

УДК 634.835:581.145

DOI <https://doi.org/10.32851/2226-0099.2020.114.7>

РЕЗУЛЬТАТИ ЗАСТОСУВАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ У ГЕНЕРАТИВНІЙ ТА КЛОНОВІЙ СЕЛЕКЦІЇ ВІНОГРАДУ В УКРАЇНІ

Ковальова І.А. – к. с.-г. н., директор,

Національний науковий центр

«Інститут виноградарства і виноробства імені В.Є. Таїрова»

Національної академії аграрних наук України

Узагальнено результати, отримані в ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» за допомогою методів культури *in vitro* під час виконання програм генеративної та клонової селекції, визначено їх ефективність та перспективу використання.

Проаналізовано основні напрями застосування біотехнологічних методів у генеративній та клоновій селекції винограду. Показано, що основним напрямом використання культури *in vitro* у клоновій селекції винограду є прискорене розмноження нових генотипів на безвірусній основі, що може відбуватися як на універсальних поживних середовищах, так і на середовищах, розроблених для певного генотипу винограду.

Аналіз результатів прискореного розмноження генотипів 5-ти столових, 3-х технічних і 3-х підщепних сортів, а також клонів сортів демонструє, що показники приживлюваності на рівні 86-90% та коефіцієнт мультиплікації від 1,7 до 2,7 на модифікованих середовищах дають можливість швидкого розмноження як елемент зберігання / поширення / розмноження генетичних ресурсів винограду.

Продемонстровано, що в генеративній селекції перспективним напрямом застосування біотехнологічних методів є прискорений скринінг генотипів у культурі *in vitro* на солета посухостійкість, що дозволяє скоротити строки оцінки генотипів у польових умовах щонайменше на 3 роки. За допомогою зазначених методів було оцінено на солета посухостійкість матеріал нових підщепних сортів Добриня та Гарант, а також прищепного сорту Кардишак.

Дослідження ураження вірусом скручування в культурі *in vitro* на провокаційних середовищах із сорбітолом може замінити метод індексації щепленням на сорти-індикатори за тестування клонів винограду та скорочує строки тестування від 2-х-3-х років до кількох місяців. Проте метод не дозволяє розрізнити за симптоматикою ураження першим і третім серотипами вірусу скручування листя, що обмежує його застосування за тестування в програмах сертифікації.

Ключові слова: виноград, клони та сорти, культура *in vitro*, стійкість, посуха, засолення, вірусні хвороби, скручування листя винограду.

Kovaljova I.A. The results of biotechnological methods application in grapevine breeding and clonal selection in Ukraine

The results obtained at the NSC "Tairov Research Institute of Viticulture and Wine-Making" using *in vitro* culture methods during the implementation of breeding and clonal selection have been summarized, their effectiveness and prospects for use have been determined.

The main directions of biotechnological methods application in breeding and clonal selection of grapevine have been analyzed. It is shown that the main direction of *in vitro* culture use for grapevine clonal selection is the accelerated propagation of new genotypes on a virus-free basis which can occur both on universal nutrient media and on media developed for a particular genotype of grapes.

Analysis of the genotypes accelerated propagation results of 5 table, 3 wine and 3 rootstock varieties, as well as clones of varieties shows that the survival rate at the level of 86-90% and the multiplication rate from 1.7 to 2.7 on modified media allow rapid propagation as an element of storage / distribution / propagation of grapevine genetic resources.

It has been shown that perspective direction of biotechnological methods application for breeding is *in vitro* genotypes screening for salt and drought resistance, which allows to reduce the time of genotype evaluation in the field by at least 3 years. Using these methods, the material of the new rootstocks Dobrynya and Garant, as well as the Kardyshakh table variety has evaluated for salt and drought resistance and reduces testing time from 2-3 years to several months.

The study of grapevine leafroll virus in vitro culture on sorbitol-contained media can replace the indexing method by grafting on indicator varieties for grapevine clones testing and reduced the testing period from 2-3 years to several months. However, the method does not allow to distinguish the symptoms of the grapevine leafroll virus first and third serotypes, which limits its use for testing in certification programs.

Key words: grapevine, clones and varieties, in vitro culture, resistance, drought, salinization, virus diseases, grapevine leafroll.

