

Особенности создания коллекции крымских автохтонных сортов винограда *in vitro*

Ирина Александровна Павлова, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда, pavlovairinal965@gmail.com;

Екатерина Александровна Лушчай, мл. науч. сотр. лаборатории генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда, lea_rs@mail.ru;

Анастасия Викторовна Петухова, мл. науч. сотр. лаборатории генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда, slotog@mail.ru;

Анифе Смаиловна Абдурашитова, мл. науч. сотр. лаборатории генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда, abdurashitova97@inbox.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН», ул. Кирова 31, Ялта 298600, Российская Федерация

В статье приводятся результаты работы по созданию коллекции крымских автохтонных сортов *in vitro*. Нынешнее состояние требует принятия экстренных мер по поддержанию ее жизнеспособности. Одним из возможных способов сохранения ценного генетического материала является создание вегетирующих коллекций растений *in vitro*. Процесс создания коллекции растений *in vitro* автохтонных сортов винограда состоял из отдельных этапов: этап «сбор исходного материала», этап «получение первичного экспланта», этап «стерилизация и введение в условия *in vitro* одно- двухглазковых эксплантов побегов», этап «индукция развития побега», этап «укоренение развившихся побегов», этап «минимальное размножение микрочеренкованием до объема 10–15 растений», этап «перевод растений из активного роста в режим глубокого покоя для сохранения». Получена асептическая культура 47 автохтонных крымских сортов винограда, что составляет 65,3% от общего числа собранных на Ампелогографической коллекции Института «Магарач». Основные причины, лимитирующие сортовой спектр, были вызваны отсутствием пролиферации почки *in vitro* и гибелью растений на стадии индукции побега. Таким образом, вместе с образцами, которые уже поддерживались в культуре, вегетирующая коллекция крымских автохтонных сортов составляет 50 образцов.

Ключевые слова: растение; эксплант; побег; 6-бензиламинопуридин (БАП); α-нафтилуксусная кислота (НУК); образец; регенерация; индукция.

Введение. На территории Крыма издавна возделывается виноград, производится вино, в том числе из автохтонных сортов, то есть сортов, выведенных и культивируемых сотни лет в конкретной местности [1]. Основным районом промышленного возделывания автохтонных крымских сортов и производства высококачественных вин является Солнечная Долина. На Ампелогографической коллекции Института «Ма-

ORIGINAL RESEARCH

Features of creating a collection of Crimean native grape varieties *in vitro*

Irina Aleksandrovna Pavlova, Ekaterina Aleksandrovna Lushchay, Anastasiya Viktorovna Petukhova, Anife Smailovna Abdurashitova
Federal State Budget Scientific Institution All-Russian National Research Institute of Viticulture and Winemaking Magarach of the RAS, 31 Kirova str., 298600 Yalta, Republic of Crimea, Russian Federation

The article presents the results of work on the creating of a collection of Crimean native varieties *in vitro*. The current state of collection requires urgent measures to maintain its viability. One of the possible ways to preserve valuable genetic material is to create vegetating collections of plants *in vitro*. The process of creating a collection of native grape varieties *in vitro* consisted of different stages: the stage of "collecting the initial material", the stage of "obtaining the primary explant", the stage of "sterilizing and introducing one- or two-eye shoot explants into the *in vitro* conditions", the stage of "induction of the shoot development", the stage of "rooting of the developed shoots", the stage of "minimal reproduction by microcutting to the volume of 10-15 plants", the stage of "plants transfer from active growth to deep dormancy for conservation". The aseptical culture of 47 Crimean native grape varieties was obtained, which is 65.3% of the total number collected in the Ampelographic Collection of the Magarach Institute. Main reasons limiting the varietal spectrum were caused by the lack of bud proliferation *in vitro* and the loss of plants at the stage of shoot induction. Thus, together with samples already preserved in the culture, the vegetating collection of Crimean native varieties consists of 50 samples.

