

Генетические ресурсы винограда института «Магарач». Проблемы и перспективы сохранения

А.А. Подулях, В.А. Волынкин, В.В. Лиховской

Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» Российской академии наук, Ялта, Республика Крым, Россия

Проблема сбора, сохранения и стабильного использования генетических ресурсов винограда важна для современной науки, успешного развития промышленного виноградарства, современных людей и будущих поколений. Генетические ресурсы винограда института «Магарач» сосредоточены в ампелографической коллекции, одной из старейших и крупнейших мировых коллекций винограда, которая содержит 4120 образцов, в том числе 763 образца специальной селекционной коллекции и 3357 образцов базовой коллекции винограда. Ботаническое разнообразие базовой коллекции представлено тремя видами рода *Ampelopsis* Michaux, двумя видами рода *Parthenocissus* Planch., 22 видами рода *Vitis* Linn., 612 сортами межвидового происхождения, 2162 сортами *Vitis vinifera sativa* D.C. и т.д. Специфика сохранения полевой коллекции винограда – культуры, которая размножается вегетативно, зависит от следующих обстоятельств: привитой культуры, многолетнего характера насаждений, генетического разнообразия образцов, которые обладают различной устойчивостью к биотическим и абиотическим факторам среды, и условий возделывания. Для успешной закладки и сохранения коллекции в будущем, необходимо привлечение принципиально новой технологии возделывания коллекции и применение методик выращивания оздоровленного посадочного материала. Кроме традиционного способа сохранения генетических ресурсов винограда в полевой коллекции, разработан метод хранения коллекционного генофонда винограда *in vitro* в условиях минимального роста. В институте «Магарач» в культуре *in vitro* сформирована вегетирующая коллекция 40 сортов, гибридов и клонов винограда. Эффективным путем решения проблемы сохранения генофонда мог бы служить метод криоконсервации, который является основным способом сохранения генетического материала некоторых плодовых и ягодных культур. Однако в настоящее время метод криоконсервации виноградной лозы, учитывая трудности преодоления криоповреждений биологического материала винограда в условиях сверхнизких температур, остается наиболее сложным, и риск потери коллекции довольно высокий. На сегодняшний день основной метод сохранения генетических ресурсов винограда – это полевая коллекция. Формирование коллекций винограда в культуре *in vitro* рассматривается как дополнение к основному методу. В дальнейшем остается целесообразным развитие методов хранения растительного материала винограда в условия сверхнизких температур – как технологии будущего.

Ключевые слова: генетические ресурсы винограда; ампелографическая коллекция; коллекция винограда *in vitro*; криосохранение винограда.

Problems and prospects of grapevine genetic resources preservation at “Magarach” Institute

A.A. Polulyakh, V.A. Volynkin, V.V. Likhovskoi

All-Russian National Research Institute of Viticulture and Wine-making “Magarach” RAS, Yalta, Republic of the Crimea, Russia

Collection, preservation and effective use of grapevine genetic resources is vital for the development of ampelography as a subdiscipline of botany, for the successful development of industrial viticulture for contemporaries and future generations. The grapevine genetic resources of the Institute “Magarach” constitute one of the world’s oldest and richest ampelographic collections containing 4120 samples, of which 763 make a special selected collection and 3357 are in the base collection. The botanical diversity of the base collection is represented by three species of the genus *Ampelopsis* Michaux, two species of the genus *Parthenocissus* Planch., 22 species of the genus *Vitis* Linn., 612 varieties of interspecific origin, 2162 varieties of *Vitis vinifera sativa* D.C. and others. The specificity of preserving the field collection of grapevines – a culture that reproduces vegetatively – depends on the following factors: graft culture, perennial nature of the plants, genetic diversity of samples, which vary as to their resistance to biotic and abiotic environmental factors, and cultivation conditions. The successful establishment and conservation of future collections require fundamentally new cultivation techniques and application of cultivation methods involving revitalized grape planting stock. To supplement the traditional method of grapevine genetic resources conservation in the field collection, we have developed a method of preserving the gene pool collection *in vitro* under the minimal growth conditions. At the institute “Magarach” we have formed a vegetative collection of 40 grapevine varieties, hybrids and clones *in vitro*, and this work is under way. An effective way to solve the problem of gene pool preservation is cryopreservation, which is the main way of preserving genetic material of some crops. At present, the method of cryopreservation of the vine, considering the difficulties of overcoming the cryogenic damages of the biological material of grapes at ultra-low temperatures, remains the most difficult and chances of losing the collection are quite high. Thus, at present field collection is the main method of grape genetic resources conservation. Formation of *in vitro* grapevine collections method is considered a subsidiary one. In

the future, it is expedient to develop methods for storing the plant material of grapes at ultra-low temperatures as a future technology.

