

Соматоклональная изменчивость растений винограда, регенерировавших из колхицинированных клеток суспензионных культур

Валерий Анатольевич Зленко, канд. с.-х. наук, доцент, вед. науч. сотр. лаборатории генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда, vazlenko@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3363-8292>;

Виктор Павлович Клименко, д-р с.-х. наук, ст. науч. сотр., глав. науч. сотр., зав. лабораторией генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда, vik_klim@rambler.ru, orcid.org/0000-0002-7452-0776;

Ирина Александровна Павлова, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., вед. науч. сотр. лаборатории генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда, pavlovairina1965@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0818-8215>;

Екатерина Александровна Лушчай, мл. науч. сотр. лаборатории генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда, lea_rs@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5695-5936>;

Анастасия Викторовна Петухова, мл. науч. сотр. лаборатории генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда, slotog@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7570-7452>;

Анифе Смаиловна Абдурашитова, мл. науч. сотр. лаборатории генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда, abdurashitova97@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2419-6477>;

Владимир Владимирович Лиховской, д-р с.-х. наук, врио директора ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН», director@magarach-institut.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3879-0485>.

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

Экспланты листьев, черешков листьев и междоузлий сортов винограда Бианка, Подарок Магарача, Interlaken seedless, Рута, Сфинкс и гибридной формы E-342 были взяты из зеленых побегов, выросших на выведенной из состояния покоя вызревшей лозе, и высажены в культуру *in vitro* в жидкую среду NN с добавкой 2,4-D и BAP (по 1 мг/л). Как для получения проэмбриогенных каллусов и клеточных суспензий, так и развития из них соматических эмбриоидов и регенерации растений, в зависимости от генотипической специфичности и этапов, использовали различные базовые среды (NN, MS и PG), регуляторы роста (2,4-D, BAP, IAA, NOA и GA₃) и биологически активные вещества (FA, PVP и гумат Na). Клеточные суспензии обрабатывали раствором 0,02% колхицина, 0,02 и 1% DMSO; 0,5 и 1 мг/л BAP; 20 г/л сахарозы с добавкой или без среды NN (концентрации в общем растворе с суспензией клеток) в течение 1 и 2 сут. при +27–30 °С. Адаптированные из *in vitro* к условиям *in vivo* и выросшие в условиях открытого грунта растения-соматоклоны сортов Сфинкс, Рута и гибридной формы E-342 различаются (соматоклональная изменчивость) по приросту и вызреванию лозы в конце вегетации.

Ключевые слова: *Vitis*; *in vitro*; соматический эмбриогенез; проэмбриогенные клетки; эмбриоид; колхицин; полиплоидия; вызревшая лоза.

ORIGINAL RESEARCH

Somaclonal variation of grape plants regenerated from colchicinated cells of suspension cultures

Valeryi Anatolievich Zlenko, Viktor Pavlovich Klimenko, Irina Aleksandrovna Pavlova, Ekaterina Aleksandrovna Lushchay, Anastasiya Viktorovna Petukhova, Anife Smailovna Abdurashitova, Vladimir Vladimirovich Likhovskoi

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

Explants of leaves, petioles and internodes of grape varieties 'Bianca', 'Podarok Magarach', 'Interlaken Seedless', 'Ruta', 'Sphinx' and hybrid form E-342 were taken from green shoots grown on a ripened vine removed from dormancy and planted *in vitro*, in the liquid NN medium with 2,4-D and BAP (by 1 mg/l each) added. Various basic media (NN, MS and PG), growth regulators (2,4-D, BAP, IAA, NOA and GA₃) and biologically active substances (FA, PVP and Na humate) were used to obtain proembryogenic calli and cell suspensions and to develop somatic embryoids and plant regeneration, depending on genotypic specificity and stages. Cell suspensions were treated with a solution of 0.02% colchicine, 0.02 and 1% DMSO, 0.5 and 1 mg/l BAP, 20 g/l sucrose with or without NN medium (concentration in a total solution with cell suspension) for 1 and 2 days at + 27–30 °C. Adapted from *in vitro* to the *in vivo* conditions and grown in open ground, somaclonal plants of 'Sphinx', 'Ruta' varieties and hybrid form E-342 differ (somaclonal variation) in increment and maturation of the vine at the end of the growing season.

Key words: *Vitis*; *in vitro*; somatic embryogenesis; proembryogenic cells; embryoid; colchicine; polyploidy; ripened vine.

В настоящее время актуальным становится увеличение доз генов на уровне целых хромосом: создание дигаллоидов [1] и полигаллоидов [2, 3], обеспечивающих увеличение экспрессии генов для синтеза вторичных веществ [4–6], которые могут определять устойчивость к биотическим и абиотическим факторам внешней среды и улучшать качество продуктов. Искусственная полигаллоидизация позволяет повысить физиолого-агронические показатели у винограда [7–9] и проводить отдаленную (междоузловую) гибридализацию между видами с различным количеством хромосом [10].