Key words: plant; explant; shoot; 6-benzylaminopurine (BAP); α-naphthyl acetic acid (NAA); sample; regeneration; induction.

гарач» осталось 73 крымских автохтонных сорта [2]. Из-за недостаточного ухода сортовой спектр неуклонно сокращается и на сегодняшний день в коллекции произрастает 71 сорт. Одним из возможных способов сохранения ценного генетического материала является создание коллекций *in vitro* [3–5].

Сохранение материала в виде вегетирующей коллекции *in vitro* позволяет поддерживать в стерильных условиях образцы оздоровленных растений перспективных сортов и клонов. При оптимальном режиме хранения коллекция занимает небольшое пространство, обходится минимальными концентрациями минеральных веществ и нуждается в редких пересадках растительного материала [6–10]. Разработаны технологические режимы, позволяющие сохранять растения вегетирующей коллекции без дополнительных пересадок в течение одного года в двух режимах культивирования, – на свету и в темноте [11, 12]. Создание коллекции крымских автохтонных сортов винограда *in vitro* позволит сохранить ценный генетический материал, оздоровить, размножить и в дальнейшем заложить маточные насаждения. Она будет являться частью уже созданной вегетирующей коллекции растений *in vitro*, в которой есть несколько образцов данной группы сортов.

Материалы и методы. В осенне-зимний период, после первых заморозков на Ампелогографической коллекции Института

Как цитировать эту статью:

Павлова И.А., Лушчай Е.А., Петухова А.В., Абдурашитова А.С. Особенности создания коллекции крымских автохтонных сортов винограда *in vitro* // «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2020; 22(2); С. 95-99. DOI 10.35547/IM.2020.20.46.002

How to cite this article:

Pavlova I.A., Lushchay E.A., Petukhova A.V., Abdurashitova A.S. Features of creating a collection of Crimean native grape varieties *in vitro*. Magarach. Viticulture and Winemaking. 2020; 22(2); 95-99. DOI 10.35547/IM.2020.20.46.002

УДК 634.8:631.526.32/527.6:57.082.58/085.2

Поступила 20.03.20

Принята к публикации 20.05.2020

© Авторы, 2020

«Магарач» была заготовлена одревесневшая лоза 72 двух сортов по 5 черенков каждого. Для получения первичного материала одревесневшую лозу проращивали в комнатных условиях. Развившиеся побеги нарезали на 1–2-глазковые экспланты, помещали в бюксы для стерилизации. Остальные операции проводили в условиях ламинарного бокса. Стерилизацию осуществляли 96 %-ным этиловым спиртом-ректификатом – 40 с и диациодом в течение 8 мин. с последующей 3-кратной промывкой автоклавированной дистиллированной водой в течение 15 мин., согласно методике [13]. Экспланты высаживали на модифицированную среду MS (1962), содержащую 6-бензиламинопури (БАП) в концентрации 0,4–0,6 мг/л [14]. Образовавшиеся побеги для укоренения пересаживали на среду H_2 , содержащую 0,08 мг/л α -нафтилуксунной кислоты (НУК) [15]. Полученные растения размножали посредством микрочеренкования. Культивирование осуществлялось на свету при 16-часовом фотопериоде интенсивностью 1500 люкс и температуре +27 °С.

Результаты и обсуждение. В связи с жесткими условиями культивирования сортов на Ампелографической коллекции и ограниченным количеством растений, заготовка материала часто проводилась на единичных сохранившихся кустах, возможно пораженных патогенной инфекцией. По техническим причинам, не было проведено тестирование отобранного материала на наличие основных вирусных и бактериальных инфекций.

Процесс создания коллекции растений *in vitro* автохтонных сортов винограда состоял из отдельных этапов:

- этап сбора исходного материала;
- этап получения первичного экспланта;
- этап стерилизации и введения в условия *in vitro* 1–2-глазковых эксплантов побегов;
- этап индукции развития побега;
- этап укоренения развившихся побегов;
- этап минимального размножения микрочеренкованием до объема 10–15 растений;
- этап перевода растений из активного роста в режим глубокого покоя для сохранения.

