

УДК 634.8

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АУТЕНТИЧНОСТИ
ВИНОГРАДНЫХ РАСТЕНИЙ, РАЗМНОЖЕННЫХ
ИЗ АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ В УСЛОВИЯХ IN SITU**

**METHOD OF DETERMINATION OF AUTHENTICITY OF VINE-
GRAPE PLANTS DIVIDED FROM THE APICAL MERITES, IN CON-
DITIONS IN SITU**

Н.Г. Павлюченко

N.G. Pavluchenko

Всероссийский научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия имени Я.И. Потапенко – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный Ростовский аграрный научный центр»,

Новочеркасск, Россия,

e-mail: ruswine@yandex.ru

All-Russian Research Institute named after Ya.I. Potapenko for Viticulture and Winemaking – Branch of Federal State Budget Scientific Institution «Federal Rostov Agricultural Research Center»,

Novocherkassk, Russia,

e-mail: ruswine@yandex.ru

Аннотация. Работа по оценке аутентичности генотипов виноградных растений выполнялась на базе ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко в полевых и лабораторных условиях. В статье приведены основные методики оценки аутентичности винограда, размноженного в культуре *in vitro*. Представлены результаты наблюдений на сортах межвидового происхождения Платовский, Каберне северный, Баклановский на наличие фенотипических отклонений. В результате выявлены модификационные отклонения в популяции сорта Каберне северный. Изучение образцов клонов сортов (Баклановский, Каберне северный) по шести микросателлитным маркерам не выявило межклонового полиморфизма

Summary. Work on the assessment of the authenticity of genotypes of the grape plants was performed on the basis of ARRIV&WV named after Ya.I. Potapenko in field and laboratory conditions. The article presents the main methods of authenticity assessing of grapes propagated *in vitro* culture in the field and laboratory conditions. The results of observations on the varieties of inter-species origin Platovsky, Cabernet Severniy, Baklanovskiy on the presence of phenotypic deviations are presented. The results revealed a modification of the variances in the population of Cabernet Severniy. The study of samples of the clones of varieties (Baklanovskiy, Cabernet North) at the six microsatellite markers did not reveal inter-species polymorphism

Ключевые слова: виноград, метод, апикальные меристемы, аутентичность, *in vitro*, морфологические признаки

Keywords: grapes, method, apical meristems, authenticity, *in vitro*, morphological features

DOI: 10.32904/2412-9836-2018-8-53-57

Введение. Размножение винограда методом культивирования апикальных меристем является основным этапом создания сертифицированного посадочного материала. Этот метод, имеет ряд преимуществ перед существующими традиционными способами размноже-

ния. Основное - заключается в освобождении растений от вирусов за счет использования апикальной меристемы [1-4].

Начиная с первых работ по культивированию растительных клеток, тканей и органов растений в условиях *in vitro* особый интерес у исследователей вызывал вопрос о том, какие изменения могут происходить в изолированных клетках, растущих на искусственных питательных средах и причины их вызывающие. Есть сведения, указывающие на то, что у злаковых культур при таком способе размножения возникает угроза соматической изменчивости, которая часто рассматривается как нежелательное явление, присущее культивированию растений *in vitro* [5, 6]. Частота ее проявления может зависеть от генотипа, концентрации регуляторов роста в среде, продолжительности культивирования и часто носит эпигенетический, т.е. ненаследуемый характер. Изменчивость может оказывать положительный эффект на рост и развитие благодаря ювенилизации растений [7].

Достигнутый современный уровень молекулярно-генетических подходов: генотипирование, секвенирование и др. – позволяет анализировать огромное количество растительных организмов с целью выявления полиморфизма, молекулярных основ фенотипической изменчивости и устойчивости к стрессовым факторам среды и др. Однако, первым этапом, позволяющим установить изменения, возникающие в процессе культивирования апикальных меристем, является мониторинг морфологических признаков в полевых и лабораторных условиях.

Цель исследования заключалась в проведении ампелографического скрининга основных морфологических признаков на виноградных насаждениях, заложенных растениями, выращенными из апикальных меристем, для определения однородности популяции и стабильности сохранения признаков.