Объектом полигаллоидизации с применением колхицина или оризалина были меристемные ткани почек у видов *Vitis* [9, 11, 12], что приводит к развитию миксогаллоидных растений с последующей необходимостью их расхимеривания [9], эмбриогенные каллусы [13], соматические эмбриоиды [11, 14], клетки в суспензионных культурах у *Suvarcane* [15] и у *V. vinifera* [16].

Как цитировать эту статью:

Зленко В.А., Клименко В.П., Павлова И.А., Лушчай Е.А., Петухова А.В., Абдурашитова А.С., Лиховской В.В. Соматоклональная изменчивость растений винограда, регенерировавших из колхицинированных клеток суспензионных культур // «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2020; 22(3); С. 190-195. DOI 10.35547/IM.2020.22.3.001

How to cite this article:

Zlenko V.A., Klimenko V. P., Pavlova I. A., Lushchay E. A., Petyhova A. V., Abdurashitova A. S., Likhovskoi V. V. Somaclonal variation of grape plants regenerated from colchicinated cells of suspension cultures. Magarach. Viticulture and Winemaking, 2020; 22(3):190-195. DOI 10.35547/IM.2020.22.3.001

УДК 57.085.1: 634.862: 634.8.034

Поступила 6.08.2020

Принята к публикации 1.09.2020

© Авторы, 2020

Регенерация растений из проэмбриогенных клеток каллусных и суспензионных культур приводит к широкому спектру геномной, геной и эпигенетической соматоклональной изменчивости у разных видов растений [17, 18] и у винограда [13], что является весомым фактором генетической изменчивости и отбора [19] дополнительно к искусственной полиплоидизации [15, 16].

В данной работе были поставлены задачи обработать проэмбриогенные клетки суспензионных культур шести генотипов винограда раствором колхицина, путем соматического эмбриогенеза адаптировать их из *in vitro* к условиям открытого грунта *in vivo*, в конце вегетации установить пределы соматоклональной изменчивости по генетически детерминированным признакам прироста и вызревания лозы у растений-регенерантов сортов Сфинкс, Рута и гибридной формы Е-342 с целью выделения среди них перспективных форм соматоклонов винограда.

Материалы и методы. *Растительный материал и индукция развития проэмбриогенного каллуса.* В исследованиях использовали шесть генотипов винограда: два технических сорта (Бианка и Подарок Магарача), два столовых бессемянных (Interlaken seedless и гибридная форма Е-342) и два столовых крупноягодных с развитыми семенами в ягодах (Рута и Сфинкс). Для этих генотипов ранее разработаны методики регенерации растений из клеток суспензионных культур путем соматического эмбриогенеза: для двух технических [20, 21] и четырех столовых [22].

Вызревшую лозу шести генотипов винограда заготавливали на ампелографической коллекции и селекционном участке «ВНИИВиВ Магарач» РАН и проращивали в сосудах с водой для развития на них зеленых побегов. Зеленые листья, черешки листьев и междоузлия дезинфицировали в течение 10–15 секунд в 96%-ном этиловом спирте и 10 мин. в растворе диоксида (1,86 мМ $C_{21}H_{38}ClN \cdot H_2O$; 1,25 мМ C_2H_5HgCl) в воде. Затем их промывали в дистиллированной стерильной H_2O несколько раз в течение 20–30 мин., нарезали на экспланты, удаляя поврежденные при дезинфекции части. Экспланты высаживали в жидкую среду NN [23] с добавкой как 1 мг/л ВАР (6-бензиламинопури́н) (для сортов Interlaken seedless, Рута и Сфинкс), так и 2,4-D (2,4-дихлорфеноксисукусная кислота) и ВАР по 1 мг/л (для сортов Бианка, Подарок Магарача и гибридной формы Е-342; табл. 1; этап введения эксплантов в культуру *in vitro*).

После двух месяцев культивирования экспланты с начавшим образовываться каллусом (среда NN с 1 мг/л 2,4-D и 1 мг/л ВАР) или с меристематическими бугорками (среда NN и 1 мг/л ВАР) субкультивировали на твердую или жидкую среду NN с добавками 2,4-D (1 и 2 мг/л), ВАР (1 и 2 мг/л), TDZ (тидиазурон; 0,5 и 1 мг/л), NOA (β-нафтилоксисукусная кислота; 1 мг/л), FA (D,L-фенилаланин; 5 мг/л) и PVP (поливинилпирролидон м.в. 40000; 5 г/л) в зависимости от генотипа (табл. 1).

Суспензия проэмбриогенных клеток. Образовавшиеся в жидких или на твердых средах каллусы отделяли пинцетом от эксплантов, экспланты удаляли, а каллус-

ные ткани размельчали в жидкой среде для проэмбриогенных суспензий. Для разных генотипов использовали различные концентрации 2,4-D (1 и 2 мг/л) и ВАР (0,2 и 1 мг/л), добавки FA (5 мг/л) и PVP (5 г/л). Проэмбриогенный каллус гибридной формы Е-342, образовавшийся на твердой модифицированной среде NN, отделяли от эксплантов и сразу переносили в жидкую среду для обработки колхицином, измельчая агрегаты каллуса пинцетом в этой среде.