На разных этапах создания коллекции были лимитирующие факторы, не позволившие ввести в культуру сразу все крымские автохтонные сорта. На этапе получения первичного материала у сортов Черный крымский и Хачадор отсутствовала регенерация почки, побеги не развились. У некоторых сортов развились слабые побеги, которые сложно было ввести в культуру (рис. 1). На этапе введение в условия *in vitro* не всегда была эффективна поверхностная стерилизация. Материал сортов Абла аганын изюм, Кокурдес черный, Мискет, Солнечная долина 58, Солнечная долина 65, Харко с третьей повторности введен в условия *in vitro*. Не удалось избавиться от поверхностной инфекции у трех сортов: Чингине кара, Солнечная долина 60, Кутлакский черный.

На этапе индукции развития побегов на эксплантах сортов Айбатлы, Аксеит кара, Джеват кара, Кокурдес белый, Тергульмек, Танагоз за несколько месяцев культивирования после нескольких пассажей на среды



Рис. 1. Развитие побега у сорта Мисгиули кара
Fig. 1. Shoot development of 'Misgiuli Kara' grape variety



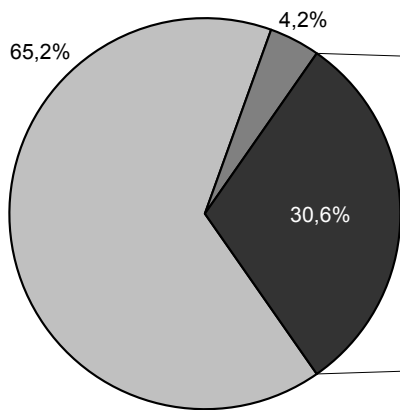
Рис. 2. Коллекция автохтонных крымских сортов *in vitro*
Fig. 2. Collection of Crimean native varieties *in vitro*

с цитокинином (БАП) почки не развились.

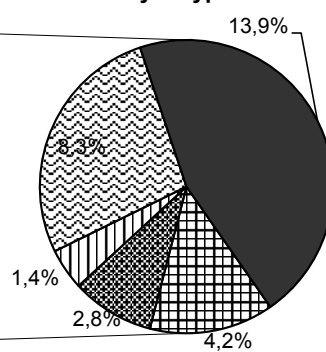
Развившиеся побеги не у всех сортов удалось укоренить. Тонкие этилированные побеги длиной 1–1,5 см останавливались в росте, после серии пассажей на идентичные среды засыхали. Не получены полноценные растения у сортов Капсельский, Кефесия, Кок пандас, Манжил ал, Морской 19, Насурла, Сале аганын кара, Солнечная долина 40, Шабаш крупногодный. Возможно для некоторых сортов решением проблемы могла быть индукция каллусогенеза с последующей регенерацией побегов.

Получена асептическая культура 47 автохтонных крымских сортов винограда, что составляет 65,3% от общего числа собранных на Ампелографической коллекции Института «Магарач» (рис.2). Основные причины, лимитирующие сортовой спектр, были вы-

Получение асептической культуры
автохтонных сортов винограда



Причины, лимитирующие
сортовой спектр асептической
культуры



- асептическая культура (2019 г.)
- асептическая культура (2016 г.)
- ▨ отсутствие пролиферации почки *in vivo*
- ▩ 100% инфицирование
- ▧ поражение латентной формой фитоплазмы «почернение древесины»
- ▦ отсутствие пролиферации почки *in vitro*
- гибель на стадии побегов

Рис. 3. Создание коллекции автохтонных сортов винограда *in vitro*
Fig. 3. Creating of the collection of native grape varieties *in vitro*

