

Проведена проверка возможности применения разработанных ранее методик микрклонального размножения *U. victoris* для сохранения генофонда этого редкого лекарственного растения. Результаты RAPD-анализа свидетельствуют о высокой стабильности генома вида при прямой регенерации и регенерации из длительно-культивируемых каллусных тканей.

This study tests an opportunity for application of developed earlier *U. victoris* micro-propagation techniques for protection of this rare medicinal plant genetic resources. The RAPD-analysis results suggest the high genetic stability of the species under conditions of direct regeneration and regeneration from long-term cultured callus.

**ВОЛЫНКИН В.А., ЗЛЕНКО В.А., ПОЛУЛЯХ А.А., ЛИХОВСКОЙ В.В.**

*Национальный институт винограда и вина «Магарач» УААН*

*Украина, 98600, АР Крым, г. Ялта, ул. Курова, 31, e-mail: select\_magarach@ukr.net*

### **ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АЛЛОПОЛИПЛОИДИИ И КУЛЬТУРЫ ЗАРОДЫШЕЙ *IN VITRO* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МЕЖРОДОВЫХ ГИБРИДОВ У ВИНОГРАДА (СЕМЕЙСТВО *VITACEAE*)**

Эволюция у представителей 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* L., 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 проходила 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 подрода *Euvtis* легко скрещиваются между собой, то получить гибриды между видом *V. vinifera* (подрод *Euvtis*, 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 аллоплоидии (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 родов, 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 устойчивые к биотическим и абиотическим факторам среды генотипы, урожай которых может иметь новое направление использования, в частности в фармакологической и парфюмерной промышленности.

### **Материалы и методы**

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

### **Результаты и обсуждение**

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 сеянцы у сортов вида *V. vinifera* и у видов родов *Ampelopsis* и *Parthenocissus*. В дальнейшем на 3 – 5 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, Хартти про Ливье, Баян ширей, Шабаш крупноягодный, Шабаш, Рислинг рейнский, Мускат Александрийский 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 распускания. 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 семян 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 acotifolia* (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.), Пикпуль 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 Пикпуль 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 пылью видов *Ampelopsis acotifolia* 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  $-2^{\circ}\text{C}$ . 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  $\beta$ -индолилуксусной кислоты (ИУК) и 30 мг/л гумата Na для превращения сердцевидных зародышей в торпедовидные; 3) 0,2 мг/л гибберелловой кислоты ( $\text{GA}_3$ ) 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  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 922 мг/л  $\text{KNO}_3$ , 597 мг/л  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 82 мг/л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 331 мг/л  $\text{CaCl}_2$ ; 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 тиамин и пиридоксин (по 5 мг/л); pH каждого варианта среды перед автоклавированием (1 атм, 25 мин) было доведено NaOH до 5,6.

При разрезании семян перед посадкой 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 Пикпуль черный почти все семена были с эндоспермом, но при этом редко происходило развитие проростков и редко образовывались у них побеги. В результате скрещивания сорта Пикпуль черный с

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

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 тиамин и 0,2 мг/л пиридоксин), добавкой 30 мг/л гомата 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 и рост побегов у некоторых из них.

#### **Выводы**

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*.

#### **Литература**

1. *Волынкин В.А., Зленко В.А., Лиховской В.В.* Селекция винограда на бессемянность, крупногодность и раннеспелость на полиплоидном уровне// Труды НИВиВ «Магарач». - 2009.- т. XXXIX.- С.5-10
2. *Глеба Ю.Ю., Сытник К.М.* Клеточная инженерия растений. – Киев.- 1984.- 160с.
3. *Зленко В.А.* Диагностика хозяйственноценных признаков и клональное микроразмножение винограда *in vitro*. – Автореф. дис. канд. с.- х. наук, Ялта.- 1991.- 22с.
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.- 64с.
6. *Кунах В.А.* Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – Київ.- 2005.- 724с.
7. *Лобашев М.Е.* Генетика. – Ленинград.- 1967.- 751с.
8. *Першина Л.А., Шумный В.К.* Проблемы использования методов *in vitro* при отдаленной гибридизации злаков// Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. – Москва.- 1991.- С.102 -114.
9. *Топалэ Ш.Г.* Полиплоидия у винограда. Систематика, кариология, цитогенетика. – Кишинев.- 1983.- 215с.
10. *Murashige T. Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture// *Physiol. Plant.*- 1962.- vol.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. vol. 42.- P. 36-42.

