

МЕТОДИ ОЦІНКИ НОВИХ ГЕНОТИПІВ СОРТІВ ТА КЛОНІВ ВИНОГРАДУ ЗА ДОПОМОГОЮ БІО- ТА ДНК-ТЕХНОЛОГІЙ

І. А. Ковальова, Л. В. Герус, Н. М. Зеленьяньська, В. Р. Бочарова, Н. А. Мулюкіна
Національний науковий центр «Інститут виноградарства та виноробства
ім. В. Є. Таїрова»

У статті викладено результати розробки і оптимізації новітніх методів селекції та дослідження генотипів винограду нового покоління з використанням сучасних біотехнологій (культура тканин *in vitro*, ДНК-аналіз) та вдосконалених класичних методів. Доведено можливість отримання повноцінних рослин винограду із незрілого насіння, що сприятиме виділенню ранньостиглих крупноплідних генотипів винограду. З метою прискорення селекційного процесу та вивчення адаптивних властивостей нових генотипів винограду застосовано вивчення солевитривалості та посухостійкості в контрольованих умовах культури тканин *in vitro*. Ефективно використано методи генетичного та молекулярно-генетичного аналізу на різних етапах селекційного процесу для дослідження поліморфізму гібридів, сортів та клонів винограду.

Генотипи винограду, адаптивні показники, культура тканин in vitro, ДНК-аналіз, методи селекції винограду

Динаміка попиту та пропозиції на ринку виноградарської продукції спонукає селекціонерів до створення нових сортів, що найбільш відповідають попиту споживачів [1].

Перехід до біологічного виноградарства та підвищення вимог до екологічної чистоти продукції розширюють комплекс показників та властивостей, які повинні мати сорти винограду нового покоління. Особливо значення набувають адаптаційні властивості до біотичних та абіотичних факторів середовища. Нові генотипи винограду повинні сполучати показники високої технологічності та продуктивності з адаптивністю.

Тривалість селекційного процесу та мінливість попиту споживачів часто стає на заваді розповсюдженню сорту у різних регіонах виноградарства. Прискоренню та поглибленню вивчення адаптаційних властивостей перспективних форм винограду сприяє використання у селекційному процесі сучасних біотехнологічних [2] та ДНК-методів, які потребують

постійної оптимізації в залежності від обраної мети, селекційного завдання та сорту.

Метою нашої роботи була розробка та оптимізація сучасних біотехнологічних методів для прискорення процесу селекції та вивчення господарсько цінних показників винограду.

В якості матеріалу використовували сорти винограду різних напрямків використання, переважно селекції ННЦ “ІВІВ ім. В.Є. Таїрова”. В роботі застосовано методику культивування незрілих зародків та мікропагонів винограду *in vitro*, метод мікросателітних маркерів.

Селекційній роботі з ранніми сортами часто перешкоджає формування у них неповноцінного насіння з недорозвиненим зародком. У звичайних умовах отримати сіянці з такого насіння складно – вони виходять нежиттєздатними, або не виходять зовсім.

Проведені відділом селекції та лабораторією культури тканин випробування по вирощуванню незрілих зародків у культурі *in vitro* довели можливість індукування розвитку зародка та одержання життєздатної рослини на живильному середовищі з додаванням регуляторів росту.

У культурі *in vitro* протягом 2007-2009 років проводилося культивування незрілих зародків восьми комбінацій схрещування, які було взято на 30, 60 і 90 день після запилення. Для дослідження в *in vitro* відібрали зародки насінин чотирьох комбінацій ранніх і великоплідних столових сортів: Кеша х Кардишах, Кеша х Смена, Августин х Кардишах, Восторг х Кобзар. Найвищий результат (66,7 % проростків) було отримано у комбінації Августин х Кардишах при відборі проб на 60 день після запилення. У варіанті Кеша х Кардишах проростки отримані при відборі на 60 і 90 день. Вони істотно між собою не відрізнялися й склали 40-41,7 % від загальної кількості відібраних зародків.

У комбінаціях Восторг х Кобзар і Кеша х Смена відсоток життєздатних рослин був низьким за будь-яких термінів відбору. При розрізі насінин, які не проросли, було виявлено, що зона ендосперму була нежиттєздатна, бурого кольору.