Объекты и методы исследований. Работа по оценке аутентичности генотипов виноградных растений выполнялась на базе ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко в полевых и лабораторных условиях.

Степень изменчивости определяли путем визуального обследования маточных насаждений и ампелографического скрининга винограда, лабораторных исследований лозы, урожая.

Метод основан на мониторинге насаждений *ex situ*, выращенных из апикальных меристем в культуре *in vitro*, визуальном фенотипировании морфологических признаков, лабораторных исследованиях популяций с технологической оценкой гроздей и ягод и определением эмбриональной плодоносности растений.

Определение аутентичности включает следующие этапы: визуальное обследование популяции винограда, в условиях *post vitro*, для

выявления фенотипических отклонений в различные фазы развития растений; сбор данных прохождения фаз вегетации; определение степени устойчивости растений к основным болезням - мильдью и оидиум; технологическую оценку выделенных экземпляров; определение эмбриональной плодоносности популяции.

Методикой предусмотрено проведение следующих наблюдений и учетов:

1. Агробиологические учеты и наблюдения проводятся по методике Лазаревского М.А. [8].

а) Фенологические наблюдения. Отмечаются сроки наступления следующих фаз вегетации: начало распускания почек, начало цветения, начало созревания ягод, наступление полной зрелости ягод.

б) Определение показателей нагрузки и плодоносности кустов.

2. Визуальное обследование насаждений с целью выявления отклонений морфологических признаков габитуса куста: силы роста, положение побегов, окраска листьев (клоновая селекция винограда), урожайность.

3. Ампелографический скрининг морфологических признаков, учет типов изменчивости проводится по международной методике OIV кодирования ампелографических признаков и свойств объектов винограда: сортов, клонов дикорастущих и гибридных форм, представителей видов рода *Vitis* L., изложенной в пособии Трошина Л.П. [7].

4. Физиологические и биохимические показатели. Массовое содержание сахаров в соке определяли рефрактометрическим методом, кислот – титрованием 0.1N NaOH с использованием индикатора бромтимолового синего.

5. Оценка на устойчивость к милдью и оидиуму проводится по международной методике OIV кодирования ампелографических признаков и свойств объектов винограда: сортов, клонов дикорастущих и гибридных форм, представителей видов рода *Vitis* L., изложенной в пособии Трошина Л.П. [9].

6. Определение эмбриональной плодоносности по методике Л.М. Якимова (1977) [10].

Для получения достоверной информации о проявлении фенотипических отклонений сравнивают популяцию растений, размноженных из апикальных меристем в культуре *in vitro*, с контрольным вариантом (эталон – сорт, размноженный вегетативным способом или с ампелографическим описанием этого сорта). Куст – повторность. Временная повторность - 3 года.

Рекомендуем первичное обследование проводить всех растений популяции, не зависимо от их количества. В последующие годы

наблюдение и детальное изучение проводится только на кустах, имевших в первый год значительные отклонения исследуемых признаков. Если выделенный куст сохраняет в течение 2 –х лет выявленные морфологические отклонения, то с него заготавливается лоза для размножения и проведения сравнительного анализа по морфологическим признакам.

Обсуждение результатов. Оценка аутентичности генотипов виноградных растений выполнялась на популяциях сортов Платовский, Каберне северный, Баклановский. Насаждения маточника категории Оригинальный корнесобственные, заложены посадочным материалом, размноженным из апикальных меристем в культуре *in vitro*. Популяция сорта Платовский состоит из 71 растения, Каберне северный – около 400 растений, Баклановский – 40 растений.

В результате визуальных обследований растений в течение вегетационного периода установлено, что в основные морфологические признаки у растений, размноженных из апикальных меристем, соответствовали описанию признаков вегетативно размноженных по традиционной технологии растений. Отличительные признаки, наблюдаемые ежегодно на растениях всех исследуемых популяций в культуре *ex situ* - окраска молодых побегов и черешков листьев в вино-красный цвет и различия по силе роста кустов. Указанные признаки носят модификационный характер и обусловлены режимом питания растений.