Key words: grapevine genetic resources; ampelographic collection; *in vitro* grapevine collection; cryopreservation of grapes.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Полулях А.А., Волюнкин В.А., Лиховской В.В. Генетические ресурсы винограда института «Магарач». Проблемы и перспективы сохранения. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):608-616. DOI 10.18699/VJ17.276

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Polulyakh A.A., Volynkin V.A., Likhovskoi V.V. Problems and prospects of grapevine genetic resources preservation at "Magarach" Institute. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):608-616. DOI 10.18699/VJ17.276 (in Russian)

Мобилизация и сохранение генетических ресурсов растений для их дальнейшего использования имеют большое значение как для народного хозяйства нашей страны, так и для всего человечества (FAO, 2017). Генетические ресурсы культурных растений с ценными хозяйственными признаками, используемых для производства продуктов питания и создания сырья для промышленности, обеспечивают стабильное развитие и функционирование экологически безопасной сельскохозяйственной отрасли народного хозяйства в условиях постоянных изменений природно-климатических условий и социальных обстоятельств. Рост населения и экономическое развитие стран вносят весомые изменения в условия жизни всех организмов и экологических систем нашей планеты. Внедрение новых интенсивных технологий возделывания культур с использованием интродуцентов, реконструкция старых насаждений, уменьшение количества сортов в промышленных насаждениях (внедрение монокультур), исчезновение во многих местах диких родичей культурных растений под влиянием антропогенных факторов – все это приводит к реальной угрозе потери значительного числа растительного разнообразия (Рябчун, Богуславский, 2002; FAO, 2017).

Мобилизация сортовых ресурсов винограда в ампелографической коллекции, как показано учеными многих стран (Eiras-Dias, 2008; Lacombe, 2008; Maghradze et al., 2015a), играет важную роль в сохранении и использовании генофонда винограда. Это объясняется тем, что существует реальная угроза потери значительного числа сортов в связи с исчезновением во многих регионах мира дикорастущего винограда, уменьшением количества сортов в промышленных насаждениях, реконструкцией старых насаждений и т. д. Большинство аборигенных и малораспространенных сортов винограда в настоящее время сохранилось только благодаря коллекциям (Dettweiler, 1990; Волюнкин, Полулях, 2004). Известно, что местный сортимент винограда формировался в течение длительного времени в определенных условиях конкретного региона и имеет ряд ценных признаков (Volynkin et al., 2012). Древние, так называемые местные сорта и формы, созданные «народной селекцией», характеризуются высокой приспособленностью к условиям возделывания, стойкостью или толерантностью к болезням и вредителям, несут разнообразные и непревзойденные показатели качества продукции. Это свойственно и для сортов винограда, созданных мировой научной селекцией с использованием источников из различных центров происхождения винограда

для разных регионов мира. Дикие виды и дикорастущие формы, родственники культурного винограда, тоже несут множество ценных генов и признаков, наследственная основа которых служит неисчерпаемым источником исходного материала для создания новых поколений сортов винограда. На сегодняшний день, благодаря применению новых технологий, развитию биотехнологии и генной инженерии, значительно возросла ценность и роль зародышевой плазмы как исходного материала для селекции. Многогранность этой проблемы состоит также в том, что ни одна страна мира не может самостоятельно обеспечить себя растительным разнообразием (Рябчун, Богуславский, 2002; Cooper, 2002; FAO, 2014, 2017). Поэтому сохранение генетических ресурсов винограда имеет огромное значение как для современной науки и современных людей, так и для будущих поколений. В настоящее время проблема сбора, сохранения и стабильного использования генетических ресурсов винограда института «Магарач» чрезвычайно важна для успешного развития виноградарства Республики Крым.

Генетические ресурсы винограда

Генетические ресурсы винограда института «Магарач» собраны в ампелографической коллекции, одной из крупнейших и старейших коллекций винограда в мире, что отмечалось на международных научных форумах и специализированных интернет-сайтах (Dettweiler et al., 2004; Maul, This, 2008). Формирование коллекции тесно связано с основанием Никитского ботанического сада (1814 г.) и института «Магарач» (1928 г.) (Авидзба и др., 2015) и совпадает с периодом начала коллекционирования сортов винограда в Европе. Первая ампелографическая коллекция была заложена аббатом Розье в Академии г. Марселя в 1780 г. (Наумова, Ганич, 2015). В XVIII веке в большинстве европейских стран (Германия, Франция и др.) существовали крупные частные коллекции винограда, содержащие несколько сотен сортов (Maul et al., 2015). Уникальность коллекции института «Магарач» состоит в том, что на протяжении двух столетий она пополнялась сортообразцами из различных виноградарских регионов мира: Европы, Азии, Африки и Северной Америки, и большинство из них сохранилось до наших дней. Всего коллекция винограда института «Магарач» содержит 4120 образцов и включает базовую коллекцию винограда, которая насчитывает 3357 образцов (<http://magarach-institut.ru>; <http://www.ckp-rf.ru>), и специальную селекционную коллекцию, в которую входят селекционные сорта и формы института

Table 1. World's largest collections of grapevine*

Country	Institute	Number of accessions
France	UFR de Viticulture, Centre ENSA.M/INRA, Montpellier	7179
USA	Agrarian University of Florida	5952
India	Agrarian Institute, Bangalore	3900
Germany	Total number in <i>ex situ</i> field collections	5500
	Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof	2582
Spain	Junta de Andalucia, Consejería de Agricultura y Pesca	1452
	Departamento de Biología Vegetal Universidad Politécnica de Madrid	2573
Greece	Research Center of Makedonia and Thraki Greek Gene Bank	259
	NAGREF Vine Institute	791
Italy	Istituto Sperimentale per la Viticoltura	2223
	Centro Miglioramento Genetico e Biologia della Vite	404
	Istituto Agrario di San Michele all'Adige	1564
	Università degli Studi di Udine	349
Bulgaria	Institute of Viticulture and Oenology, Pleven	1676
Moldova	Institut National de la Vigne et du Vin	2574
Russia	Anapa Ampelographic Collection of the North Caucasian Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture	4901
		4120

* Sources: Maul, This (2008); Avidzba et al. (2015); Naumova, Ganich (2015).

