

**ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА ПРОЯВЛЕНИЕ
ГЕНЕТИЧЕСКИ ДЕТЕРМИНИРОВАННЫХ ПРИЗНАКОВ
ОКРАСКИ КОЖИЦЫ И СОКА ЯГОД ВИНОГРАДА
НА УРОВНЕ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ IN VITRO**

Зленко В.А. – к. б. н.

Институт винограда и вина «Магарач» УААН

Котиков И.В. – ст. науч. сотр.

Государственный Никитский ботанический сад

Трошин Л.П. – д. б. н., профессор¹

Кубанский государственный аграрный университет

Корреляция между синтезом антоцианов в ягодах различных сортов винограда и в их каллусных тканях *in vitro* зависит от состава культуральной среды. Генотипы винограда различаются по способности к синтезу антоцианов в каллусных тканях, культивируемых при освещении интенсивностью 2000 лк на модифицированной твердой среде Schenk, Hildebrandt (1972) в зависимости от концентрации в ней регуляторов роста НУК (NAA) и БАП (BAP). В варианте среды с высоким содержанием БАП (8 мг/л) и 2 мг/л НУК у сорта Антей магарачский образовался зеленый каллус, а у Муската черного – красный. Наоборот, добавление в эту среду высокой концентрации НУК (10 мг/л) и 0,5 мг/л БАП индуцировало развитие красного каллуса у Антея магарачского и серого – у Муската черного. Вариант этой среды с 2 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП вызывал формирование красного каллуса у обоих сортов. Повышение рН этого варианта среды до 7,0 (до автоклавирования) увеличивало синтез антоцианов в каллусах названных сортов. У сеянца Магарач 100-74-1-7 максимальное накопление антоцианов в каллусе наблюдалось в варианте этой среды с 2 мг/л НУК и низкой концентрацией БАП (0,05 мг/л).

¹ Результаты исследований получены во время работы авторов в Институте винограда и вина «Магарач».

Выведение сортов винограда занимает 10–25 лет, на протяжении которых создают обширный гибридный фонд и в процессе его изучения выделяют по сочетаемости необходимых градаций признаков и свойств единичные сеянцы. Для ускорения селекционного процесса необходимо совершенствовать методы его проведения. Одним из подходов к решению этой проблемы может стать ранняя диагностика хозяйственно-ценностных признаков на ювенильной стадии задолго до вступления сеянцев в пору плодоношения.

Все клетки растительного организма обладают потенциальной способностью к биосинтезу фенольных соединений, образующихся из продуктов первичного метаболизма [1]. Вследствие тотипотентности растительных клеток, изменение внешних условий может вызвать вторичную дифференциацию, в частности, превращение меристематических клеток в паренхиматические [2]. Последние бедны цитоплазмой, имеют мелкие ядра, большие вакуоли и пластиды, наполненные запасными веществами. Характер содержимого паренхиматических клеток тесно связан с выполняемыми ими функциями – синтезом и накоплением различных запасных веществ. Преобладание в каллусной ткани клеток паренхимного типа способствует синтезу и формированию вторичных веществ [3]. Антоцианоласты содержались в вакуолях клеток кожицы ягод, а также ее культуры *in vitro* [4].

Суспензия клеток винограда использовалась для определения предшественников синтеза антоцианов. Установлено, что фенилаланин, меченный изотопом ^{13}C , включается в синтез антоцианов на уровне 65 % [5]. Накоплению антоцианов в клетках суспензионной культуры *Vitis* spp. предшествовало повышение в них уровня фенилаланина, из которого синтезируются антоцианы [6]. Добавление в среду фенилаланина увеличивало синтез антоцианов [7].

Внесение в среду 0,1–10 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) вызывало дедифференциацию клеток *Parlourappus gracilis*, уменьшение их размеров с одновременным прекращением синтеза антоцианов [8]. По модельной системе установлено, что синтез антоцианов в суспензионной культуре моркови индуцируется переносом клеток из среды, содержащей 2,4-Д, в среду без нее [9].

В роли индукторов синтеза в клетках вторичных веществ могут выступать различные контролируемые факторы: добавление в среду ауксинов, гиббереллинов, цитокининов и др., температура культивирования, условия аэрации среды и т. д. [3]. Цитокинины и их предшественники в определенных концентрациях способствуют синтезу антоцианов [2]. Каллусы из усиков винограда сорта Кардинал, выращенные на питательных средах, содержащих кинетин, гиббереллин и аденин в определенных соотношениях, приобретают пигментацию от красного до фиолетового цвета [10].

