гумат НА		
 V этап Формирование проростков	ПГ + 0,2 мг/л 6-БАП + 0,2 мг/л ГК ₃		
 VI этап Развитие побегов		МС + 0,5 мг/л 6-БАП	
 VII этап Укоренение побегов		ПГ + 0,05 мг/л НУК	

Схема этапов эмбриогенеза 6 сортов винограда (Бианка, Подарок Магарача, Кишмиш E-342, Рута, Сфинкс и Interlaken seedless) на средах различного состава, разработанная в настоящем исследовании

Scheme of embryogenesis stages of 6 grapes varieties (Bianka, Podarok Magaracha, Sultana grape E-342, Ruta, Sphinx, and Interlaken seedless) on media of various compositions designed in this investigation

Влияние различных добавок к средам НН и ПГ, используемым на III этапе индукции соматического эмбриогенеза, на эффективность образования эмбриоидов из иницированных суспензионных агрегатов изучаемых сортов винограда на IV этапе эмбриогенеза

Effect of various additives to media NN and PG used at stage III of somatic embryogenesis on efficiency of embryoid formation from initiated suspension aggregates of grapes studied varieties at stage IV of embryogenesis

Органические добавки		Среда НН без витаминов с добавлением (мг/л)				Среда ПГ без витаминов с добавлением (мг/л)			
		ТДЗ (0,0)		ТДЗ (0,5)		ТДЗ (0,0)		ТДЗ (0,5)	
		НОУ (0,0)	НОУ (1,0)	НОУ (0,0)	НОУ (1,0)	НОУ (0,0)	НОУ (1,0)	НОУ (0,0)	НОУ (1,0)
ПВП (5,0 г/л)	Phe (5,0 мг/л)	0,0 а	0,0 а	0,0 а	0,0 а	178,2 б (1060 Бианка + 9 Сфинкс)	0,0 а	0,0 а	0,0 а
	Phe (0,0 мг/л)	0,0 а	0,0 а	0,0 а	0,0 а	85,0 а (510 Кишмиш Е-342)	0,0 а	0,0 а	0,0 а
ПВП (0,0 г/л)	Phe (5,0 мг/л)	0,0 а	0,0 а	176,7 б (1060 Подарок Магарача)	103,3 а (620 Подарок Магарача)	317,2 с (1080 Подарок Магарача + 823 Кишмиш Е-342)	0,0 а	0,0 а	0,0 а
	Phe (0,0 мг/л)	202,5 б (1215 Рута)	219,5 б (1015 Рута + 302 Сфинкс)	89,8 а (41 Interlaken seedless + 498 Сфинкс)	0,0 а	0,0 а	0,0 а	0,0 а	0,0 а

Примечание: Жирным шрифтом выделены показатели среднего количества эмбриоидов, полученных на IV этапе во всех повторностях для всех 6 сортов; в скобках указано среднее количество полученных эмбриоидов для каждого сорта; а, b, с – см. примечание к табл. 2. Приведены только эффективные варианты сред, содержащие 0,5 мг/л 6-БАП; прочие варианты, согласно условиям эксперимента, имеют значение – 0,0 а (например, все варианты с использованием сред МС и НН с витаминным комплексом).

Footnote: Values of mean numbers of embyoids for each variety obtained at stage IV in all repetitions for all 6 varieties are typed bold; mean number of obtained embryoids for each variety is given in parentheses; (a)–(c), distinctly different data clusters according to evaluation of multiple means by the Duncan's criterion. Effective medium variants are only shown; other variants have values of 0,0 according to the experimental conditions (for instance, all variants using MS and NN media with vitamin complex).

Работа частично финансировалась Министерством образования, науки и молодежи Республики Крым (научный проект № 16-44-910584/16, соглашение № 755/2016 от 01.12.2016) и Российским фондом фундаментальных исследований (региональный Грант РФФИ (Республика Крым) № 16-44-910584 р_а, ГРН ЦИТиС: АААА-А16-116122810057-2).

ЛИТЕРАТУРА

- Зармаев А.А. Виноградарство с основами первичной переработки винограда. СПб: Лань, 2015, 12.
- Иванченко В.И. Состояние, тенденции и перспективы развития виноградо-винодельческого комплекса АР Крым. *Таврический вестник аграрной науки*, 2013, (2), 12–17.
- Радчевский П.П., Трошин Л.П. Новации виноградарства России. 15. Бессемянные сорта винограда. *Журн. Кубанского гос. аграрного ун-та*. 2010, 56(2), 122–143.
- Лиховской В.В., Олейников Н.П. Реакция столовых сортов с функционально женским типом цветка Талисман и Флора на гиббереллиновую кислоту. Виноградарство і виноробство. Міжвідомчий тематичний науковий збірник. Одеса: ННЦ «ІВіВ ім. І.Є. Таїрова». 2012, (49), 144–149
- Волынкин В.А., Лиховской В.В., Олейников Н.П. и др. Разработка схемы применения физиологически активных веществ для улучшения хозяйственно значимых показателей бессемянных сортов винограда на примере сорта Южнобережный. *Виноградарство и виноделие. Магарач*, 2015, (4), 16–18.