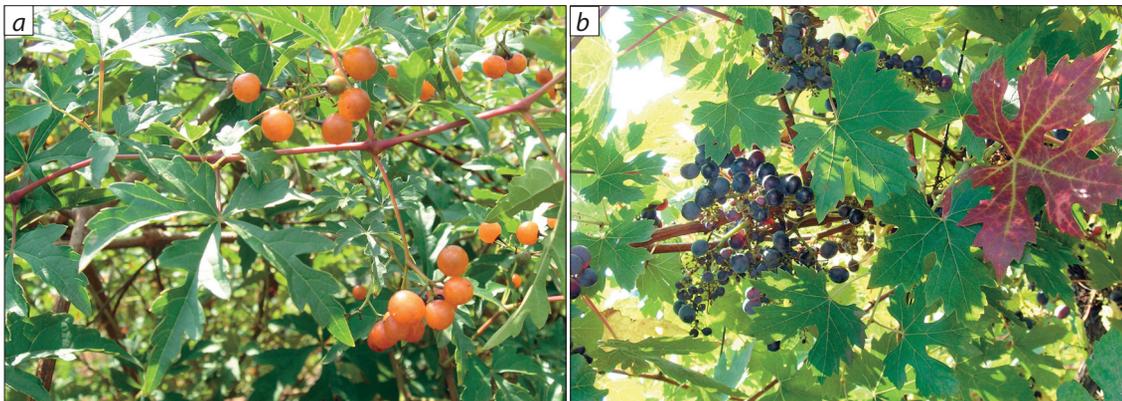


Fig. 1. Wild relatives of *V. v. ssp. sativa* DC.: *a*, genus *Ampelopsis* Michaux; *b*, wild forest grapevine *V. v. ssp. sylvestris* (C. C. Gmel.) Hegi

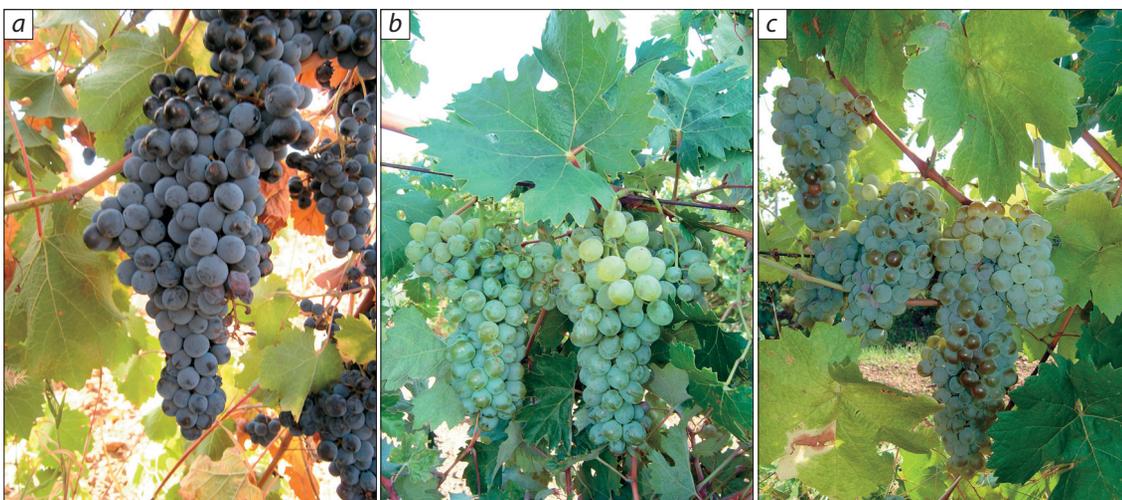


Fig. 2. Grapevine varieties of the Magarach ampelographic collection: *a*, Merlot; *b*, – Kokur white; *c*, Bulany white.

«Магарач» – 763 образца. Благодаря большому количеству образцов винограда и их генетическому разнообразию коллекция института «Магарач» получила мировое признание и официально зарегистрирована в FAO (Полулях, Волынкин, 2008, 2014). По числу образцов коллекция занимает пятое место в ряду самых крупных мировых коллекций винограда (табл. 1), первенство принадлежит французской коллекции в г. Монпелье – 7179 образцов. Во многих странах создано несколько коллекций винограда при научных учреждениях. Например, в Германии в настоящее время шесть государственных учреждений поддерживают около 5500 образцов в коллекциях *ex situ* (Maul, This, 2008).