Встановлено, що для підвищення рівня ембріогенезу й одержання ембріодів шляхом соматичного ембріогенезу ефективнішими були ранні терміни відбору (30-й день після запилення). Для проростання насінних зародків і утворення життєздатних проростків залежно від комбінації схрещування кращими були середні й пізні відбори (60-й і 90-й дні). Всі отримані проростки характеризувалися різною якістю, часто морфологічно відрізнялися від батьківських форм. Зустрічалися проростки з різними морфологічними змінами. Тільки в комбінаціях Кеша х Кардишах і Августин х Кардишах отримано повноцінні рослини. Після проходження адаптації вони були висаджені в селекційну теплицю для подальшого вивчення.

Одним із способів визначення посухостійкості винограду *in vitro* є застосування у складі поживних середовищ, високоосмотичної речовини

поліетиленгліколю (ПЕГ). На стресове середовище Мурасіге і Скуга (МС) +ПЕГ пересаджують рослини з добре розвиненим приростом та кореневою системою та встановлюють критичні для кожного сорту концентрації ПЕГ. Так, наприклад, для мікроклонів сорту Мускат гамбурзький 2034 ці концентрації склали 3,0% та 4,0%. Спостереження, які проводили впродовж перших 7 днів, показали, що мікроклони дослідних варіантів обох сортів відрізнялися від контрольних суттєво втратою тургору листових пластинок, а через 14 -15 днів у всіх були помітні зовнішні ознаки осмотичного шоку – підсихання та скручування листків, особливо страждали верхівки пагонів. За рахунок всихання апікальної частини у мікроклонів дослідних варіантів зменшувалась висота, кількість листків та міжвузлів. Контрольні рослини, навпаки, відрізнялися збільшенням цих показників, що свідчить про активні ростові процеси. Так, у мікроклонів сорту Мускат гамбурзький 2034, які культивували на МС+ПЕГ 3,0% та 4,0% концентрації, висота рослин зменшувалась відносно початкової на 28,9% - 31,2%, кількість листків та міжвузлів - удвічі (на 51,1% при вирощуванні на МС+ПЕГ 3% та 56,2% на МС+ПЕГ 4%). У рослин контрольних варіантів вищезгадані показники збільшувались відповідно на 20,4% (висота мікроклонів) та на 30,0% (кількість листків і міжвузлів).

Для підтвердження отриманих результатів за варіантами досліду проводили визначення основних показників водного режиму листків і пагонів досліджуваних мікроклонів (рис. 1). Встановлено, що найбільше загальної та легкозатримуваної води було у листках мікроклонів контрольних варіантів: кількість загальної води складала 86,9–88,2%, легкозатримуваної 80,0–84,0%. У дослідних варіантах ці показники знаходились на рівні 69,4-73,4 % у Шардоне 4876 та 76,7-78,7 % у Мускату гамбурзького 2034. Необхідно відмітити, що для мікроклонів винограду сорту Шардоне 4876 при 4,0% концентрації ПЕГ в середовищі вміст загальної води та її легкозатримуваної фракції був більшим у порівнянні з Мускатом гамбурзьким 2034, що може свідчити про вищу посухостійкість цього сорту. Достовірної різниці між показниками водного режиму у пагонах відмічено не було.

Також було проведено визначення вмісту пігментів у тканинах листків мікроклонів. Визначено, що дослідні рослини, які знаходились в умовах водного стресу, як правило, містили більшу кількість хлорофілів і каротиноїдів порівняно з контрольними. Так, порівняно з контролем у тканинах листків рослин Шардоне 4876, перенесених на поживне середовище МС+ПЕГ, спостерігали суттєве збільшення кількості хлорофілу «а» – на 10,9-24,4% і хлорофілу « б » – на 9,0-12,2%, каротиноїдів на 16,1-36,7% порівняно з контролем.

Як відомо, чим менше змінюється сума хлорофілів після впливу посухи, тим менше змінюються пластиди листка, тим стійкіший сорт до впливу стресових умов.