Существенных отличий в протекании фаз вегетации у растений в популяциях не выявлено.

Для определения стабильности передачи признаков проводилось наблюдение за растениями сорта Каберне северный, произрастающими на маточнике категории Базисный. Маточник заложен корнесобственными саженцами - первой репродукцией растений Оригинального маточника. Оценка стабильности передачи морфологических признаков, проводимая на базисном маточнике, позволила выявить фенотипические отклонения, проявившиеся в силе роста растений, урожайности, массе грозди. Полагаем, что вызвано это влиянием внешних условий среды, в частности почвенными условиями.

Для оценки потенциальной продуктивности растений, размноженных из апикальных меристем, использовали оценку эмбриональной продуктивности зимующих глазков. Установлено, что в результате размножения растений в культуре *in vitro* потенциальная плодоносность растений не уступает потенциальной плодоносности растений, размноженных традиционным способом, а в отдельных случаях превышает.

В результате исследований установлено, что размножение винограда методом апикальных меристем в культуре *in vitro* не провоцирует проявления мутационной изменчивости. Проявление модификационной изменчивости обусловлено влиянием условий произрастания растений.

С целью подтверждения полученного вывода растения, имевшие отличия, проявившиеся в массе ягод, окраске побегов, массе грозди были отобраны для проведения ПЦР-анализа. В результате изучения образцов клонов сортов (Баклановский, Каберне северный) по шести микросателлитным маркерам не выявило межклонового полиморфизма.

Выводы. Полевой метод оценки генотипов виноградных растений размноженных из апикальных меристем позволяет оценивать стабильность морфологических признаков при микроклональном размножении винограда и является обязательным. При наличии морфологических отклонений для определения типа изменчивости у растений, выращенных из апикальных меристем, рекомендовано использование ПЦР – анализа.

Литература

1. Дорошенко, Н.П. Биотехнологические методы ускоренного размножения и оздоровления, селекции бессемянных сортов и создания коллекций генофонда винограда. Автореф. дис. ... докт. с.-х. наук. - Новочеркасск, 1999. - 60 с.
2. Тихонова, И.Г. Оздоровление генофонда вишни от наиболее вредоносных вирусных заболеваний и оценка устойчивости их к ЗКП // Использование биотехнологических методов для решения генетико-селекционных проблем. Мичуринск, 1998. С. 84-87.
3. Высоцкий, В.А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала и селекции плодовых и ягодных растений: Автореф. дис. ... докт. с.-х. наук. - М., 1998. - 44 с.
4. Родин А.Р., Калашникова Е.А. Использование методов клеточной и генной инженерии для получения посадочного материала древесных пород: Учеб. Пособие. М.: МГУЛ, 1993. 90 с.
5. Чеченева, Т.Н. Изменчивость злаков в культуре *in vitro* и в процессе регенерации растений // Физиология и биохимия культурных растений. - 2006. – 38 № 2.- С. 163-171.
6. Шаяхметов, И. Ф. Культура клеток и тканей пшеницы *in vitro* и соматический эмбриогенез. Автореф. дис. . докт. биол. наук. -С.-П., 2001. - 44 с.
7. Лебедев В.Г. Азарова А.Б., Шестибратов К.А., Деменко В.И. Проявление соматической изменчивости у микроразмноженных и трансгенных растений [Электронный ресурс]. Режим доступа: URL <http://microklon.ru/art/proyavlenie-somaklonalnoy-izmenchivosti-u-mikrorazmnojennih-i-transgennih-rasteniy-.html> (дата обращения 14.09.2015).
8. Лазаревский М.А. Изучене сортов винограда. Ростов-на-Дону, 1963. – 151 с.
9. Трошин Л.П., Маградзе Д.Н. Ампелографический скрининг генофонда винограда. Краснодар, 2013. 119с.
10. Якимов Л.М. [и др.] Атлас по эмбриологии винограда Кишинев, 1977. – 162 с.