Обработка абсцизовой кислотой гроздей винограда в начале созревания (10 % проявления окраски ягод) на 3–4 недели ускоряла процесс созревания ягод и синтеза в них антоцианов [11]. При воздействии эндогенной абсцизовой кислотой на ягоды винограда в их эпидермальных клетках увеличивалось образование и размер антоцианопластов без изменения размера клеток [12].

В культуре каллусной ткани *Parthenocissus tricuspidata* Planch. при уменьшении концентрации азота синтезировались антоцианы [13]. Снижение уровня накопления иона NO_3^- и увеличение содержания сахарозы в среде ускоряли синтез антоцианов в клетках суспензионной культуры винограда. Максимальный синтез антоцианов отмечался при 2,5 mM NO_3^- и 8 % сахарозы. Ионы NO_3^- ингибируют аккумулялирование антоцианов с помощью тонопласт АТФ-азы [14]. В суспензионной культуре сорта винограда *Gamma Freaux* синтез антоцианов наблюдался на пятый день культивирования и был увеличен соответственно на 32 и 46 % в среде среднего

(0,25 mM) и низкого (0,008 mM) уровней содержания неорганического фосфата [15].

В отличие от сорбитола и манитола, высокие концентрации сахарозы, глюкозы и фруктозы в суспензионной культуре винограда стимулировали синтез антоцианов. По мнению авторов, увеличение синтеза антоцианов связано не с повышением осмотического потенциала в культуральной среде, а с включением сахаров (сахарозы, глюкозы и фруктозы) в метаболические процессы [16].

Если повторные деления клеток тормозятся, и нарастание клеточной массы прекращается за счет факторов, лимитирующих условия культивирования, в клетках наблюдается повышенный синтез антоцианов [17]. В суспензионной культуре *Vitis* spp. антоцианы аккумулируются на стационарной фазе, когда клеточные деления уже прекращаются. Ингибирование синтеза ДНК афидиколином или добавление свежей жидкой среды без фосфата тормозит процесс клеточного деления и приводит к синтезу антоцианов [7].

Синтез антоцианов зависит от состава света и температуры. Освещение с преобладанием зеленых и синих участков спектра способствовало появлению антоцианов в каллусной ткани винограда. Обработка кусочков каллусной ткани корня моркови холодной водой (+ 4°C) перед высадкой ее на питательную среду также приводила к синтезу антоцианов [2].

На основании литературных данных можно сделать вывод о том, что синтез антоцианов в каллусной ткани зависит от состава питательной среды, освещения и температуры. Образование и накопление антоцианов увеличивается в стационарной фазе роста.

На среде, способствующей синтезу антоцианов, выделенные клоновой селекцией две клеточные линии сорта Gamma синтезировали в 4 раза больше антоцианов, чем исходные клетки. Качественный состав антоциа-

нов менялся в процессе культивирования и зависел от условий выращивания культуры [18].

В каллусной ткани петунии содержались те же антоцианы (петунидин и мальвидин), что и в венчиках исходных растений [19]. Состав культуральной среды влияет на количественный состав антоцианов и их предшественников в клетках винограда *in vitro*. Относительно контрольных клеток, на средах с невысокой концентрацией неорганического фосфата аккумуляровалось больше ацилированных цианидин- и пеонидин-глюкозидов [15]. Пролиферирующие каллусные клетки винограда сорта Spätburgunder, культивируемые *in vitro*, синтезировали продельфинидин [20].

Вещества антоцианового комплекса, углеводы и ароматические вещества накапливаются в ягодах винограда по мере их созревания. Максимум формирования этих веществ наблюдается на стадии физиологической зрелости винограда, когда мякоть ягод состоит из паренхиматических клеток с большими вакуолями, где содержатся углеводы, антоцианы и ароматические вещества [21]. В культуре ткани при определенных условиях можно вызывать образование каллусной ткани паренхиматического типа [2]. Нами была выдвинута гипотеза о возможности получения каллусной ткани *in vitro* паренхиматического типа, приближающейся по своему строению к мякоти ягоды на стадии физиологической зрелости.

Разработан способ ранней диагностики окраски кожицы и сока ягод у сеянцев (в первые месяцы их развития) на уровне каллусной ткани, выращенной *in vitro*. У сортов с белой кожицей и соком ягод, образующимся из эксплантов листьев, черешков листьев и междоузлий, формируется каллус белого цвета. У сортов с окрашенной кожицей, но с бесцветным соком красный каллус будет только при его культивировании с интенсивностью освещения 2000 лк, а у сортов с окрашенными кожицей и соком ягоды – как в темноте, так и при освещении [22, 23].