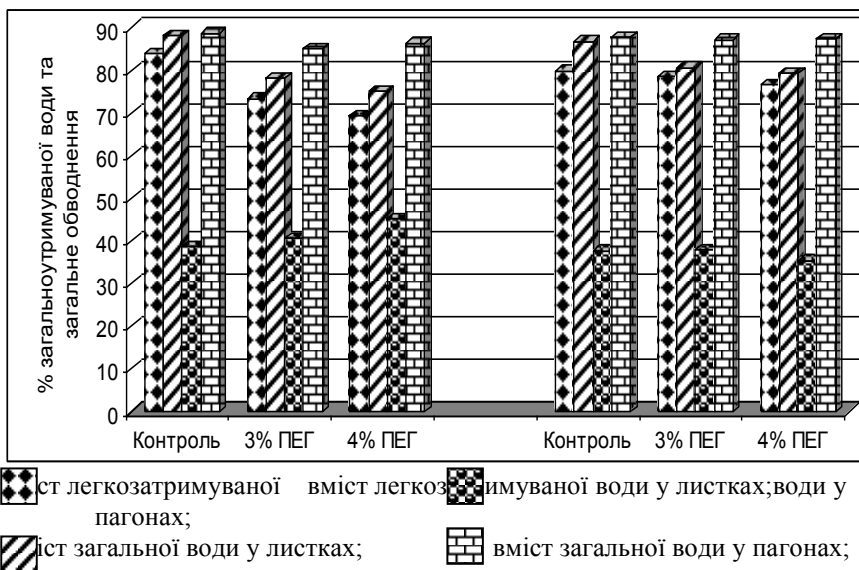


Рис. 1. Основні показники водного режиму листків та пагонів мікроклонів винограду за наявності ПЕГ у поживному середовищі (середнє за 2007-2010 рр.).

На основі цього можна зробити висновок, що найстійкішим до водного дефіциту серед досліджуваних сортів є сорт Шардоне, що збігається з його загальновідомими характеристиками.

Солестійкість. Для вивчення стійкості винограду до засолення хлоридного, сульфатного та карбонатного типу були обрані підщепні сорти винограду –Кречунел 2, РхР 101-14 та нові підщепи Добриня і Таїровський 1. У роботі використали широкий спектр концентрацій солей, аби встановити нормальні, адаптивні, екстремальні і летальні рівні засолення.

Під час культивування мікроклонів винограду на засоленних середовищах були помітні візуальні ознаки впливу солей. У мікроклонів виявили пошкоджені, некротичні ділянки та хлороз листків, усихання верхівок приросту або основи стебла, призупинявся ріст кореневої системи. За рахунок усихання (у випадку карбонатного та хлоридного засолення) зменшувалась висота стебла та кількість листків, а при засоленні сульфатами сповільнювався ріст та розвиток рослин. Рослини контрольного варіанту усіх сортів нормально розвивались впродовж періоду спостережень. Рослин сорту Кречунел 2 характеризувалися збільшенням висоти стебла за 7 днів на 11,5% та кількістю листків на 10,5%, а мікроклони винограду сорту 101-14 – відповідно на 18,0% та 21,4%. Содове засолення

0,1% Na_2CO_3 дещо пригнічувало ріст стебла винограду сорту Кречунел 2 (на 3,4%), а збільшення кількості солі до 0,2% призвело до усихання стебла на 16,5% та значного зменшення кількості листків – на 65,0%. У мікроклонів винограду сорту 101-14 відмітили незначне зниження приросту (на 1,5-2,7%), однак кількість листків значно зменшувалась – на 41,3-43,8% за наявності у середовищі 0,15 та 0,2% соди.

На 7-й день досліджень у рослин контрольного варіанту сорту Таїровський 1 відмітили збільшення висоти стебла порівняно з початковою на 15,7%, листків – відповідно на 18,0%. У варіантах з сульфатним типом засолення за невисоких концентрацій (0,4-0,8% Na_2SO_4) приріст стебла був дещо нижчим і складав 5,1-11,5%, у варіанті з вищим вмістом солі ріст мікроклонів призупинявся. У випадку внесення в поживне середовище карбонатів спостерігали усихання стебла та відмирання листків уже на 7-й день після пересадки. Протягом 20 днів після пересаджування рослин на середовище, засолене 0,1% Na_2CO_3 , висота мікроклонів цього сорту зменшувалась на 4,1-9,7%, а у варіантах з 0,4-0,8% - на 27,8-38,7%. У рослин винограду сорту Таїровський 1 варіанту, де засолення створювали, додаючи CaCO_3 у кількості 10,0-17,0%, не відмічено морфологічних змін у рослин на 7-й день досліджень, однак через 20 днів у окремих мікроклонів спостерігалось значне пошкодження нижніх листків (варіант з концентрацією 10,0% CaCO_3), а також частково – листків середнього ярусу (14,0% CaCO_3), у деяких випадках проявлялись ознаки хлорозу. Для рослин, пересаджених на середовище з найнижчим вмістом крейди, відмітили гарний приріст стебла та листків, однак згодом спостерігали усихання вегетативної маси мікроклонів. Подібну тенденцію відмічено і для варіантів з вищою концентрацією CaCO_3 . Для рослин підщепного сорту – Добриня – відмічено подібну тенденцію до зміни показників росту мікроклонів, однак в цілому пошкоджень у рослин було більше, що може свідчити про гірше перенесення умов модельного засолення виноградом цього сорту.