Обработка колхицином проэмбриогенных клеток. После двух месяцев культивирования клеточные суспензии отстаивали, сливали жидкую среду и к оставшемуся осадку клеток с жидкой средой добавляли такой же объем в два раза более концентрированного раствора колхицина. В табл. 1 указаны концентрации веществ и колхицина в общем объеме суспензии с клетками и добавленным раствором колхицина. Растворы колхицина и DMSO (диметилсульфокси́д) дезинфицировали путем фильтрования через мелкопористый фильтр. Для улучшения делений в суспензии клеток с колхицином (0,02% в общем объеме) и DMSO (0,02%; 1%), были добавлены ВАР (0,5; 1 мг/л), сахароза (20 г/л) или жидкая среда NN. Суспензии клеток с добавленным раствором колхицина выдерживали при температуре +27–30 °С 1 или 2 сут. Суспензии клеток с раствором колхицина отстаивали, сливали раствор, к осадку клеток добавляли стерильную H_2O , снова отстаивали и сливали H_2O для отмывки клеток от колхицина. К осадку клеток добавляли различные варианты жидких сред для развития из них глобулярных эмбриоидов (табл. 1).

Развитие соматических эмбриоидов из колхичинированных клеток суспензионных культур и регенерация из них растений соматоклонов. Для развития глобулярных и сердцевидных эмбриоидов использовали основы сред NN и PG (*plant growth*) [24] с добавками ВАР, TDZ, FA и PVP в зависимости от генотипа (табл. 1).

У генотипов Interlaken seedless и гибридной формы Е-342 на этом этапе также образовывались и торпедовидные эмбриоиды. Для массового превращения сердцевидных эмбриоидов в торпедовидные суспензии со смесью глобулярных и сердцевидных эмбриоидов субкультивировали в жидкую среду PG с добавкой 0,1 мг/л IAA (β-индолилуксусная кислота), 30 мг/л гумата Na и 5 мг/л FA, культивировали 2-3 месяца.

Суспензии со ≈100-1000 торпедовидными эмбриоидами размером 1–3 мм (обычно в суспензиях находились также глобулярные 0,1–0,4 мм и сердцевидные 0,5–0,9 мм эмбриоиды) в 20 мл жидкой среды инокулировали в жидкую среду PG с добавкой ВАР и GA_3 (гибберелловая кислота, по 0,2 мг/л), и культивировали 2–3 месяца до превращения торпедовидных эмбриоидов в проростки размером 5–10 мм с зелеными гипокотильями и семядолями. Затем их брали пинцетом в жидкой среде и высаживали на твердую среду MS [25] с 0,5 мг/л ВАР, на которой у проростков развивались побеги (табл. 1).

*Адаптация растений-соматоклонов из *in vitro* к условиям *in vivo* и их выращивание в условиях открытого грунта.* Развившиеся из проростков побеги нарезали на экспланты с 2-мя листьями (нижний лист удаляли),

Таблица 1. Схема введения в культуру *in vitro* эксплантов 6-ти генотипов винограда, обработки 0,02% раствором колхицина клеток в суспензиях, развития из них соматических эмбриоидов и регенерации растений-соматклонов**Table 1.** Scheme for introducing to *in vitro* culture the explants of 6 grape genotypes, treatment with 0.02% colchicine solution of cells in suspensions, development of somatic embryoids from them and regeneration of somaclone plants