Постановка проблеми. Біотехнологічні методи, насамперед культура *in vitro*, нині є одним із необхідних інструментів у селекції винограду. Ефективність їх використання залежить від напрямку селекції (генеративна чи клонова), завдань застосування та використаних генотипів, які розрізняються як за швидкістю розмноження, так і за резистентністю до абіотичних та біотичних факторів довкілля. При формулюванні селекційних завдань необхідно визначити доцільність та ефективність використання біотехнологічних методів стосовно певних генотипів, що може позитивно позначитися на строках селекційного процесу.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Напрями застосування культури *in vitro* у селекції є досить різноманітними, але найбільш ефективними та такими, що найчастіше застосовуються, є прискорене розмноження генотипів сортів або клонів у культурі *in vitro* (селекційні генотипи, генотипи, вільні від вірусів винограду тощо) [1; 2; 3; 4; 5; 6] та ранній скринінг генотипів на стійкість до абіотичних та біотичних факторів [7; 8].

Дослідження із розмноження *in vitro* у світі включали вивчення впливу численних факторів, у тому числі середовищ (мінеральний і гормональний склад) [1; 2; 5], генотипів [2; 3; 4; 5; 6], режимів зберігання [3], біологічно активних речовин [6] тощо. Проте зазначені дослідження здебільшого були пов'язані із окремими питаннями збереження генетичних ресурсів, фізіології або фітопатології винограду і не мали на меті обслуговування широкомасштабних селекційних програм.

Постановка завдання. В основу робочої гіпотези нашого дослідження було покладено припущення щодо необхідності диференціації напрямів використання методів культури винограду *in vitro* залежно від напрямку селекції, завдання селекційних програм та особливостей генотипів, що використовуються.

Метою роботи є узагальнення результатів, отриманих у ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» за допомогою методів культури *in vitro* під час виконання програм генеративної та клонової селекції, визначення їх ефективності та перспектив використання. Для цього потрібно було вирішити такі завдання:

- 1) проаналізувати ефективність використання культури *in vitro* для прискореного розмноження нових генотипів винограду.
- 2) охарактеризувати спрямованість і результативність методів раннього скринінгу селекційних генотипів за допомогою методів культури *in vitro*.

Матеріалом для досліджень були клони та сорти селекції ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова». Клоновий матеріал був представлений клонами 3-х технічних сортів (Каберне Совіньйон 441, Марсельський чорний ранній 1294, Рислінг рейнський 14172), п'яти столових сортів (Оригінал 5861, Мускат гамбурзький 2694, Одеський сувенір 7844, Мускат Таїровський 371, Мускат жемчужний 7251) і трьох підщепних сортів (Ріпарія x Рупестріс 101-14 4923, Берландієрі x Ріпарія СО4 1791, Берландієрі x Ріпарія Кобера 5 ББ 21192), а також столовий сорт Кардишах і підщепні сорти Добриня та Гарант.

Під час досліджень було використано класичні методи культури *in vitro* (введення до культури, пасажування на живильних середовищах, адаптація до умов

in vivo). Використані середовища розподілялися на 2 групи, які дозволяли прискорити процес розмноження та отримати високі коефіцієнти мультиплікації, та провокаційні, що дозволяли моделювати умови абіотичного стресу (посуха, засоленість земель) та оцінювати реакцію генотипів на стрес.

Виклад основного матеріалу дослідження. Використання культури in vitro для прискореного розмноження нових генотипів винограду здебільшого проводилося на клоновому матеріалі технічних, столових і підщепних сортів (Черевата Т.І., 2006; Зеленянська Н.М., 2015) [9, 10], оскільки розмноження цього матеріалу на рівні біологічних категорій передбачає особливі умови та вимоги стосовно санітарного та генетичного контролю.

Використаний матеріал був вільним від 7 вірусів винограду (насамперед вірусу коротковузля та 2-х серотипів вірусу скручування листя винограду), контроль на які є неодмінною умовою отримання європейських категорій садивного матеріалу «базовий» і «сертифікований». Підібраний склад середовищ як універсальних, так і специфічних для певних генотипів, дозволив отримати рівні приживлюваності в середньому від 89 до 100% із високими коефіцієнтами розмноження 1,7-2,7 для технічних сортів та 1,9-2,7 для підщепних сортів (рис. 1).