Для варіантів, де створювали сульфатний тип засолення, використані концентрації (0,1-0,3% MgSO_4 , 0,4-1,0% Na_2SO_4) не вплинули видимо на розвиток мікроклонів, за винятком варіанту з найвищим вмістом Na_2SO_4 , де рослини мали бурі некротичні ділянки на листових пластинках. На середовищі з сульфатом магнію для мікроклонів характерні гарні показники росту – на рівні контрольних і вищі. Також відмітили гарні нові корені у всіх рослин. На середовищі з нижчим вмістом Na_2SO_4 у рослин спостерігали значний приріст стебла вже на 7-й день досліджень (20,3%), культивування на середовищі з вищим вмістом цієї солі призвело до сповільнення росту мікроклонів та кількості листків; також лише у частини рослин (40,0%) відновлювалися корені.

Для вивчення впливу хлоридного засолення в поживне середовище вносили 1,0-3,0% NaCl . Уже нижча концентрація солі призвела до види-

мого пошкодження рослин: висихали листки нижнього та середнього ярусу, у випадку вищих концентрацій ураження було сильнішим. Однак у мікроклонів варіанту з нижчим вмістом хлориду висота стебла зростала на 19,6%, а кількість листків зменшувалась на 3,2%. Підвищення вмісту хлориду натрію в середовищі призвело до усихання верхівки приросту на 16,6-25,7% та пошкодження листків на 6,8% (варіант 2% NaCl) та на 70,5% (варіант 3,0% NaCl). На 20-й день культивування на засоленому хлоридами середовищі загинули рослини усіх варіантів, крім того, де концентрація була найнижчою, у мікроклонів відмічено відмирання листків та втрата тургору верхівок приросту. На субстраті з високим вмістом солей Na_2CO_3 , NaHCO_3 , NaCl всі рослини варіанту загинули вже на 20-й день після пересадки.

Що стосується стійкості до содового засолення, то, як виявилось, концентрації 0,4-0,8% Na_2CO_3 та 0,2% NaHCO_3 є летальними або близькими до них. Хлориди, внесені у кількості 1,0%, уже значно вплинули на розвиток рослин, однак для експрес-діагностики рослин роботу над підбором концентрацій слід продовжити.

Таким чином, серед досліджуваних концентрацій можна виділити летальні для обох сортів - 0,4-0,8% Na_2CO_3 та 0,2% NaHCO_3 , 1,5% NaCl , а використані концентрації CaCO_3 та сульфатів є швидше адаптивними для мікроклонів. Слід відзначити, що в умовах культивування *in vitro* виноград сортів Кречунел 2 та 101-14 показує подібну реакцію на содове засолення, а для селекційних підщепних сортів Добриня та Таїровський 1 відмітили суттєвіше зниження вивчених показників. Виноград сорту Таїровський 1 є найбільш стійким до всіх типів засолення, у порівнянні із сортом Добриня.

Перспектива використання молекулярно-генетичних досліджень геному винограду очевидна. Це одержання даних щодо походження та споріднення сортів винограду, які в процесі багатовікової селекції поширилися в усьому світі і отримали безліч синонімічних назв. Оцінити систематику вже наявних стародавніх сортів, а також запобігти безконтрольному розмноженню нових сортів можна шляхом ідентифікації та паспортизації генотипів рослин, що призведе до створення єдиного світового банку даних, який буде містити інформацію про аборигенні сорти, стародавні і сучасні сорти і клони винограду. Єдиний банк даних допоможе зберегти генетичні ресурси рослин, уникнути порушення авторських прав оригінаторів, зберегти історично цінні культурні сорти винограду і буде сприяти інтенсивному розвитку світового виноградарства і виноробства.