Генотип, экспланты: листья (л.), черешки листьев (ч. л.), междоузлия (м. у.); среда для введения в культуру <i>in vitro</i>	Состав жидких (ж.) и твердых (тв.) питательных сред с добавкой веществ (мг/л) для индукции соматического эмбриогенеза				№ растений-регенерантов в культуре <i>in vitro</i> (соматклонов)
	→ Развитие проэмбриогенного каллуса →	→ Суспензии проэмбриогенных клеток →	→ Обработка клеток в суспензиях 0,02% колхицином и другими веществами →	→ Развитие глобулярных и сердцевидных эмбриоидов →*	
Бианка, ч. л.; NN (ж); 2,4-D – 1 мг/л; ВАР – 1 мг/л.	NN (тв); 2,4-D – 1; ВАР – 1; TDZ – 1.	NN(ж); 2,4-D – 1; ВАР – 1.	0,02 % DMSO, NN (ж); ВАР – 1; 2сут. +27-30 °С.	PG (ж); ВАР – 0,5; FA – 5; PVP – 5 г/л.	№ 38, 39, 40, 41, 42
Подарок Магарача, л.; NN (ж); 2,4-D – 1 мг/л; ВАР – 1 мг/л.	NN(ж); 2,4-D – 1; ВАР – 1.	NN (ж), сахара 60г/л; 2,4-D – 2; ВАР – 0,2; FA – 5; PVP – 5 г/л.	1 % DMSO; ВАР – 0,5; сахара 20 г/л; 1 сут. +27-30 °С.	NN (ж), без витаминов; ВАР – 0,5; TDZ – 0,5.	№ 47
Interlaken seedless, л.; NN (ж); ВАР – 1мг/л.	NN(ж); 2,4-D – 1; ВАР – 1.	NN (ж); 2,4-D – 1; ВАР – 0,2.	1% DMSO; ВАР – 0,5; сахара -20 г/л; 1 сут. + 27-30 °С.	NN (ж), без витаминов; TDZ – 0,5.	№ 44, 45
Рута, л., ч. л., м. у.; NN (ж); ВАР – 1 мг/л.	NN(ж); 2,4-D – 1; ВАР – 1.	NN (ж), сахара 60 г/л; 2,4-D – 2; ВАР – 0,2; FA – 5; PVP – 5 г/л.	1 % DMSO; ВАР – 0,5; сахара -20 г/л; 2 сут. +27-30 °С	NN (ж), без витаминов; ВАР – 0,5.	№ 48, 49, 50, 51, 52, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 80, 81, 82, 83, 85, 96
Сфинкс, л., ч. л., м. у.; NN (ж); ВАР – 1 мг/л.	NN(ж); 2,4-D – 1; ВАР – 1.	NN (ж), сахара 60 г/л; 2,4-D – 2; ВАР – 0,2; FA – 5; PVP – 5 г/л.	1 % DMSO; ВАР – 0,5; сахара -20 г/л; 1 сут. +27-30 °С.	NN (ж), без витаминов; ВАР – 0,5; TDZ – 0,5.	№ 87, 88, 89, 90
Гибридная форма Е-342, л., ч. л., м. у.; NN (ж); 2,4-D – 1 мг/л; ВАР – 1 мг/л.	NN (тв), без витаминов; 2,4-D – 2; ВАР – 2; TDZ – 0,5.	→	0,02% DMSO; NN (ж); ВАР – 0,5; 1 сут. +15-17 °С; 2 сут. +27-30 °С.	PG (ж); ВАР – 0,5; FA – 5.	№ 30, 31, 32, 76, 91
	NN (тв.); 2,4-D – 1; ВАР – 1; NOA – 1; FA – 5; PVP – 5 г/л.	→	Раствор и экспозиция те же.	PG (ж); ВАР – 0,2.	№ 93, 94, 95, 97

* - В дальнейшем проводили последовательные субкультивирования: развитие торпедовидных эмбриоидов (PG ж., 0,1 мг/л IAA, 30 мг/л гумата Na и 5мг/л FA) → проростков (PG ж., ВАР и GA3 по 0,2 мг/л) → побегов у проростков (MS тв., 0,5 мг/л ВАР)

оставляя две почки на остатке побега на проростке и этот проросток с остатком побега и нарезанные на нем 2-глазковые экспланты высаживали на твердую среду PG с добавкой 30 мг/л гумата Na и 0,1 мг/л IAA для их укоренения и развития растений в культуре *in vitro*.

Перед пересадкой растений в условия открытого грунта проводили их преадаптацию в культуре *in vitro*. После одного месяца культивирования на твердой среде PG с добавкой 30 мг/л гумата Na на культуральных сосудах заменяли в ламинарном боксе крышки из фольги на стерильную целлофановую пленку, которая пропускает пары H₂O, CO₂ и O₂, а также ультрафиолетовое излучение и выдерживали в течение 2-х недель в тени [20, 26]. Затем растения пересаживали из *in vitro* в условия *in vivo*, в субстрат. На первом этапе их накрывали сверху полиэтиленовой пленкой на высоте

40–50 см и создавали частичное притенение от прямых солнечных лучей [26].

В конце вегетации измеряли общий прирост и характеристики вызревания лозы у соматклонов для установления степени изменчивости в сумме как соматклональной так и полиплоидизации под воздействием колхицинирования клеток суспензионных культур, из которых развились соматические эмбриоиды и регенерировали растения (отдельная клетка в суспензии + колхицин → соматический эмбриогенез → проросток → побег у проростка → растение-соматклон).

Статистическая обработка результатов. Проэмбриогенные культуры каллуса, суспензий клеток, соматических эмбриоидов и проростков для каждого из 6-ти генотипов и каждого варианта среды были представлены в 3-х повторностях (табл.1), а растения-