В коллекции института «Магарач» собраны образцы из виноградарских регионов Европы, Азии, Африки и Северной Америки. Установлено, что сортообразцы происходят из 29 стран дальнего и 12 стран ближнего зарубежья (Авидзба и др., 2004, 2015; Полулях, Волынкин, 2008, 2014). Семейство Vitaceae Lindley. в коллекции представлено тремя видами рода *Ampelopsis* Michaux (рис. 1, а), двумя видами рода *Parthenocissus* Planch. и 22 видами рода *Vitis* Linn. (табл. 2). Европейско-азиатский вид *Vitis vinifera* L. в коллекции представлен подвидами *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* (C.C. Gmel.) Hegi. – дикий лесной виноград (см. рис. 1, б) и *Vitis vinifera sativa* D.C. – культурный виноград. Подвид *Vitis vinifera sativa* D.C. в коллекции представлен 730 селекционными сортами внутривидового скрещивания и 1432 местными и аборигенными сортами разных стран. Одна из важных задач сбора и сохранения генофонда рода *Vitis* во многих странах мира – сохранение местных сортов винограда, которые являются исключительно частью природного наследия и не произрастают в других винных регионах (Pelengic, Kouza, 2012; Li et al., 2015; Maul et al., 2015). 75 местных сортов винограда Крыма наиболее полно сохранились только в ампелографической коллекции «Магарач».

Местные сорта винограда разных стран представлены в коллекции тремя эколого-географическими группами: бассейна Черного моря – *Vitis vinifera sativa* convar. *pontica* Negr., западноевропейской – *Vitis vinifera sativa* convar. *occidentalis* Negr. и восточной – *Vitis vinifera sativa* convar. *orientalis* Negr. (Негруль, 1946). К местному сортименту Западной Европы convar. *occidentalis* Negr. относятся в основном сорта технического направления использования (101 сорт), которые обладают относительной морозостойкостью и хорошей экологической пластичностью: Алиготе, Рислинг рейнский, Каберне-Совиньон, Шардоне, Мерло (рис. 2, а) и т. д. Сортимент эколого-географической группы Черного моря convar. *pontica* Negr. представлен 249 местными сортами Грузии, России, Молдовы, стран Балканского полуострова, в том числе высокоурожайными винными и столовыми сортами Саперави, Ркацителли розовый, Плавай, Кокур белый (см. рис. 2, б), Чауш, Буланы белый (см. рис. 2, в) и др. Группа восточных сортов convar. *orientalis* Negr. в коллекции самая многочисленная – 407 сортов. Это сорта в основном столового направления использования: Шабаш (рис. 3, а), Хусайне келим бармак (см. рис. 3, б), Тайфи белый (см. рис. 3, в), Нимранг, Хусайне люда и др., а также группа бессемянных сортов: Кишмиш белый овальный, Кишмиш розовый,

Table 2. Grapevine genetic resources at Magarach *

Index	Number accessions
Total number of accessions in the base collection	3357
Including:	
<i>V. v. sativa</i> D.C. (local and autochthonous varieties)	1432
<i>V. v. sativa</i> D.C. (bred varieties)	730
<i>V. v. ssp. sylvestris</i> (C.C. Gmel.) Hegi.	106
Interspecific hybrids:	612
varieties – interspecific hybrids	495
hybrids <i>Vitis vinifera</i> L. × <i>Vitis amurensis</i> Rupr.	82
hybrids <i>Vitis vinifera</i> L. × <i>Vitis labrusca</i> L.	28
hybrids <i>Vitis riparia</i> Michx.	6
hybrids <i>Vitis rupestris</i> Scheele.	1
Clones	123 clones (21 varieties)
Wild grapevine species:	27
genus <i>Ampelopsis</i> Michaux	3
genus <i>Parthenocissus</i> Planch.	2
genus <i>Vitis</i> Linn.	22
Samples with unclear status	327
Varieties and forms bred at Magarach (special breeding collection)	763
Total:	4120

* Source: Polulyakh, Volynkin (2015).

Кишмиш мраморный (рис. 4) и др. В коллекции также собраны 123 клона (21 сорта) винограда (Полулях, Волынкин, 2015).

Сортов межвидового происхождения (см. табл. 2) в коллекции насчитывается 612 (Полулях, Волынкин, 2015), в том числе: 495 межвидовых гибридов, которые являются гибридами трех и более видов винограда (это 14 сортов селекции Сейв Виллара и других французских оригинаторов (Виллар нуар, Мускат де Сен Валье, Перль нуар и др.), 7 сортов-подвоев (Берландиери × Рипариа Кобер 5ББ, Берландиери × Рипариа СО4 и др.) и сорта современной селекции с групповой устойчивостью: Подарок Магарача (рис. 5, а), Красень (см. рис. 5, б), Ялтинский бессемянный (см. рис. 5, в), Цитронный Магарача, Молдова, Кодрянка, Регент, Сирус и др.); гибриды *Vitis vinifera* L. × *Vitis amurensis* Rupr. (82 сорта): Буйтур, Фиолетовый ранний, Агат донской, Выносливый, Голубок и др.; гибриды американских видов, которые обладают устойчивостью к грибным болезням, филлоксере и повышенной морозостойкостью: *Vitis vinifera* L. × *Vitis labrusca* L. (28 сортов), *Vitis riparia* Michx. (6 сортов) и *Vitis rupestris* Scheele. (1 сорт).