Наявність фундаментальних знань, як правило, є необхідною умовою за створення тих або інших прикладних втілень наукових досягнень і впровадження їх у практику. На даному етапі розвитку генетики і селекції необхідна глобальна модернізація методологічної бази, а саме запровадження у виробництво сучасних наукових розробок. Невід'ємною складо-

вою цього є зв'язок класичних генетичних та молекулярно-генетичних досліджень і сільськогосподарського виробництва.

Нашими дослідженнями на основі гібридологічного аналізу генотипів батьківських та прабатьківських сортів та їхніх гібридів вдалося підтвердити закономірності успадковування деяких якісних ознак (“троно: за розміром”, “троно: за щільністю”, “ягода: за розміром”, “ягода: коліршкірки”) та встановити типи взаємодії відповідних генів. Визначення генотипів рослин за якісними ознаками може бути використано для генотипування сортів винограду, для уточнення походження сортів, а також для оптимального добору вихідних селекційних форм за господарськоцінними властивостями.

Отримана інформація щодо генотипів сортів та гібридів, а також типів взаємодії генів поглиблює уявлення щодо успадковування якісних ознак винограду для селекційної практики. Проте визначення генотипів особин та складання генотипових формул є складною задачею за відсутністю єдиної системи визначення генів та дуже малої кількості підтверджених гіпотез щодо можливих механізмів успадковування ознак винограду.

Окремі автори пропонують позначення генів якісних ознак винограду [3, 4], проте єдиної загально прийнятої системи позначення генів поки що немає.

Такі дослідження необхідно привести до єдиної теоретичної основи, в якій будуть виявлені типи взаємодії генів, які обумовлюють прояв важливих ампелографічних ознак, ідентифіковані гени, які кодують дані ознаки, та уніфікована єдина система визначення генів господарськоцінних ознак винограду.

Сучасні біотехнології розвиваються у двох основних напрямках: ДНК-технології (оцінка генетичного різноманіття; розподіл генотипів за генетичною спорідненістю; селекція за допомогою молекулярних маркерів; ідентифікація сортів; створення бази даних алельного стану ДНК-локусів сортів; лабораторна апробація та діагностика) і культура тканин *in vitro* (збереження генетичного розмаїття ресурсів рослин та ін.) [5, 6, 7, 8, 9].

Нами проведено дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму гібридних популяцій сіянців F_1 винограду за допомогою мікросателітних маркерів (рис. 2.). Отримані дані щодо алельних характеристик МС-локусів порівнювалися з оцінкою морфобіологічних характеристик гібридної популяції сіянців, при цьому була виявлена залежність між алельними варіантами мікросателітних локусів і проявом морфобіологічних ознак. При порівнянні молекулярно-генетичного поліморфізму алелів мікросателітних локусів і морфобіологічних показників виявлено помірний взаємозв'язок між фенотипом «відкрите розташування лопатей верхніх листових вирізів» і алелем 208 п.о. локусу VMC2h4 ($r = 0,42$) (хромосома 12).

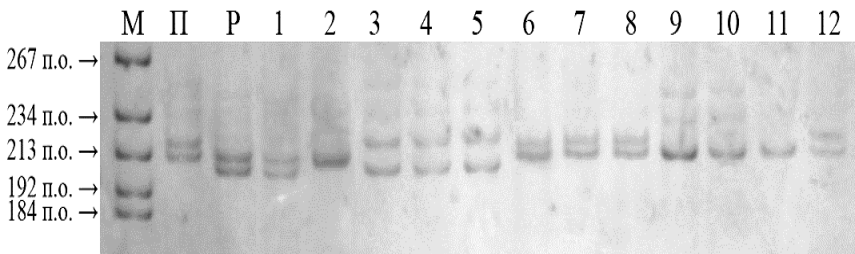


Рис. 2. Результати електрофорезу продуктів ампліфікації ДНК гібридної популяції сіянців за мікросателітним локусом VMC2h4 (М – молекулярний маркер *pBR 322 DNA / BsuR1*; П – батьківській сорт Піфос; Р – батьківській сорт Рубін таїровський; 1 – 12 – гібриди)

Проведено дослідження генетичного поліморфізму сортів і клонів винограду, що дозволило виявити найбільш типові алелі, оцінити алельний склад локусів і одержати ДНК-маркерну систему для характеристики цінних генотипів винограду. На основі молекулярно-генетичного аналізу підібрана ДНК-маркерна система для характеристики генотипів винограду, за допомогою якої можливо представити генотипи у вигляді генотипових формул. Проте необхідно відмітити, що використання ДНК-паспорту необхідно поєднувати з повним описом морфобіологічних характеристик, особливо при реєстрації клонів.