Дослідження, проведені в Чилі, показали, що розробка спеціального протоколу для розмноження окремого сорту дає можливість отримати протягом 4-х місяців до 10 000 рослин [1]. Оптимізація гормонального складу середовищ забезпечує укорінення на рівні 95% [2] та приживлюваність на етапі адаптації до 95% [3]. Стандартизація методики розмноження для кількох сортів теж дає можливість досягнути високих рівнів розмноження із коефіцієнтом мультиплікації понад 5 [4].

Отримані результати свідчать про потенційну можливість у разі необхідності швидко розмножити як досліджені генотипи клонів сортів, так і інші з урахуванням специфіки та швидкості введення у культуру клонів сортів різного напрямку використання.

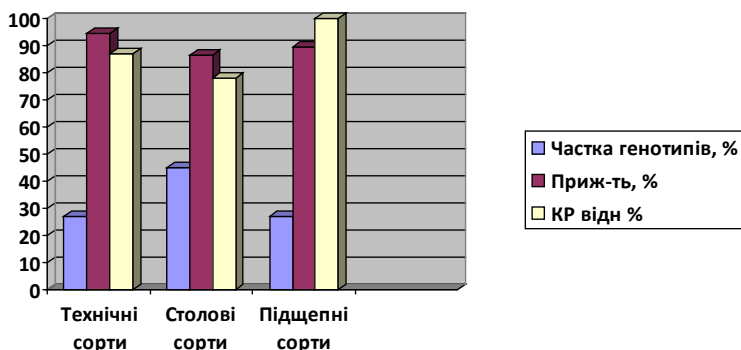


Рис. 1. Середні рівні приживлюваності та коефіцієнт розмноження клонів столових, технічних і підщепних сортів винограду (2006-2016 рр.)

Примітка: КР відносний – значення коефіцієнту розмноження у відсотках, де за 100% прийнято коефіцієнт розмноження підщепних сортів винограду

Аналіз закордонних досліджень демонструє, що культура in vitro найчастіше використовується або для розмноження після застосування процедур оздоровлення від вірусів, або для розмноження малопоширених чи автохтонних генотипів [1; 2; 4; 6]. Напрямок використання розмноження винограду в культурі in vitro,

застосований у селекційних програмах ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», є дещо специфічним, оскільки перевірка на віруси, що проводиться під час 2-х вегетативних поколінь клонодослідження, практично виключає необхідність процедур хемо- чи термотерапії, проте заплановане широкомасштабне розмноження клонів мало на меті отримання великої кількості маточних насаджень у регіональних розсадниках, актуальність чого нині зростає.

Стосовно автохтонних генотипів, оскільки Україна у цьому плані представлена виключно сортами власної селекції, які мають закладені маточники або мікроматочники тощо, то їх розмноження може бути обмежене традиційними методами.

Оцінка результативності застосування методів раннього скринінгу за допомогою культури in vitro.

Останніми 20 роками зафіксували зміну трендів у використанні методів культури in vitro. Так, якщо на початку її використання стосовно винограду вважалося, що ці методи більш придатні або для швидкого розмноження, або для проведення оздоровчих процедур від вірусів, нині все частіше ці методи використовуються для різнопланового прискореного скринінгу генотипів. Серед низки цих випробувань прискорена оцінка генотипів винограду в ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» була зроблена відносно створення стресових умов для генотипів (таблиця 1).

Так, було досліджено 2 абіотичні (засоленість і посуха) [9; 10; 11] та 1 біотичний чинник (ураження вірусом скручування листя) [12]. Оцінка ефективності застосування культури in vitro для скринінгу генотипів показала, що за оцінки впливу абіотичних факторів період випробування порівняно із польовою оцінкою зменшується щонайменше на 3 роки.

Таблиця 1

Напрями прискореного скринінгу селекційних генотипів винограду в культурі in vitro в умовах змодельованого стресу (2010-2017 рр.)