Базовая полевая коллекция винограда

Базовая коллекция винограда института «Магарач» находится в Западном предгорно-приморском природном виноградарском регионе Крыма (с. Вилино, Бахчисарайский район, Автономная Республика Крым). Климатические условия этого региона позволяют выращивать виноград всех периодов созревания без укрытия кустов на зиму. Коллек-

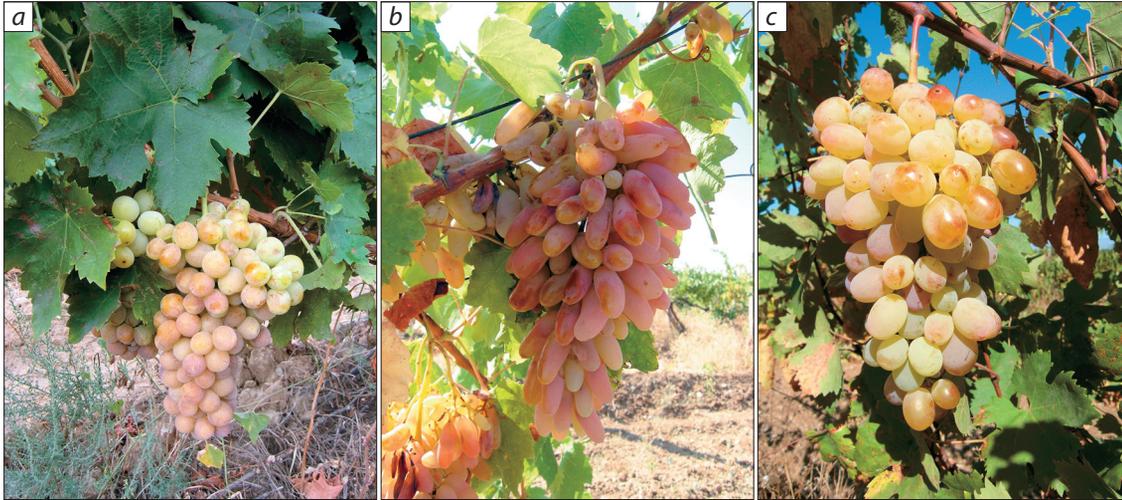


Fig. 3. Table grapes of the Institute "Magarach" ampelographic collection: *a*, Shabash; *b*, Husaine Kelim barmak; *c*, Tayfi white.

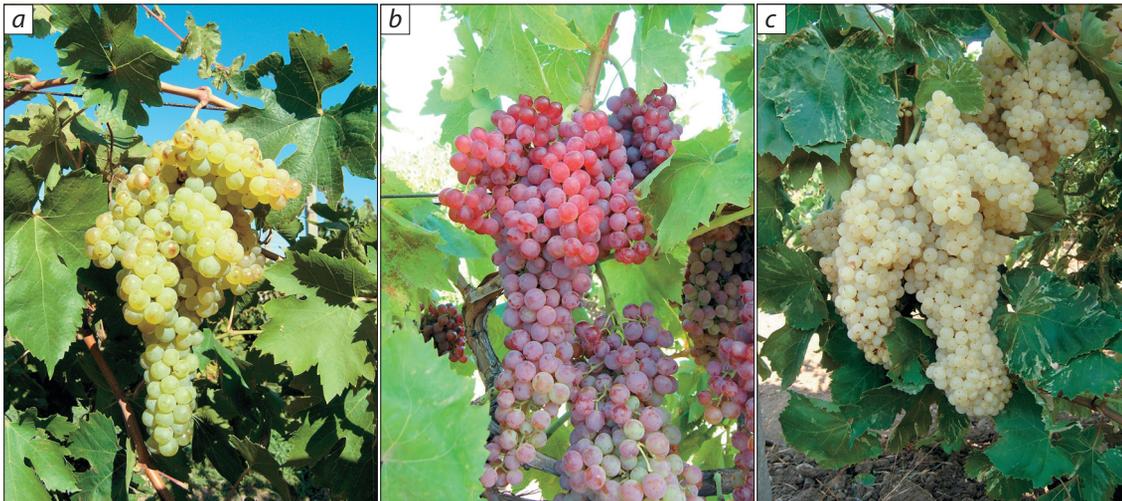


Fig. 4. Seedless grapevines of the Institute "Magarach" ampelographic collection: *a*, Sultana white oval; *b*, Sultana pink; *c*, Marble Sultana.