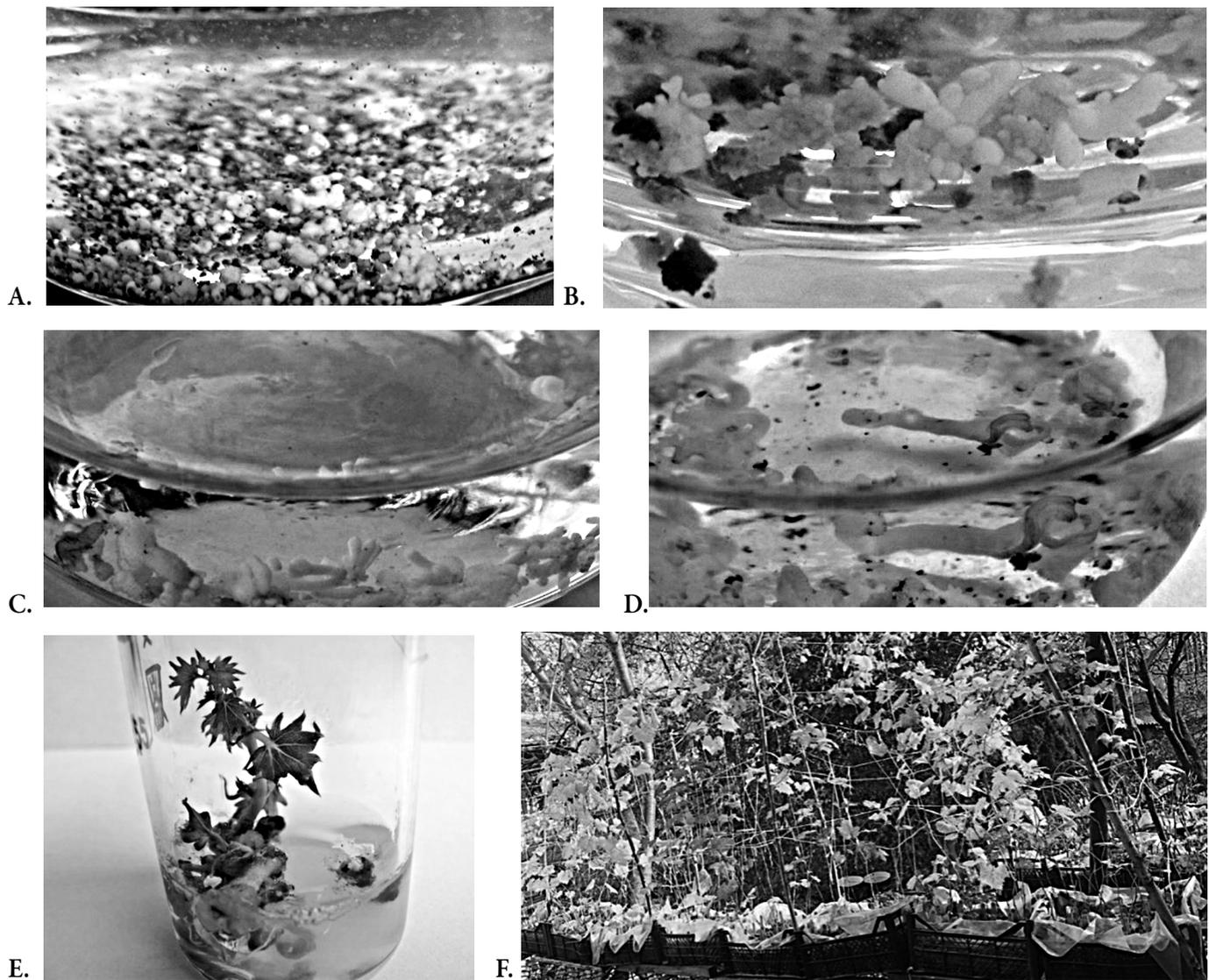


Рис. Регенерация растений-соматклонов различных генотипов винограда из колхицинированных клеток суспензионных культур: А- Глобулярные эмбриониды гибридной формы E-342; В- Глобулярные и сердцевидные эмбриониды сорта Подарок Магарача; С- Торпедовидные эмбриониды сорта Подарок Магарача; D- Проросток с зеленым гипокотилем и семядолями сорта Подарок Магарача; E- Развитие побега из проростка сорта Рута; F- Выращивание в ящиках с субстратом адаптированных из *in vitro* к условиям *in vivo* соматклонов 6-ти генотипов винограда сортов Бианка, Подарок Магарача, Interlaken seedless, Сфинкс, Рута и гибридной формы E-342

Fig. Regeneration of somaclone plants of various grape genotypes from colchicinated cells of suspension cultures: A- Globular embryos of the hybrid form E-342; B - Globular and heart-shaped embryos of 'Podarok Magaracha' variety; C- Torpedo-shaped embryos of the variety 'Podarok Magaracha'; D- Germinant with green hypocotyl and cotyledons of the variety 'Podarok Magaracha'; E- Development of shoot from the germinant of the variety 'Ruta'; F- Growing of somaclones of 6 grape genotypes of 'Bianca', 'Podarok Magaracha', 'Interlaken Seedless', 'Sphinx', 'Ruta' grape varieties and hybrid form E-342 in containers with substrate and adapted from *in vitro* to *in vivo* conditions.

соматклоны – в 4-11-ти повторностях (табл. 2). Доверительные границы средних величин показателей вызревания лозы (общий прирост лозы, длина вызревшей лозы, % вызревания лозы, диаметр и средняя длина междоузлий вызревшей лозы) у соматклонов рассчитаны с $P=0,05$ (табл.2).