Таблица. Краткая характеристика некоторых крымских автохтонных сортов
Table. Brief characteristics of some of Crimean native varieties

| Сорт | Особенности | Использование |
|-----------------------|---|---|
| Альбурла | засухоустойчивый сорт, неприхотлив к почвам | употребление в свежем виде |
| Дардаган | хорошо переносит периодические засухи | употребление в свежем виде, сорт местного значения |
| Демир кара | засухоустойчивый | является малораспространенным; крепкие вина |
| Капитан Яни кара | хорошо переносит периодические засухи | для приготовления марочных десертных вин в смеси с сортами Эким кара, Лапа кара и Кефесия |
| Капсельский | вина хорошего качества | для приготовления столовых, десертных вин, портвейнов |
| Кирмизи Сап судакский | чувствителен к грибным болезням, хорошо переносит периодические засухи | употребление в свежем виде |
| Крона | имеет запоминающееся послевкусие | столовые и десертные вина |
| Кутлакский черный | высокоурожайный сорт | столовые и крепкие вина в смеси с другими сортами, потребление в свежем виде, может быть использован как исходный материал для селекции |
| Манжил ал | хорошо переносит периодические засухи | потребление в свежем виде |
| Мисгюли кара | слабо повреждается милдью | сорт является малораспространенным, потребление в свежем виде |
| Мурза изюм | мало поражается грибными болезнями и гроздовой листовёрткой | столовые вина в смеси с другими сортами |
| Мускат крымский | в средней степени повреждается грибными болезнями и гроздовой листовёрткой | потребление в свежем виде |
| Павло изюм | слабо повреждается милдью и гроздовой листовёрткой, засухоустойчивый | технический, столовые и крепкие вина в купаже |
| Полковник изюм | слабо повреждается грибными болезнями и гроздовой листовёрткой | сорт является малораспространенным, для приготовления ординарных столовых вин в смеси с другими сортами |
| Сале Аганын кара | слабо повреждается грибными болезнями и гроздовой листовёрткой | приготовление крепких и десертных вин высокого качества с другими сортами, сорт является малораспространенным |
| Сафта Дурмаз | в средней степени повреждается грибными болезнями и гроздовой листовёрткой | сорт является малораспространенным, приготовление столовых и крепких вин в смеси с другими сортами |
| Солдаёя | хорошая транспортабельность и лежкость при хранении в холодильных камерах | потребление в свежем виде, приготовление белых десертных вин |
| Сых Дане | относительно засухоустойчивый | технический, столовые вина в купаже, сорт местного значения |
| Халиль изюм | в сырую осень ягоды подвержены загниванию, хорошо переносит периодические засухи, невысокая транспортабельность | сорт малораспространенный, потребление в свежем виде, для приготовления ординарных вин |
| Яных якуб | засухоустойчивый | технический, столовые и крепкие вина в смеси с другими сортами, сорт местного значения |

званы отсутствием пролиферации почки *in vitro* и гибелью растений на стадии индукции побега (рис. 3).

По сортовому спектру образцы выделены в две группы: 31 сорт представлен на Ампелогографической коллекции в достаточном количестве, 19 сортов находятся в критически малом количестве (1–2 куста):

Аджем мискет, Артин зерва, Дардаган, Кирмизи сап судакский, Кокур белый полурассеченный, Морской 94, Мурза изюм, Мускат кутлакский, Павло изюм, Сафта дурмаз, Солнечная долина 16, Солнечная долина 31а, Солнечнодолинский, Сых дане, Фирский ранний, Харко, Херсонесский, Эмир Вейс, Яных якуб. А

эти сорта могут быть источниками для селекции такого ценного признака как засухоустойчивость (табл.).

Большинство образцов коллекции размножено до необходимого количества (рис. 4). Совместно с лабораторией молекулярно-генетических исследований намечено проведение тестирования материала на отсутствие основной патогенной инфекции. Процесс создания коллекции не закончен. Предстоит ввести в условия *in vitro* оставшиеся крымские автохтонные сорта, провести технологические операции по переводу коллекционного материала в режим культивирования в состоянии замедленного роста или глубокого покоя.