Напрямок використання генотипу	Напрямок скринінгу	Сорт	Особливості модифікації середовища та автори	Рекомендації та час зменшення польових досліджень
Підщепні сорти	Абіотичні фактори. Солестійкість	Добриня, Гарант	Модифіковане МС середовище із додаванням NaCl, CaCO ₃ , NaHCO ₃ для моделювання засолення	Прискорений скринінг генотипів підщепних сортів винограду; до 3-х років
Прищепні сорти	Абіотичні фактори. Посухостійкість	Кардишак	МС середовище із додаванням ПЕГ як осмотичного агенту для моделювання посухи	Прискорений скринінг генотипів підщепних сортів винограду; до 3-х років
Прищепні сорти	Біотичні фактори. Виявлення вірусу скручування листя	Каберне Совіньон	МС середовище із додаванням ПЕГ як осмотичного агенту	Неспецифічний попередній скринінг на ВСЛВ 3. 2 місяці замість 2-х-3-х років за індексації щепленням

При використанні змодельованого стресу для санітарної оцінки клонового матеріалу на ураження третім серотипом ВСЛВ економія часу складає щонайменше 2 роки порівняно із обов'язковою (відповідно до стандарту ЕРРО) індексацією щепленням на сорт-індикатор Каберне Фран. Проте метод не дозволяє розрізнити за симптоматикою ураження першим і третім серотипами вірусу скручування листя, що обмежує його застосування.

Моделювання стресових умов у культурі є загальноприйнятим для прискороного скринінгу нових селекційних генотипів винограду [7] на стійкість до цього фактору, в тому числі підщепних сортів і [8] *Vitis silvestris* виявлення найбільш стійких із них.

Стрес може бути як однофакторним, так і комбінованим. Наприклад, дослідження посухостійкості проводиться деякими авторами паралельно з оцінкою впливу вірусу скручування листя на виноградну рослину, оскільки обидва фактори негативно впливають на провідну систему рослин, тож один фактор підсилює діяльність іншого. Дослідження вірусних хвороб в умовах *in vitro* можуть бути спрямовані не лише на моделювання стресових умов чи на прискорене виявлення хвороби [8; 13; 14], але й дослідження фізіолого-біохімічних процесів на тлі ураження [15].

Використання культури *in vitro* як моделі до виявлення резистентності має свої переваги і недоліки. Хоча умови *in vitro* істотно відрізняються від польових, що є явним недоліком, виключення варіабельності таких чинників як світло, температура, рівень поживних речовин та ураження патогенами є позитивним для дослідів, у яких переважають негативні.

Позитивним у дослідів із використанням культури *in vitro* є також висока швидкість отримання результатів і низька ціна. Оскільки в низці випадків показано відповідність даних, отриманих у полі та в культурі *in vitro*, останній метод можна вважати об'єктивним і таким, що відповідає польовому експерименту [15].

Більшість проаналізованих робіт не ставить на меті скринінг великої кількості матеріалу на стійкість до того чи іншого фактору довкілля, проте широкий спектр фізіологічних і біохімічних досліджень, що застосовується для оцінки генотипів, дає підстави для припущення, що дослідів в культурі *in vitro* можуть стати адекватною моделлю для польових експериментів та істотно скоротити час добору нових селекційних генотипів. Підвищення ефективності цього напрямку досліджень у ННЦ «ІВіВ ім. В.С. Таїрова» планується отримати шляхом поєднання дослідів у культурі *in vitro* та методу ДНК-маркерів, зокрема мікросателітних ДНК-маркерів.

Висновки і пропозиції. Аналіз результатів прискороного розмноження генотипів винограду, отриманих внаслідок генеративної та клонової селекції (всього 5 сортів столового, 3 технічного і 3 підщепного напрямів використання), демонструє, що високі показники приживлюваності (в середньому 86-90%) та коефіцієнту мультиплікації (до 2,7) на модифікованих середовищах дають можливість за необхідності швидко розмножити будь-який генотип із ампелографічної колекції, банку клонів чи селекційних ділянок як елемент зберігання / поширення / розмноження генетичних ресурсів винограду.

Результати використання прискороного скринінгу генотипів у культурі *in vitro* дозволяють зробити висновок, що методи оцінки генотипів підщепних сортів винограду на соле- та посухостійкість є перспективними для генеративної селекції, оскільки вони дозволяють скоротити строки оцінки генотипів у польових умовах щонайменше на 3 роки.