Результаты и обсуждение. Для исследуемых 6-ти генотипов винограда применяли заранее разработанные методики регенерации растений из клеток суспензионных культур путем соматического эмбриогенеза [20–22]. Обработка в течение суток агрегатов клеток ($< 850 \mu\text{m}$) в суспензионной культуре сорта Мencia раствором 0,02% колхицина и 1% DMSO в H_2O привела к развитию 25% тетраплоидных проростков [16]. Мы также использовали для колхицинирования клеток суспензионных культур концен-

трации 0,02% колхицина и 1% DMSO в общем объеме суспензии. Для увеличения жизнеспособности и стимулирования деления клеток мы применяли варианты растворов с 0,02% колхицином, но с низкой концентрацией DMSO (0,02%), а также с дополнительными добавками ВАР (0,5 и 1 мг/л), сахарозы (20 г/л), среды NN (концентрации в общем объеме суспензии с добавленным раствором). В табл. 1 приводятся концентрации растворов колхицина, время обработки и субкультивирования суспензий на вариантах сред для развития глобулярных (рис., А), сердцевидных (рис., В), торпедовидных (рис., С) эмбрионидов, проростков (рис., D) и побегов у них (рис., E) у генотипов винограда, которые привели к развитию жизнеспособных растений-соматклонов после их размножения в культуре *in vitro* (табл. 1).

Таблица 2. Различия по приросту и вызреванию лозы в конце вегетации адаптированных в 2019 году из культуры *in vitro* к условиям *in vivo* соматклонов различных сортов винограда, регенерировавших путем соматического эмбриогенеза из колхицинированных клеток суспензионных культур

Table 2. Differences in growth and ripening of the vine at the end of the growing season, of different grape varieties somaclones regenerated by somatic embryogenesis from colchicinated cells of suspension cultures and adapted in 2019 from the culture *in vitro* to *in vivo* conditions

Название сорта	№ соматклона	Выживание соматклонов к концу вегетации, %	Длина лозы, см		Вызревание лозы, %	Диаметр вызревшей лозы, мм	Средняя длина междоузлий вызревшей лозы, см
			Вызревшая	Общая			
Бианка	40	100	42,3±4,7	67,3±6,6	62,7±1,9	3,3±0,3	3,4±0,05
Interlaken seedless	45	62	93,0±8,7	138,5±17,4	68,3±3,5	4,3±0,2	5,5±0,3
Подарок Магарача	47	58	50,3±5,1	64,8±7,8	78,5±2,7	3,0±0,2	3,4±0,2
Сфинкс	87*	40	95,5±10,4	118,0±14,5	81,5±3,2	3,7±0,3	4,3±0,3
Сфинкс	89*	47	55,7±3,6	72,5±4,4	77,0±1,7	3,7±0,3	3,2±0,2
Е-342	76	38	62,2±6,1	96,2±4,4	64,0±3,5	3,0±0,2	4,0±0,1
Е-342	91	53	74,6±4,6	98,8±8,5	76,6±3,5	3,5±0,2	3,9±0,1
Е-342	94	42	106,0±15,5	140,2±14,7	74,8±4,7	4,4±0,2	4,5±0,3
Е-342	95	69	96,0±5,7	121,7±6,9	78,7±1,3	4,3±0,3	4,6±0,3
Е-342	97	69	71,0±2,3	92,7±3,2	76,7±3,4	4,2±0,3	3,9±0,1
Рута	48	100	17,0±2	43,0±7	40,0±2	3,0±0,2	2,4±0,3
Рута	49*	64	65,0±4,8	123,3±1,3	52,7±3,3	3,4±0,2	4,0±0,3
Рута	61	75	45,0±7,6	66,3±11,9	68,3±1,3	3,1±0,2	3±0,4
Рута	63	75	5,6±0,9	24,0±5,8	25,0±2,3	2,0±0,1	1,8±0,3
Рута	67*	71	79,6±7,7	137,8±8,2	58,4±6,0	4,2±0,3	3,9±0,2
Рута	72*	55	17,7±3,7	71,8±16,6	25,3±0,8	3,8±0,3	2,1±0,3
Рута	82	57	14,3±2,3	27,0±4,6	53,0±1,5	2,3±0,3	2,8±0,2
Рута	96	100	10,0±0,9	16,5±0,3	60,3±4,6	2,0±0,1	1,4±0,1

*- Предварительно установлено, что эти соматклоны являются полиплоидами. Анализ других соматклонов не проводился.

Адаптированные из *in vitro* к условиям *in vivo* соматклоны 6-ти генотипов винограда культивировали в субстрате в открытом грунте (рис., F). Были установлены достоверные отличия между соматклонами по приросту и вызреванию лозы как межсортные (соматклоны 6-ти сортов), так и внутрисортные между соматклонами каждого из сортов Сфинкс, Рута, и гибридной формы Е-342 (табл. 2).

Полиплоидные соматклоны сорта Сфинкс №87 и №89 достоверно различались по длине лозы: общей (118,0±14,5 см и 72,5±4,4 см) и вызревшей (95,5±10,4 см и 55,7±3,6 см) и средней длине междоузлий вызревшей лозы (4,3±0,3 см и 3,2±0,2 см).