Выводы. Создана вегетирующая коллекция крымских автохтонных сортов винограда *in vitro*, которая составляет 50 образцов. Установлено, что основными причинами, лимитировавшими сортовой спектр на стадии получения асептической культуры, являлись: отсутствие пролиферации почки *in vitro* у ряда сортов и гибель растений на стадии индукции побега. В культуре поддерживаются сорта: Абла аганын изюм, Аджим мискет, Альбурла, Артин зерва, Асма, Биос айбатлы, Богос зерва, Дардаган, Демир кара, Канагын изюм, Капитан Яни кара, Кандаваста, Кирзим Сап судакский, Крона, Кокур белый 46-10-6, Кокур белый 40-10-3, Кокур белый рассеченный, Кокур белый полурассеченный, Кокур красный, Кокурдес черный, Кок Хабах, Кутлакский черный, Мискет, Мисгюли кара, Морской 94, Морской 75, Мурза изюм, Мускат кутлакский, Мускат крымский, Павло изюм, Полковник изюм, Сары пандас, Солнечная долина 16, Солнечная долина 65, Солнечная долина 58, Солнечная долина 71/7, Солнечнодолинский, Солнечная долина За, Сых дане, Солдайка, Софта дурмаз, Ташлы, Фирский ранний, Шабаш, Шира изюм, Халиль изюм, Харко, Херсонесский, Эмир вейс, Яных якуб.

Благодарность

Авторы выражают благодарность сотрудникам сектора ампелографии: Алле Анатольевне Полулях, Александре Маратовне Чижевой за предоставленный материал.

Источник финансирования

Работа выполняется в рамках ГЗ № 0561-2019-0001 «Изучение генетической изменчивости в биотехнологических системах создания, сохранения и размножения новых сортов винограда»

Financing source

The work was conducted under public assignment No. 0561-2019-0001 “Study of genetic variability in biotechnological systems of creation, preservation and propagation of new grape varieties”

Конфликт интересов

Не заявлен.

Conflict of interests

Not declared.

Список литературы/References

1. Трошин Л.П. Аборигенные сорта винограда России. – Краснодар: Кубан. гос. аграр. ун-т, 2007. – 256 с.
Troshin L.P. Indigenous grape varieties of Russia. Krasnodar. Kuban State Agrarian Univ. 2007. 256 p. (*in Russian*).
2. Лиховской В.В., Зармаев А.А., Полулях А.А. [и др.] Ампелография аборигенных и местных сортов вино-



Рис. 4. Растения *in vitro* сорта Сых дане
Fig. 4. Plants of ‘Sykh Dane’ variety *in vitro*

- града Крыма: монография / Под ред. Лиховского В.В. – Симферополь: ООО «Форма», 2018. – 140 с.
Likhovskoi V.V., Zarmaev A.A., Polulyakh A.A. et al. Ampelography of indigenous and local Crimean grape varieties: monograph. Ed. by Likhovskoi V.V. – Simferopol. LLC Forma. 2018. 140 p. (*in Russian*).
3. Решетников В.Н., Спиридович Е.В., Носов А.М. Биотехнология растений и перспективы ее развития // Физиология растений и генетика. – 2014. – Т. 46, № 1. – С. 3-18.
Reshetnikov V.N., Spiridovich E.V., Nosov A.M. Plant biotechnology and prospects of its development. Plant Physiology and Genetics. 2014. Vol. 46, No. 1. pp. 3-18 (*in Russian*).
 4. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. – К.: Аграрна наука, 2011. – 344 с.
Mitrofanova I.V. Somatic embryogenesis and organogenesis as the basis of biotechnology for obtaining and preserving perennial garden crops. K.: Agrarnaya nauka. 2011. 344 p. (*in Russian*).
 5. Дорошенко Н.П. Оздоровление, клональное микроразмножение и депонирование винограда в культуре *in vitro* // «Магарач». Виноградарство и виноделие. – 2015. – № 3. – С.49-51.
Doroshenko N. P. Healthy, clonal micro reproduction and deponition of grapes in culture in vitro. Magarach. Viticulture and Winemaking. 2015. No. 3. pp.49-51 (*in Russian*).
 6. Modern biotechnology of agricultural plants and biosafety: Abstracts of International Scientific Conference. Odessa, Ukraine, Sept. 7-10, 2010. Odessa, 2010. p. 86.
 7. Cruz-Cruz C.A. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity. González-Arnao M.T., Engelmann F. Resources. 2013. Vol. 2. pp. 73-95.
 8. Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 2011. Vol. 47. pp. 5-16.