В дослідженнях використовується кластерний аналіз генетичної подібності сортів та клонів винограду, який дозволяє підтвердити їхню спорідненість розподілом на дендрограмі генотипів в субкластери, визначити розходження між особинами з метою ідентифікації сортів і диференціації клонів та надає можливість відбору оптимальних батьківських пар для селекції.

Висновки: 1. Розроблено поживні середовища та доведено можливість отримання з їх допомогою повноцінних рослин винограду із недозрілого насіння, що сприятиме отриманню ранньостиглих крупноплідних генотипів винограду.

2. Розроблено склад живильних середовищ та показано придатність методу культивування *in vitro* для прискореної оцінки генотипів підщепних сортів винограду на посухостійкість та стійкість до різних типів засолення.

3. На основі молекулярно-генетичного аналізу підібрано ДНК-маркерну систему для характеристики генотипів винограду.

Список використаних джерел

1. Айвазян П. К. Селекция виноградной лозы / П. К. Айвазян, Е. Н. Докучаева. – К.: УАСХН, 1960. – 343 с.
2. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. – К. : Наук. Думка, 1980. – 488 с.
3. Кулиджанов Г. В. Вероятные механизмы наследования признака аромата ягоды у винограда (*Vitis Vinifera L.*) / Г. В. Кулиджанов // Магарач. Виноградарство и виноделие. – 2003. – № 1. – С. 13-15.
4. Клименко В. П. Паспортизация сортов винограда по идентифицированным генам / В. П. Клименко, Л. П. Трошин // Виноград и вино России. – 1994. – № 1. – С. 12-14.
5. Теслюк Н.І. Удосконалення методів культури in vitro для селекції та розмноження винограду / Н.І.Теслюк. – К., 2009.
6. Черевата Т.М. Розробка і оптимізація прийомів клонального мікророзмноження для виробництва садивного матеріалу винограду / Т.М.Черевата. – К., 2006.
7. Размножение с использованием культуры in vitro // Виноградарство Северного Причерноморья: монография ; под ред. В. В. Власова. – Арциз, 2009. – С. 63.
8. Thomas M. R. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphism when analyzed as sequence-tagged sites (STSs) / M. R. Thomas, N. S. Scott // Theor. Appl. Genet. – 1993. – V. 86. – P. 985-990.
9. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species / K. M. Sefc, F. J. Regner, E. Turetschek et al. // Genome. – 1999. – V. 42. – P. 367-373.

В статье изложено результаты разработки и оптимизации новейших методов селекции и изучения генотипов винограда нового поколения с использованием современных биотехнологий (культура ткани *invitro*, ДНК-анализ) и усовершенствованных классических методов. Доказана возможность получения полноценных растений винограда из незрелых семян, что позволяет выделить раннеспелые крупноплодные генотипы винограда. С целью ускорения селекционного процесса и изучения адаптивных свойств новых генотипов винограда применено изучение солевыносливости и засухоустойчивости в контролируемых условиях культуры ткани *invitro*. Эффективно использованы методы генетического и молекулярно-генетического анализа на различных этапах селекционного процесса для исследования полиморфизма гибридов, сортов и клонов винограда.

The paper presents the results on the development and optimization of modern breeding methods and the study of grapes belonging to a new

generation with the application of modern techniques (tissue culture in vitro, DNA – analysis) and improved classical methods. The possibility to obtain full-valued grape plants from immature seeds permitting to select early-matured large-sized genotypes of grapes has been proved. For the purpose of acceleration of breeding process and the study of adaptive properties of new genotypes of grapes the investigation on salt-tolerance and drought-resistance under the controlled conditions of tissue culture in vitro is carried out. The methods of genetical and molecular-genetical analysis at different breeding process stages were effectively used in order to investigate grape hybrid, variety and clone polymorphism.