У винограда генотипическая специфичность сорта или сеянца по содержанию и порядку синтеза веществ – компонентов антоцианового комплекса (диглюкозидов, в частности) может быть установлена на уровне каллусной ткани. Выявленная корреляция между содержанием и порядком синтеза антоцианов в кожице ягод и каллусе, развившемся из эксплантатов (междоузлий, листьев, черешков листьев), позволяет селекционерам проводить раннюю диагностику этих признаков в будущем урожае сеянцев винограда в первые месяцы их развития [24].

Генотипы винограда различаются по ответной реакции каллусной ткани, культивируемой *in vitro*, на концентрации регуляторов роста в питательной среде (табл. 1).

Таблица 1. Различия двух сортов винограда по развитию и окраске каллусных тканей *in vitro* на вариантах сред с различными концентрациями регуляторов роста НУК, 2,4-Д и БАП¹

№ п/п	Концентрации регуляторов роста в среде ² , мг/л	Антей магарачский		Мускат черный	
		количество каллуса, см ³	окраска каллуса	количество каллуса, см ³	окраска каллуса
1	НУК-0,2; БАП-0,5	0,5 ± 0,2	Зеленый	0,2 ± 0,1	Зеленый и красный
2	НУК-0,2; БАП-2	2,5 ± 0,8	Зеленый	0,9 ± 0,6	Зеленый
3	НУК-0,2; БАП-8	1,0 ± 0,5	Зеленый	0,4 ± 0,3	Зеленый и красный
4	НУК-2; БАП-0,5	0,5 ± 0,3	Розовый	0,3 ± 0,2	Красный
5	НУК-2; БАП-0,5 рН = 7	0,9 ± 0,5	Красный	0,4 ± 0,4	Красный
6	НУК-2; БАП-2	1,3 ± 0,4	Красный и зеленый	0,9 ± 0,7	Зеленый и красный

7	НУК-2; БАП-8	1,1 ± 0,6	Зеленый	0,1 ± 0,1	Красный
8	НУК-10; БАП-0,5	1,1 ± 0,5	Красный	0,7 ± 0,4	Серый
9	НУК-10; БАП-2	0,2 ± 0,2	Серый	0,7 ± 0,3	Серый и красный
10	НУК-10; БАП-8	0,6 ± 0,3	Серый	0,1 ± 0,1	Красный
11	2,4-Д-0,2; БАП-0,5	1,8 ± 0,7	Серый	0,3 ± 0,2	Красный
12	2,4-Д-0,2; БАП-8	0,5 ± 0,3	Серый	0,4 ± 0,2	Зеленый и серый
13	2,4-Д-2; БАП-0,5	0,5 ± 0,2	Серый	0,4 ± 0,2	Серый
14	2,4-Д-2; БАП-2	1,5 ± 0,6	Красный	0,01 ± 0,0	Серый
15	2,4-Д-2; БАП-8	0,3 ± 0,3	Серый	0,2 ± 0,1	Серый

¹ Первичные экспланты – черешки листьев, 30 дней культивирования в темноте и затем 28 дней при освещении интенсивностью 2000 лк белыми люминесцентными лампами, 15 повторностей, $P < 0,05$.

² Среда [25] с повышенной концентрацией сахарозы (60 г/л), 7,5 г/л Difco агара, рН = 5,6 (кроме варианта среды № 5).

Низкая концентрация (0,2 мг/л) ауксина α -нафтилуксусной кислоты (НУК) с 0,5 и 2 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) не способствовала синтезу красящих веществ в каллусах винограда сортов Антей магарачский и Мускат черный. Добавление в среду высокой концентрации НУК (10 мг/л) с 0,5 мг/л БАП вызывало развитие красного каллуса Антея магарачского и серого – Муската черного, наоборот, содержание в среде 8 мг/л БАП с добавлением 2 мг/л НУК приводило к образованию красного каллуса у Муската черного и зеленого – Антея магарачского. На среде, содержащей другой ауксин – 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) низкой концентрации (0,2 мг/л) с 0,5 мг/л БАП, развивались красный каллус у сорта Мускат черный и серый – Антея магарачского. Только один вариант концентрации регуляторов роста – 2 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП – индуцировал син-

тез антоцианов в каллусах двух сортов винограда без их окрашивания в зеленый цвет. Высокое значение $pH = 7$ среды улучшало образование красящих веществ в каллусе этих сортов (см. табл. 1). Для синтеза антоцианов в каллусной ткани гибридной формы Магарач 100-74-1-5 оптимальным был вариант среды, содержащий 2 мг/л НУК и 0,05 мг/л БАП (табл. 2). Повышение концентрации этих регуляторов роста в вариантах среды снижало синтез красящих веществ в каллусных тканях.