Соматклоны гибридной формы Е-342 различались по общей и вызревшей длине лозы: сильнорослые №94, №95 и среднерослые №91, №97, слаборослый №76. Соматклоны сорта Рута можно разделить на 3 группы: с высокими, средними и низкими показателями общего прироста и вызревания лозы. Высокие показатели по общему приросту, длине вызревшей лозы и длине междоузлий вызревшей лозы были у полиплоидных соматклонов сорта Рута № 67 и № 49. Наилучшее вызревание лозы отмечено у соматклонов № 61 (68,3±1,3%, но средний ее прирост), № 96 (60,3±4,6%, но очень слабый ее прирост) и № 67 (58,4±6,0%, самый высокий ее прирост). Полиплоидный соматклон № 49 с высоким приростом лозы характеризовался средним ее вызреванием (52,7±3,3%). Среди всех соматклонов сорта Рута выделялся полиплоидный соматклон № 72 с

очень плохим вызреванием лозы (25,3±0,8%), небольшой длиной междоузлий (2,1±0,3 см), средним общим ее приростом (71,8±16,6 см), но большой толщиной вызревшей лозы (3,8±0,3 мм). Соматклоны № 82 и № 96 с небольшой длиной (14,3±2,3 и 10,0±0,9 см) и толщиной (2,3±0,3 и 2,0 ±0,1 мм) вызревшей лозы являются неперспективными для дальнейшего культивирования и изучения в условиях открытого грунта (табл. 2).

Выводы. Данные исследования показали, что растения-соматклоны, регенерировавшие из колхицинированных клеток суспензионных культур путем соматического эмбриогенеза, различаются широким спектром соматклональной изменчивости по генетически определяемым признакам прироста (длина и толщина) и вызревания (%) лозы. Планируется дальнейшее изучение их агробиологических признаков количества и качества урожая в полевых условиях.

Источники финансирования

Исследования выполнены согласно государственному заданию № 0561-2019-0001.

Financing source

The research was conducted under public assignment No. 0561-2019-0001.

Конфликт интересов

Не заявлен.

Conflict of interests

Not declared.