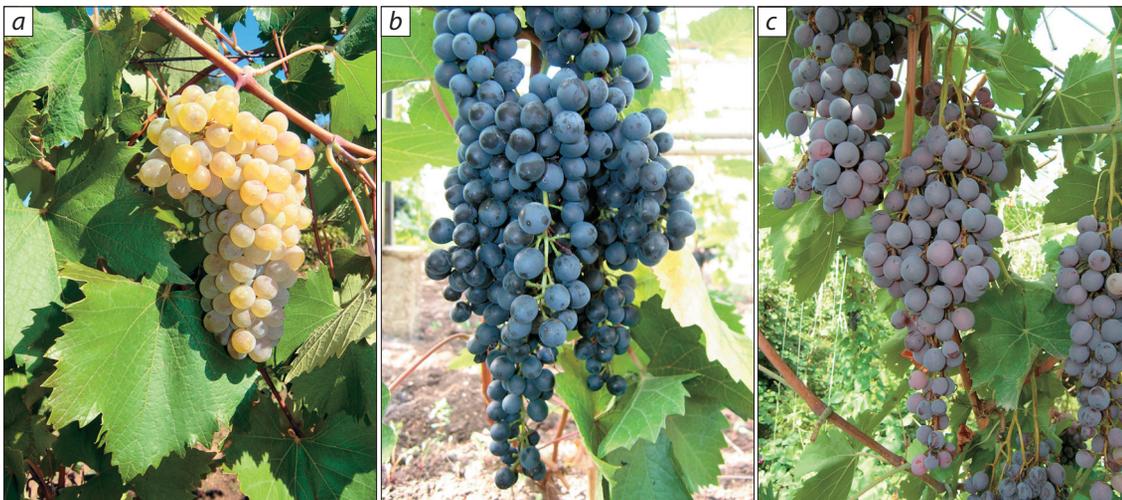


Fig. 5. Grapevine varieties bred at the Institute "Magarach": *a*, Podarok Magaracha; *b*, Krasen; *c*, Yalta seedless.

ция заложена в 1978–1988 гг., привита на филлоксероустойчивом подвое Кобер 5ББ. Площадь участка, который занимает коллекция, составляет 16 га. Агротехнический уход осуществляется по правилам, общепринятым для данного региона виноградарства. В основу размещения сортов положен эколого-географический принцип: сорта сгруппированы в кварталы по месту их происхождения или наибольшего распространения. Каждый образец в коллекции представлен 10 кустами. Это удобно для проведения ампелографических исследований с целью установления истинности сортов, выявления синонимов, выделения сортогрупп и сортотипов, выяснения вопросов происхождения и систематики винограда. Сравнительное изучение по хозяйственным признакам образцов, которые находятся в одинаковых климатических и агротехнических условиях, позволяет выделять источники ценных хозяйственных признаков для производства и селекции, проводить селекционные и научные исследования (Авидзба и др., 2004; Полулях, Волынкин, 2008, 2014).

Полевая коллекция винограда *ex situ* включает 3357 генетически гетерогенных образцов винограда. Специфика сохранения коллекции винограда как культуры, которая размножается вегетативно, во многом зависит от следующих факторов.

1. Зона распространения филлоксеры на Крымском полуострове требует возделывания привитой культуры винограда. Генетически разнообразные образцы коллекции обладают различным аффинитетом, что приводит к слабому росту и плодоношению, недолговечности привитых растений. Также в процессе прививки создается большая раневая поверхность и возникает риск заражения бактериальными и вирусными болезнями.
2. Генетически разнообразные образцы коллекции, собранные из разных виноградарских регионов мира, обладают различной устойчивостью к болезням, вредителям винограда, критическим зимним температурам, экстремальной засухе и др. Поэтому на сохранность образцов коллекции влияют также экстремальные природные факторы, эпифитотии болезней. Например, в результате экстремальных зимних морозов 2006 г. в коллекции погибли 150 образцов винограда (Волынкин, Полулях, 2007).
3. Условия возделывания. Неправильный уход, недостаточная агротехника, недостаточное обеспечение влагой на фоне продолжительной засухи, недостаточная защита от болезней и вредителей винограда снижают жизнеспособность растений. Поэтому коллекционные насаждения требуют соблюдения агротехники на самом высоком уровне.
4. Многолетний характер насаждений. В процессе многолетнего возделывания, в результате воздействия антропогенных (неправильный уход, недостаточная агротехника), техногенных и природных факторов (критические зимние температуры, заморозки, засуха и др.), некоторая часть образцов и отдельных растений погибает, что в свою очередь приводит к изреженности коллекционных насаждений. Установлено, что проводить ремонт выпавших кустов эффективно до 5-летнего возраста виноградных насаждений. В дальнейшем приживаемость саженцев резко снижается из-за

уплотненной в результате механизированных обработок структуры почвы и способности взрослых растений подавлять рост молодых. Как правило, после 20–25 лет эксплуатации виноградная коллекция требует перезакладки. Возраст кустов ныне существующей коллекции составляет 35–38 лет, и в настоящее время необходима немедленная перезакладка ампелографической коллекции института «Магарач».

Учитывая существующие трудности и проблемы сохранения коллекции винограда, в будущем для успешной закладки и сохранения новой коллекции, соответствующей международным стандартам создания генбанка винограда (Maghradze et al., 2015a), необходимо выполнение следующих условий.