Таблица 2. Влияние регуляторов роста α -нафтилуксусной кислоты (НУК) и 6-бензиламинопурина (БАП) на развитие и окраску каллусной ткани *in vitro*, образовавшейся¹ из эксплантов черешков листьев гибридной формы винограда Магарач 100-74-1-5

№ п/п	Концентрации НУК и БАП в среде ² , мг/л	Количество каллуса, см ³	Степень окраски каллусной ткани, балл
1	НУК-2,0; БАП-0,05	1,5 ± 0,4	2,6 ± 0,3
2	НУК-2,0; БАП-0,2	2,1 ± 0,6	1,4 ± 0,3
3	НУК-2,0; БАП-0,5	2,0 ± 0,5	0,9 ± 0,2
4	НУК-4,0; БАП-0,05	1,3 ± 0,3	1,8 ± 0,3
5	НУК-4,0; БАП-0,2	1,4 ± 0,3	0,9 ± 0,2

¹ 30 дней культивирования в темноте и затем 28 дней при освещении интенсивностью 2000 лк белыми люминесцентными лампами, 15 повторностей, $P < 0,05$.

² Среда [25] с повышенной концентрацией сахарозы (60 г/л), 7,5 г/л Difco агара, $pH = 5,6$.

Что касается возможности диагностирования содержания ароматических веществ в ягодах винограда на уровне каллусной ткани *in vitro*, то в клетках суспензии из тканей черешков листьев сорта Конкорд ароматические вещества, характерные для сортов *Vitis labrusca* L., не найдены, а предшественники β -дамасценаона присутствовали в меньшей concentra-

ции, чем в каллусе на твердой среде, причем только на стационарной фазе роста суспензии. Интенсивное освещение и увеличенная концентрация сахарозы в культуральной среде повышали уровень содержания предшественников β -дамасценаона в каллусной ткани, полученной из черешков листьев сорта Конкорд [26].

Таким образом, синтез красящих веществ в каллусной ткани на специальной среде при определенных условиях (без освещения или с освещением) позволяет проводить раннюю диагностику содержания антоцианов в кожице и соке ягод сеянцев в первый год их развития, задолго до плодоношения [22], при этом можно прогнозировать качественный состав веществ антоцианового комплекса [24].

Список литературы

1. Запрометов М.Н. Фенольные соединения растений: биосинтез, превращения и функции // Новые направления в физиологии растений. – М.: Наука, 1985. – С. 143–162.
2. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 270 с.
3. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. – Киев: Наукова думка, 1980. – 488 с.
4. Nakamura M. Anthocyanoplasts in Kyohko grapes // Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. – 1993. – V. 62. – P. 353–358.
5. Production of ^{13}C -labelled anthocyanins by *Vitis vinifera* cell suspensions cultures / S. Krisa, P. Waffo Tegu, A. Decendit, G. Deffieux, J. Vercauteren, J.M. Merillon // Phytochemistry. – 1999. – V. 51. – P. 651–656.
6. Obtaining *Vitis vinifera* cell cultures producing higher amounts of malvidin-3-O- β -glucoside / S. Krisa, X. Vitrac, A. Decendit, F. Larronde, G. Deffieux, J.M. Merillon // Biotechnology Letters. – 1999. – V. 22. – P. 497–500.
7. Regulatory mechanisms of biosynthesis of betacyanin and anthocyanin in relation to cell division activity in suspension cultures / M. Sakuta, H. Hirano, K. Kakegawa, J. Suda, M. Hirose, R.W.IV Joy, M. Sugiyama, A. Komamine // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1994. – V. 38. – P. 167–169.

8. Stickland K., Sunderland N. Production of anthocyanins, Flavonols and Chlorogenic Acids by Cultured Callus Tissues of *Haplopappus gracilis* // *Annals of Botany*. – 1972. – V. 36. – № 146. – P. 443–457.

9. Ozeki Y., Komamine A. Induktion of anthocyanin synthesis in relation to embryogenesis in a carrot suspension culture – a model system for the study of expression and repression of secondary metabolism // *Primary and secondary Metab. Plant Cell Cult.* – Berlin e. a., 1985. – P. 99–106.