6. Смирнов К.В., Кострикин И.А., Майстренко Л.А. и др. Бессемянные сорта и гибридные формы винограда. Новочеркасск–Запорожье: Дар, 2002, 8–54.
7. Волынкин В.А., Лиховской В.В., Павлова И.А. и др. Индуцированная полиплоидизация у винограда. *Виноградарство и виноделие. Магарац*, 2010, (4), 16–21.
8. Авидзба А.М., Дрягин В.Б., Матчина И.Г. и др. Состояние виноградарства Крыма в 2014 году. *Виноградарство и виноделие. Магарац*, 2015, (4), 3–5.
9. Dhooghe E., Laure V.K., Eechaut T. et al. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 2011, 104(3), 359–373. doi:10.1007/s11240-010-9786-5
10. Yang X.M., Cao Z.Y., An L.Z. et al. *In vitro* tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Euphytica*, 2006, (152), 217–224. doi:10.1007/s10681-006-9203-7
11. Sinski I., Bosco D., Pierozzi N.I. et al. Improving *in vitro* induction of autopolyploidy in grapevine seedless cultivars. *Euphytica*, 2013, (196), 299–311. doi:10.1007/s10681-013-1034-8
12. Acanda Y., Prado M.J., Gonzalez M.V., Rey M. Somatic embryogenesis from stamen filaments in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Mencia): changes in praidy level and nuclear DNA content. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 2013, 49(3), 276–284. doi:10.1007/s11627-013-9499-7
13. Чернобровкина М.А., Караваев Ч.А., Харченко П.Н., Мелик-Саркисов О.С. Соматический эмбриогенез и морфогенный потенциал ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) в системе технологического процесса генетической трансформации. *Известия РАН. Серия биологическая*, 2004, 31(4), 404–409. doi:10.1023/B:BIBU.0000036935.80745.6c
14. Nitsch J.P. & Nitsch C. Haploid plants from pollen grains. *Science*, 1969, 163(3862), 85–87. doi: 10.1126/science.163.3862.85
15. Kikkert J.R., Striem M.J., Vidal J.R. et al. Long-term study of somatic embryogenesis from anthers and ovaries of 12 grapevine (*Vitis* sp.) genotypes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 2005, 41(3), 232–239. doi:10.1079/IVP2004609
16. Reustle G., Harst M., and Alleweldt G. Plant regeneration of grapevine (*Vitis* sp.) protoplasts isolated from embryogenic tissue. *Plant Cell Reports*, 1995, 15(3), 238–241. doi:10.1007/BF00193727
17. Franks T., He D.G., and Thomas M. Regeneration of transgenic *Vitis vinifera* L. Sultana plants: genotypic and phenotypic analysis. *Molecular Breeding*, 1998, 4(4), 321–333. doi:10.1023/A:1009673619456
18. Prado M.J., Rodrigaez E., Rey L. et al. Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.*, 2010, 103(1), 49–59. doi:10.1007/s11240-010-9753-1
19. Зленко В.А., Волынкин В.А., Лиховской В.В. и др. Инициация проэмбриогенных клеточных суспензий у девяти межвидовых гибридов винограда. *Научный журнал КубГАУ*, 2015, 107(3), 601–613.
20. Tsvetkov I., Dzhabazova T., Kondakova V., Batchvarova R. *In vitro* Long-term storage and regeneration of Bulgarian grapevine variety “Velika” via repetitive somatic embryogenesis. *Univ. J. Plant Sci.*, 2014, 2(2), 48–51. doi: 10.13189/ujps.2014.020204
21. Emershad R.L. and Ramming D.W. Somatic embryogenesis and plant development from immature zygotic embryos of seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Reports*, 1994, 14(1), 6–12. doi:10.1007/BF00233289
22. Reustle G. and Natter I. Effect of polyvinylpyrrolidone and activated charcoal on formation of microcallus from grapevine protoplasts (*Vitis* sp.). *Vitis – J. Grapevine Res.*, 1994, (33), 117–121.
23. Harst M. Development of a regeneration protocol for high frequency somatic embryogenesis from explants of grapevines. *Vitis – J. Grapevine Res.*, 1995, (34), 27–29.
24. Zlenko V.A., Kotikov I.V., Troshin L.P. Efficient GA3-assisted plant regeneration from cell suspensions of three grape genotypes via somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 2002, 70(3), 295–299. doi: 10.1023/A:1016593227463
25. Голодрига П.Я., Зленко В.А., Чекмарев Л.А., и др. Методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда. Ялта: ВНИИВиП «Магарац», 1986, 2–56.
26. Зленко В.А., Трошин Л.П., Левенко Б.А. Методические указания по регенерации растений винограда *in vitro* в жидкой среде. М.: ВАСХНИЛ, 1990, 6–40.
27. Zlenko V.A., Troshin L.P., and Kotikov I.V. An optimized medium for clonal micropropagation of grapevine. *Vitis – J. Grapevine Res.*, 1995, 34 (2), 125–126.
28. Зленко В.А., Котиков В.А., Трошин Л.П. Математическое планирование эксперимента с целью оптимизации концентрации веществ в питательной среде для развития каллусной ткани винограда с последующей селекцией на клеточном уровне. *Биотехнология*, 2005, 6, 63–73.
29. Murashige T. and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 1962, 15(3), 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
30. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М.: Колос, 1979, 62–358.
31. Rumiantseva N.I., Akulov A.N., and Mukhitov A.R. Extracellular polymers in callus cultures of *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. with different morphogenic activities: time courses during the culture cycle. *Prikl Biokhim Mikrobiol.*, 2004, 40(5), 571–578.
32. Silva L.C., Paiva R., Corrêa Da Silva D.P., et al. Characterization of pro-embryogenic calli and somatic embryogenesis of *Byrsonima intermedia* A. Juss. *J. Agricult. Sci. Technol.*, 2012, 962–970.