1. Нынешняя технология возделывания винограда разработана для климатических условий середины прошлого века. Учитывая современные изменения климатических условий региона, необходимо применять принципиально новую технологию возделывания коллекции.
2. С учетом вирусных и бактериальных болезней, выявленных на ампелографической коллекции, для выращивания привитого посадочного материала необходимо привлечение методик получения оздоровленного посадочного материала.
3. Процесс перезакладки коллекции винограда – сложный и трудоемкий процесс, который требует обеспечения трудовыми ресурсами, специально обученными рабочими.

Сохранение и поддержание полевой коллекции винограда связано с большими затратами. Привлечение новой технологии возделывания коллекции, получение оздоровленного посадочного материала, обеспечение необходимого количества трудовых ресурсов значительно повышают стоимость перезакладки новой коллекции по сравнению со стоимостью закладки промышленного виноградника.

Кроме традиционного способа сохранения генетических ресурсов винограда в полевой коллекции *ex situ*, существуют другие подходы к сохранению генофонда: создание коллекций растений в культуре *in vitro* и длительное хранение образцов в контролируемых условиях низких и сверхнизких температур.

Сохранение генетических ресурсов винограда в культуре *in vitro*

В последнее время наряду с традиционными способами размножения и сохранения растений большое значение приобретают методы культуры изолированных тканей и органов *in vitro*, которые находят широкое применение для решения многих научно-теоретических и практических задач. Методы *in vitro* с использованием побегов, меристем и эмбрионов идеально подходят для сохранения зародышевой плазмы вегетативно размножаемых растений, в том числе винограда. Поддержание генплазмы винограда в виде каллусной ткани или суспензионной культуры нецелесообразно из-за соматональной изменчивости (Бутенко, 1964; Голодрига и др., 1986). Созданы коллекции в культуре тканей *in vitro* более 1000 видов растений (Ashmore, 1997). Существуют три основных направления хранения растительного материала в культуре *in vitro*, суть

которых заключается в соблюдении условий, способствующих: нормальной скорости роста, минимальному росту или прекращению роста. В настоящее время разработан метод хранения коллекционного генофонда винограда *in vitro* в условиях минимального роста без пересадок в течение 10–12 месяцев (Дорошенко, Хохлова, 1993; Tehrim, Sajid, 2011; Bosco et al., 2015; Дорошенко, Жукова, 2016). В отделе селекции, генетики и ампелографии института «Магарач» в культуре *in vitro* сформирована вегетирующая коллекция 40 сортов, гибридов и клонов винограда (Павлова, Клименко, 2008, 2009).

Ряд зарубежных исследователей рассматривают сохранение зародышевой плазмы виноградной лозы *in vitro* как альтернативу полевой коллекции и считают, что разработка эффективных и осуществимых способов ее хранения *in vitro* может обеспечить сбережение ценного биоразнообразия (Reed et al., 2004; Tehrim, Sajid, 2011; FAO, 2014; Bosco et al., 2015; Maghradze et al., 2015b). Культура *in vitro* дает возможность в малом пространстве поддерживать большое количество материала в среде, свободной от патогенов и влияния неблагоприятных природных факторов, а также в кратчайшие сроки получить большое количество растений при недостатке исходного материала и получить потомство, генетически идентичное исходному виду или форме (Бутенко, 1964; Голодрига и др., 1986; Волюнкин и др., 2009; FAO, 2014). Данный метод может успешно применяться также для недолгосрочного хранения образцов винограда и транспортировки на дальние расстояния. Применение методов термотерапии и культуры меристем в культуре винограда *in vitro* позволяет получать оздоровленный посадочный материал (Бутенко, 1964; Голодрига и др., 1986; Дорошенко, Жукова, 2016).

Использование всех этих методов необходимо для получения оздоровленного посадочного материала при закладке новой полевой коллекции винограда, которую планируется провести в институте «Магарач», учитывая возраст существующей коллекции и ее фитосанитарное состояние. Для соответствия ампелографической коллекции института «Магарач» международному уровню целесообразно также формирование дуплетной коллекции в культуре *in vitro*.

Среди недостатков метода следует отметить, что поддержание коллекции в культуре *in vitro* предполагает сохранность только вегетирующего побега с листьями, что затрудняет идентификацию образцов и делает невозможным изучение хозяйственных характеристик сорта. Организация коллекции в культуре *in vitro* требует создания специальной лаборатории по клональному микроумножению винограда, наличия фитотрона, присутствия дополнительных специалистов, владеющих навыками культивирования растений, наличия тепличного комплекса для адаптации растений, спецоборудования, которое будет гарантировать поддержание определенных условий содержания коллекции, что требует дополнительного финансирования.

Криосохранение генплазмы винограда

Эффективным путем решения проблемы сохранения генетических ресурсов растений, который исключает риск их потерь из-за биотических или абиотических стрессоров,

может служить криоконсервация – метод долговременного хранения живых клеток и тканей при температуре жидкого азота (Markovic et al., 2013; Faltus et al., 2015; и др). На сегодняшний день криоконсервирование стало основным способом сохранения генетического материала таких культур, как рис, пшеница, арахис, маниока, сахарный тростник, кокос, некоторых плодовых и ягодных культур. Криобанки растений успешно функционируют в США, Японии, Южной Кореи и др. (Kozaki et al., 1988; Вержук и др., 2009; Marković et al., 2015; FAO, 2017). Это высокотехнологический метод, который дает возможность хранить большое количество образцов и небольшое количество материала каждого образца в небольшом пространстве.