9. Tehrim S., Sajid G.M. Establishment, Conservation and its Implications for Grape Germplasm Biodiversity. *Romanian Biotechnological Letters*. 2011. Vol.16. No. 6. pp. 6781-6789.
10. Клименко В.П., Павлова И.А. Перспективы использования вегетирующей коллекции винограда *in vitro* для создания базисных маточников // «Магарач». Виноградарство и виноделие. – 2017. – №3. – С.6-9.
Klimenko V.P., Pavlova I.A. The prospects of using vegetating collection of grapes *in vitro* for establishing primary nurseries. *Magarach. Viticulture and Winemaking*. 2017. No.3. pp.6-9 (*in Russian*).
11. Павлова И.А., Клименко В.П. Параметры культивирования для длительного хранения растений винограда в вегетирующей коллекции *in vitro*// «Магарач». Виноградарство и виноделие. – 2018. – №2. – С.9-11.
Pavlova I.A., Klimenko V.P. Cultivation parameters for long-term storage of vine plants in the vegetating collection *in vitro*. *Magarach. Viticulture and Winemaking*. 2018. No. 2. pp. 9-11 (*in Russian*).
12. Павлова И.А. «Вегетирующая коллекция растений винограда *in vitro*, условия хранения»// Биотехнология клеток растений *in vitro* и биотехнология: Тезисы докладов XI Международной конференции (Минск, 23-27 сентября 2018 г.). – Минск, 2018. – С. 170-171.
Pavlova I.A. A vegetating collection of grape plants *in vitro*, storage conditions. The biotechnology of cells *in vitro* and biotechnology. XI International conference (September 23-27, 2018. Minsk). Minsk, 2018. pp. 170-171 (*in Russian*).
13. Голодрига П.Я., Зленко В.А., Чекмарев Л.А., Бутенко Р.Г., Левенко Б.А., Пивень Н.М. Методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда. – Ялта: ВНИИВиПП, 1986. – 56 с.
Golodriga P. Ya., Zlenko V. A., Chekmarev L. A., Butenko R. G., Levchenko B. A., Piven N. M. Methodological recommendations on clonal micro-propagation of grapes. Yalta: VNIIViPP, 1986. 56 p. (*in Russian*).
14. Murashige T., Skoog F.A. A revised medium for rapid growth and biosays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 1962. Vol.15. pp.473-479.
15. Павлова И.А., Зленко В.А., Волынкин В.А. Применение методов биотехнологии для получения оздоровленного посадочного материала винограда// Сучасний стан та перспективи розвитку насінництва в Україні: Наукові праці Південного філіалу «Кримський Агротехнологічний університет» Національного аграрного університету. – Сімферополь, 2008. – Вип. 107. – С. 161-164.
Pavlova I. A., Zlenko V. A., Volynkin V. A. Application of biotechnology methods for obtaining healthy planting material of grapes. Current state and prospects of development of seed production in Ukraine: scientific works of the southern branch "Crimean Agrotechnological University" of the National Agrarian University. Simferopol. 2008. Issue 107. pp. 161-164 (*in Russian*).