Список литературы/ References

1. Sakhanokho H.F., Rowena K.R.Y., Islam-Faridi K.N. Induced

- polyploidy in diploid ornamental ginger (*Hedychium muluense* R. M. Smith) using colchicine and oryzalin. *Hortscience*. 2009. Vol. 44(7). DOI:1809-1814. DOI:10.21273/hortsci.44.7.1809.
2. Sattler M.C., Carvalho C. R., Clarindo W. R. The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*. 2016. Vol. 243, No. 2. 281 p. DOI:10.1007/s00425-015-2450-x.
 3. Darren H. Touchell, Irene E. Palmer, Thomas G. Ranney. In vitro Ploidy Manipulation for Crop Improvement. *Frontiers in Plant Science*. 2020. DOI:10.3389/fpls.2020.00722.
 4. Long Y., Qiao F., Jiang X., Cong H., Sun M., Xu Z. Screening and analysis on the differentially expression genes between diploid and autotetraploid watermelon by using of digital gene expression profile. *Revista brasileira de biologia*. 2019. DOI:10.1590/1519-6984.174475.
 5. Iannicelli J., Guariniello J., Tossi V.E., Regalado J.J., Di Ciaccio L., Van Baren C.M., Pitta Álvarez S.I., Escandón A.S. The “polyploid effect” in the breeding of aromatic and medicinal species. *Elsevier BV in Scientia Horticulturae*. 2020. Vol. 260. DOI:10.1016/j.scienta.2019.108854.
 6. Julião S.A., Ribeiro C.V., Lopes J.M.L., Matos E. M., Reis A.C. et al. Induction of Synthetic Polyploids and Assessment of Genomic Stability in *Lippia alba*. *Frontiers in Plant Science*. 2020. DOI:10.3389/fpls.2020.00292.
 7. Топалэ Ш.Г. Полиплоидия у винограда. Систематика, карология, цитогенетика. – Кишинев: Штиинца, 1983. 215 с. Topale Sh.G. Polyploidy in grapes. Systematics, karyology, cytogenetics. Chisinau: Shtiintsa, 1983. 215 p. (*in Russian*).
 8. Киреева Л.К. Новые методы в селекции винограда. – Ялта, 1991. 133 с. Kireeva L.K. New methods in the selection of grapes. Yalta. 1991. 133 p. (*in Russian*).
 9. Notsuka K., Tsuru T., Shiraiishi M. Induced polyploid grapes via in vitro chromosome doubling. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 2000. DOI:10.2503/jjshs.69.543.
 10. Xie X., Cecilia B., Agüero, Wang Y., Andrew Walker M. In vitro induction of tetraploids in *Vitis × Muscadinia* hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2015. Vol. 122, No. 3. 675 p. DOI:10.1007/s11240-015-0801-8.
 11. Sinski I., Bosco D., Pierozzi N.I., Garcia Maia J.D., Ritschel P.S., Quecini V. Improving in vitro induction of autopolyploidy in grapevine seedless cultivars. *Euphytica*. 2014. Vol. 196, No. 2. 299 p. DOI:10.1007/s10681-013-1034-8.
 12. Зленко В.А., Лиховской В.В., Волинкин В.А., Васылык И.А., Долгов С.В. Оптимизация методологии получения полиплоидных растений из почек винограда в культуре тканей in vitro // Магарач. Виноградарство и виноделие. 2017. – №1. – С. 3-5. Zlenko V.A., Likhovskoi V.V., Volynkin V.A., Vasylyk I.A., Dolgov S.V. Methodology optimization for obtaining polyploid grape plants from buds in tissue culture in vitro. *Magarach. Viticulture and Winemaking*. 2017. No 1. pp. 3-5 (*in Russian*).
 13. Kuksova V.B., Piven N.M., Gleba Y.Yu. Somaclonal variation and in vitro induced mutagenesis in grapevine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2004. Vol. 49. pp. 17-27. DOI:10.1023/A:1005830305206.
 14. Yang X.M., Cao Z.Y., An L.Z. et al. In vitro tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Euphytica*. 2006. Vol. 152. pp. 217-224. DOI:10.1007/s10681-006-9203-7.
 15. Don J. Heinz, Grace W. P. Mee. Colchicine-induced polyploids from cell suspension cultures of sugarcane. *Crop Science*. 1970. Vol. 10. pp. 696-699. DOI:10.2135/cropsci1970.0011183X001000060030x.
 16. Acanda Y., Martinez O., Ganzalez M.U., Prado M.J., Rey M. Highly efficient in vitro tetraploid plant production via colchicine treatment using embryogenic suspension cultures in grapevine (*Vitis vinifera* cv. Mencia). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2015. No. 123. pp. 547-555. DOI:10.1007/s11240-015-0259-3.
 17. Henke R.R. Selection of biochemical mutants in plant cell cultures: some considerations. *Environmental and Experimental Botany*. 1981. Vol. 21. pp. 347-357. DOI:10.1016/0098-8472(81)90044-7.
 18. Milton J. Constantin. Chromosome instability in cell and tissue cultures and regenerated plants. *Environmental and Experimental Botany*. 1981. Vol. 21. pp. 359-368. DOI: 10.1016/0098-8472(81)90045-9.
 19. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция / АН УССР. Отделение клеточной биологии и генетической инженерии Ин-та ботаники им. Н. Г. Холодного. – Киев: – Наук. думка, 1990. – 280 с. – ISBN 5-12-001807-6. УДК 575.1+575.2+576.5. Sidorov V.A. Plant biotechnology. Cell selection. Academy of Sciences of the USSR. Department of Cell Biology and Genetic Engineering, Institute of Botany named after N. G. Kholodny. Kiev: Naukova Dumka. 1990. 280 p. (*in Russian*).
 20. Зленко В.А., Трошин Л.П., Левенко Б.А. Методические указания по регенерации растений винограда в жидкой среде. – М.: ВАСХНИЛ, 1990. – 40 с. Zlenko V.A., Troshin L.P., Levenko B.A. Guidelines on the regeneration of grape plants in a liquid medium. М.: VASKHNIL. 1990. 40 p. (*in Russian*).
 21. Зленко В.А. Трошин Л.П. Соматический эмбриогенез в суспензионной культуре винограда in vitro // Цитология и генетика. 1993. Т. 27. №3. С. 53-63. Zlenko V.A., Troshin L.P. Somatic embryogenesis in vitro grape suspension culture. *Cytology and Genetics*. 1993. Vol. 27. No. 3. pp. 53-63 (*in Russian*).
 22. Зленко В.А., Лиховской В.В., Волинкин В.А., Хватков П.А., Васылык И.А., Долгов С.В. Индукция соматического эмбриогенеза в культуре in vitro винограда (*Vitis vinifera* L.) отечественной и зарубежной селекции // «Биотехнология». – 2017. – Т. 33. – №5. – С. 35-44. DOI:10.215119/0234-2758-2017-33-5-35-44. Zlenko V.A., Likhovskoi V.V., Volynkin V.A., Khvatkov P.A., Vasylyk I.A., Dolgov S.V. Induction of somatic embryogenesis in the in vitro culture of grapes (*Vitis vinifera* L.) of domestic and foreign selection. *Biotechnology*. 2017. Vol. 33. No. 5. pp. 35-44 (*in Russian*).
 23. Nitsch J.P. & Nitsch C. Haploid plants from pollen grains. *Science*. 1969. No. 163(3862). pp. 85-87. DOI: 10.1126/science.163.3862.85.
 24. Zlenko V.A., Troshin L.P., Kotikov I.V. An optimized medium for clonal micropropagation of grapevine. *Vitis*. 1995. Vol. 34. No. 2. pp. 125-126. DOI: 10.5073/vitis.1995.34.125-126.
 25. Murashige T., Skoog F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15(3). pp. 473-497. DOI:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
 26. 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: ВНИИВиВ «Магарач». – 1986. – 56 с. Golodriga P.Ya., Zlenko V.A., Chekmarev L.A., Butenko R.G., Levenko B.A., Piven N.M. Guidelines for clonal micropropagation of grapes. Yalta: VNIIViV Magarach. 1986. 56 p. (*in Russian*).