12. Patel G.I., Olmo H.P. Induction of polyploidy in sterile F<sub>1</sub> hybrid of *Vitis vinifera* L. and *Vitis rotundifolia* Michx.// Phyton (B.A.)/- 1956/- vol. 7, № 2.- P.12-15.

### Резюме

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.

Використовуючи метод аллополіплоїдії і культури зародків *in vitro*, у винограду після міжродової гібридизації отримані рослини, але для встановлення істинності їх міжродового походження необхідні додаткові молекулярно-генетичний і цитогенетичний аналізи.

Plants were achieved from intergeneric hybridization in grapevine by use of the method of allopolyploidy and *in vitro* embryo culture. Nevertheless, their intergeneric origin needs to be confirmed by additional molecular genetic and cytogenetic analyses.

**ЗЮЗІОН А.Б., КОВТУН С.І., ЩЕРБАК О.В., ПОРХУН М.Г.**

*Институт розведення і генетики тварин УААН*

*Україна, 08321, Київська обл., Бориспільський р-н., с. Чубинське, вул. Погребняка, 1,*

*e-mail: [kovtun\\_si@gala.net](mailto:kovtun_si@gala.net)*

### **ФОРМУВАННЯ ЕМБРІОНІВ *IN VITRO* ЯК СПОСІБ ОЦІНКИ ЗАПЛІДНЮВАЛЬНОЇ ЗДАТНОСТІ СПЕРМАТОЗОЇДІВ БУГАЇВ**

Найпоширенішим методом визначення фертильності самців сільськогосподарських тварин є оцінка запліднювальної здатності сперматозоїдів за результатами штучного осіменіння корів і телиць [1, 2]. Вивчення лише фізіологічних параметрів сперми плідників не забезпечує повноцінної оцінки запліднювальної здатності сперматозоїдів сільськогосподарських тварин. Завершальна оцінка здатності сперматозоїдів до запліднення можлива на підставі результатів штучного осіменіння, що вимагає великих витрат і тривалості в часі [3, 4, 5].

Нині застосовуються сучасні автоматизовані аналізатори якості сперми сільськогосподарських тварин багатьох фірм, які визначають протягом 1 хв. основні параметри – загальну концентрацію гамет, їх рухливість, концентрацію рухливих сперматозоїдів, концентрацію з прямолінійно-поступальним рухом, середню швидкість сперматозоїдів, розрахунок кратності розбавлення для підготовки доз («Гамета-Агро», [www.gameta.ru](http://www.gameta.ru)). Також аналізатори автоматично розраховують кількість гамет із нормальної морфологією, число нерухомих клітин і ін. («SFA – 500», [www.biola.ru](http://www.biola.ru), [www.labmetod.ru](http://www.labmetod.ru)). Рекламуючи автоматизовані аналізатори якості сперми, виробники наголошують на мінімальних вимогах до знань оператора, який працює з ними. Необхідно поєднувати для детального розуміння закономірностей ефективної оцінки запліднювальної здатності сперми плідників загальнобіологічні знання закономірностей ембріонального розвитку тварин і їх відтворювальної здатності [6, 7].

До найбільш поширених методів оцінки якості сперми відносяться візуальна оцінка морфології, рухливості, концентрації і виживання сперматозоїдів, виявлення кількості живих та нежиттєздатних (мертвих, з коливальним рухом) спермій після забарвлення сперми розчином еозина. Недоліком багатьох методів є суб'єктивність при вимірюваннях. У зв'язку з цим виникла необхідність пошуку нових ефективних методів дослідження показників сперми [8, 9].

Для визначення запліднювальної здатності в умовах *in vitro* використовують методи гетерологічного і гомологічного запліднення. При гетерологічному заплідненні використовують оцити золотистого хом'яка [10, 11], що також не дає повної оцінки