10. Изровска Н., Лилов Д. Участие на гибберелиновата киселина / ГАЗ/ при индуциране на морфогенез върху тъкани, изолирани от различни органи на лоза // *Физиология на растенията*. – 1981. – Т. 4. – № 1. – С. 23–28.

11. Effects of natural type (S)–(+)-abscisic acid on anthocyanin accumulation and maturity in ‘Kioho’ grapes / K.S. Lee, J.C. Lee, Y.S. Hwang, I.B. Hur // *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*. – 1997. – V. 38. – P. 717–721.

12. Kim S.B. Effect of ABA on the occurrence and development of anthocyanoplasts in ‘Kyoho’ grapes / S.B. Kim, C.H. Lee, D.H. Han // *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*. – 1997. – V. 38. – P. 55–59.

13. Heller R. Sur la formation d’anthocyane dans les tissus de vigne – vierge cultivate in vitro par suppression de l’azote du milieu de culture // *C. R. Soc. Biol.* – 1948. – V. 142. – P. 768–769.

14. Enhanced anthocyanin production in grape cell cultures / F.J. Hirasuna, M.L. Shuler, V.K. Lackney, R.M. Spanswick // *Plant Science (Shannon)*. – 1991. – V. 78. – P. 107–120.

15. Dedaldechamp F. Enhancement of anthocyanin synthesis and dihydroflavonol reductase, DFK, activity in response to phosphate deprivation in grape cell suspensions / F. Dedaldechamp, C. Uhel, J.J. Macheix // *Phytochemistry*. – 1995. – V. 40. – P. 1357–1360.

16. Regulation of polyphenol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by sugars / F. Laronde, S. Krisa, A. Decendit, C. Cheze, G. Deffieux, J.M. Merillon // *Plant Cell Reports*. – 1998. – V. 17. – № 12. – P. 946–950.

17. Enhanced accumulation of anthocyanins in *Vitis vinifera* cells immobilized in polyurethane foam / J.L. Iborra, J. Guardiola, S. Montaner, M. Canovas, A. Manjon // *Enzyme and Microbial Technology*. – 1994. – V. 16 – P. 416–419.

18. Cormier F. Anthocyanin production in selected cell lines of grape *Vitis vinifera* L. / F. Cormier, C.B. Do, Y. Nikolas // *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. – 1994. – V. 30. – P. 171–173.

19. Synthesis of malvidin and petunidin in pigmented tissue cultures of *Petunia hybrida* / C.M. Colijn, L.M.V. Jonsson, A.W. Schram, A.J. Kool // *Protoplasma*. – 1981. – V. 107. – № 1-2. – P. 63–68.

20. Feucht W. Flavanols in grapevine: in vitro accumulation and defence reactions in shoots / W. Feucht, D. Freutter, E. Christ // *Vitis*. – 1996. – V. 35 – P. 113–118.

21. Стоев К.Д. Физиологические основы виноградарства. – София: Изд. Болгарской акад. наук, 1973. – Т. 2. – 538 с.

22. А. с. 948339, СССР, МКИ³ А01G 7/00. Способ диагностики окраски кожицы и цвета сока ягод винограда. – Заявка № 3232084/30-15. Заявл. 04.01.81. Опубл. 07.08.82. / П.Я. Голодрига, В.А. Зленко, Т.А. Калуцкая, Л.К. Киреева, Н.П. Дубовенко, Р.Г. Бутенко, Б.А. Левенко. – Бюл. № 29. – 2 с.

23. Haydu Z. Application of in vitro cultures in the Research on grapevine genetics // 4-th international symposium on grapevine breeding. – Verone /Italie/ 13–18 Avril, 1985. – P. 25.

24. Голодрига П.Я. Прогнозирование некоторых компонентов качества урожая сортов и сеянцев винограда по каллусной ткани / П.Я. Голодрига, М.А. Костик, В.А. Зленко // *Физиология и биохимия культурных растений*. – 1986. - № 5. – С. 510–515.

25. Schenk R.U., Hildebrandt A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dycotyledonous plant cell cultures // *Can. J. Bot.* – 1972. – V. 50. – P. 199–204.

26. Shure K.B., Acree T.E. Production of β -damascenone precursors in cell cultures of *Vitis labruscana* cv. Concord grapes // *Plant Cell Reports*. – 1994. – V. 13. – P. 477–480.