33. Indoliya Y., Tiwari P., Chauhan A.S., et al. Decoding regulatory landscape of somatic embryogenesis reveals differential regulatory networks between *japonica* and *indica* rice subspecies. *Sci. Reports.*, 2016, (6) Article number: 23050.
34. Novak F.J., Afza R., Van Duren M., et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *Nature Biotechnol.*, 1989, (7), 154–159.

Induction of *in vitro* Somatic Embryogenesis in Grapes (*Vitis vinifera* L.) of Domestic and Foreign Breeding

V.A. ZLENKO¹, V.V. LIKHOVSKOY^{1,*}, V.A. VOLYNKIN¹, P.A. KHVATKOV^{3,4}, I.A. VASYLYK¹, and S.V. DOLGOV^{2,3,4}

¹The All-Russian National Research Institute for Viticulture and Wine-Making Magarach (VNIIViV Magarach), Russian Academy of Sciences, 298600 Yalta Russia

²The Shemyakin-and-Ovchinnikov Institute for Bioorganic Chemistry, Pushchino Branch (FIBKh), Russian Academy of Sciences, 142290, Pushchino, Moskovskaya Oblast Russia

³The Order of the Red Banner of Labor Nikitsky Botanical Garden – National Scientific Center, Russian Academy of Sciences, 298648 Yalta Russia

⁴The All-Russian Research Institute for Agricultural Biotechnology, 127550, Moscow Russia

e-mail: lihovskoy@gmail.com*

Received March 03, 2017

Accepted July 27, 2017

Abstract—Fundamental schemes and individual characteristics of subculturing of proembryogenic calluses, suspensions and somatic embryos of 4 previously unstudied table grapes varieties, Ruta, Sphinx, Sultana grape E-342 and Interlaken seedless, and two wine grapes varieties, Podarok Magaracha and Bianca, have been found out. The Sphinx, Ruta and Interlaken seedless grapes massively formed embryoids on the NN medium as a result of the three-stage embryogenesis induction. Bianca, Podarok Magaracha and Sultana grape E-342 varieties formed embryoids and shoots on the PG medium as a result of a two-stage induction of embryogenesis. The development of embryoids in all studied varieties occurred using 2,4-D and 6-BAP in various concentrations. Alternative supplements, TDZ, NOA and PVP, suggested by a number of researchers had no positive effect on the induction of somatic embryogenesis.

Key words: embryoids, grapes, growth regulators, *in vitro*, phenylalanine, suspension culture.

Acknowledgements—The work was partly supported by a Grant of the Ministry of Education, Science and Youth of the Republic of Crimea (Project 16-44-910584/16 and Contract 755/2016, December 12, 2016) and the Russian Foundation for Basic Research (Regional Grant 16-44-910584 r_a) (the Republic of Crimea). The State Registration Number Center of Information Technologies and Systems (SRN CITandS) is AAAA-A16-116122810057-2).

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-5-35-44