Дослідження ураження вірусом скручування в культурі *in vitro* може замінити метод індексації щепленням на сорти-індикатори, який є обов'язковим для тестування клонів винограду на ураження вірусами, проте неможливість розрізнення першого і третього серотипів ВСЛВ вимагає подальшого удосконалення культурального методу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Tània San Pedro Rosa, Peiró Joan Villanova, Antonio Olmos, Carmina Gisbert *In vitro* propagation of *Vitis vinifera* L. cv. 'Monastrell'. *Electronic Journal of Biotechnology* 27 (2017) 80–83.
2. Skiada F, Grigoriadou K, Eleftherio E. Micropropagation of *Vitis vinifera* L. cv. 'Malagouzia' and 'Xinomavro'. *Cent Eur J Biol* 2010;6:839–52.
3. De Carvalho-Silva R, Gomes-Luis Z, Scherwinski-Pereira J.E. Short-term storage *in vitro* and large-scale propagation of grapevine genotypes. *Pesq Agrop Brasileira* 2012;47:344–50.
4. Dev R., Singh S.K., Singh A.K., Verma K. Comparative *in vitro* multiplication of some grape (*Vitis vinifera*) genotypes. *Indian J Agric Sci* 2016;85:1477–83.
5. Mukherjee P, Husain N, Misra C, Rao VS. *In vitro* propagation of grape rootstock de Grasset (*Vitis champinini* Planch.): Effects of medium composition and plant growth regulators. *Sci Hortic* 2010;126:13–9.
6. Eftekhari M., Alizadeh M., Mashayekhi K., Asghari H.R. *In vitro* propagation of four Iranian grape varieties: Influence of genotype and pretreatment with arbuscularmycorrhiza. *Vitis* 2012;51:175–82.
7. Sivritepe N., Eris A. Determination of Salt Tolerance in Some Grapevine Cultivars (*Vitis vinifera* L.) Under *in vitro* Conditions. *Tr. J. of Biology* 23 (1999) 473–485.
8. Markovic Z, Preiner D, Mihovilovic-Bosnjak A, Safner T, Stupic D, Andabaka Z et al. *In vitro* introduction of healthy and virus-infected genotypes of native Croatian grape-vine cultivars. *Cent. Eur. J. Biol.* 2014;9:1087–98.
9. Черевата Т.М. Розробка і оптимізація прийомів клонального мікророзмноження для виробництва садивного матеріалу винограду : дис. канд. с.-г. наук: 06.01.08 / Національний науковий центр «Інститут виноградарства і виноробства ім. В.Є. Таїрова». Одеса, 2006. 159 с.
10. Зеленянська Н.М. Наукове обґрунтування та розробка сучасної технології вирощування садивного матеріалу винограду : дис. докт. с.-г. наук: 06.01.08./ Національний науковий центр «Інститут виноградарства і виноробства ім. В.Є. Таїрова». Одеса, 2015. 642 с.
11. Гогулінська О.І. Розробка та вдосконалення методів оцінки стійкості винограду до стрес-факторів із використанням культури *in vitro* : автореф. дис. канд. с.-г. наук: 06.01.08 / Нац. акад. аграр. наук України, Нац. наук. центр «Ін-т виноградарства і виноробства ім. В.Є. Таїрова». Одеса, 2014. 20 с.
12. Мулюкіна Н.А., Зеленянська Н.М., Іванова-Ханіна Л.В., Карастан О.М., Лосева Д.Ю. Оптимізація біотехнології отримання вихідного матеріалу винограду, вільного від вірусу скручування листя винограду. *Виноградарство і виноробство*, 2016, вип. 53, С. 151–154.
13. Popescu C.F., Bejan C., Dumitrica R.N., Dejeu L.C., Nedelea G. Rootstocks and wild grapevines responses to salinity / *Vitis* 54 (Special Issue), (2015), 197–201.
14. Zhen-Hua Cui, Wen-Lu Bi, Xin-Yu Hao, Yan Xu, Peng-Min Li, M.A. Walker and Qiao-Chin Wang. Responses of *in vitro*-grown plantlets (*Vitis vinifera*) to grapevine leafroll-associated virus-3 and PEG-induced drought stress. *Front Physiol.* 2016;7:203.
15. Khristov I.K., Stefanov D., Goltsev V.N., Abrasheva P. (2001). Effects of grapevine fanleaf and stem pitting viruses on the photosynthetic activity of grapevine plants grown *in vitro*. *Russ. J. Plant Physiol.* 48, 473–477.