Разработка методов криоконсервации виноградной лозы началась в 1990-х гг. Основной механизм сохранения биологических объектов в условия сверхнизких температур (до -196°C) – это витрификация, перевод воды в твердое состояние без кристаллизации. Проблемы, возникающие с криоконсервацией гермоплазмы винограда, обусловлены особенностями строения ее клеток, отличающихся большими размерами, сильной вакуолизацией и, следовательно, большим содержанием воды, а также уровнем критической дегидратации (30–40%), снижение которого ведет к необратимой потере жизнеспособности. Развитие криогенного способа хранения растительного материала винограда связано с разработкой методов, позволяющих избежать различных криоповреждений, обусловленных дегидратацией, осмотическим шоком и деструкцией мембран, органелл и протопластов в результате внутриклеточной кристаллизации, приводящих к нарушениям меж- и внутриклеточной компартиментализации. К другим основным проявлениям криоповреждений у винограда следует отнести накопление промежуточных продуктов ферментативных реакций и других растворимых соединений, в том числе изменения внутриклеточного pH и т. д. (Мануильский, 1992).

В связи с этим для криоконсервации винограда было разработано небольшое количество методов, и их использование все еще ограничено. Путем применения метода инкапсуляции – обезвоживания успешно замораживали эмбрионные клеточные суспензии двух элитных испанских сортов винограда Albarico и Tempranillo. Криоконсервированные инкапсулированные клетки использовались для инициации новых клеточных суспензий, изучалась их эмбрионная емкость. Этот метод криоконсервации стал шагом вперед в вопросе хранения готовых к использованию компетентных эмбрионных тканей для проектов генетической трансформации виноградной лозы (Gonzales-Benito et al., 2009). Использование метода термического анализа позволило обнаружить фазовые переходы в растительных тканях и оценить отдельные этапы криопротокола перед криоконсервацией эксплантатов виноградной лозы, которые улучшают их толерантность к обезвоживанию и постепенно обезвоживают их так, что оставшееся содержание воды позволяет поддерживать жизнеспособность эксплантов. При этом доля замораживаемой воды минимальна (Faltus et al., 2015). Применение методов инкапсуляции – обезвоживания (encapsulation – dehydration) и капелька-витрификация (droplet-vitrification) для криоконсервации верхушечных побегов винограда

сорта Порган в условиях жидкого азота дало возможность получить до 50 % жизнеспособных образцов апикальных меристем, восстановленных после криозамораживания (Marković et al., 2013, 2015).

В совместных исследованиях института «Магарач» с Институтом животноводства НААН Украины (Харьков) в 2007–2009 гг., а также исследованиях института «Магарач» с Институтом проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков) в 2012–2014 гг. были предприняты попытки разработать методику, позволяющую избежать различных криоповреждений гермоплазмы винограда для ее хранения в низкотемпературном банке. Однако проведенные исследования, учитывая трудности преодоления криоповреждений биологического материала винограда в условиях сверхнизких температур, пока не принесли ожидаемого результата (Горбунов и др., 2009; Присталов и др., 2014).

В настоящее время метод криоконсервации виноградной лозы остается наиболее сложным. До сих пор не удалось полностью восстановить растительный материал винограда после криоохлаждения, и риск потери коллекции довольно высокий (Faltus et al., 2015; Marković et al., 2015).

Ни один из существующих методов хранения генплазмы растений не гарантирует 100 % сохранности жизнеспособных образцов. Для исключения потерь коллекционного генофонда в разработанном International Plant Genetic Resources Institute (Bioversity International) руководстве для управления коллекциями зародышевой плазмы различных культур рекомендуют дублировать коллекции: например, три полевые коллекции в разных местах, или полевая коллекция и коллекция *in vitro*, или полевая коллекция или коллекция *in vitro* и один набор криоконсервированных образцов (Reed et al., 2004; FAO, 2014).

Анализируя положительные и отрицательные стороны существующих методов хранения генплазмы, можно сделать вывод, что для оптимального сохранения генетических ресурсов винограда необходимо существование полевой коллекции винограда как основной метод. Формирование коллекций образцов винограда в культуре *in vitro* на сегодня следует рассматривать как дополнение к основному методу. В дальнейшем остается целесообразным развитие методов консервации растительного материала винограда в условия сверхнизких температур.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Ampelograficheskaya kolleksiya "Magarach" [Ampelographic collection "Magarach"]. URL: <http://www.ckp-rf.ru> (accessed May 3, 2017). (in Russian)

Ashmore S. Status Report on the Development and Application of *in vitro* Technique for the Conservation of Plant Genetic Resources. Rome, Italy: IPGRI, 1997.

Avidzba A.M., Volynkin V.A., Likhovskoi V.V., Polulyakh A.A., Troshin L.P. World ampelographical collection All-Russian National Research Institute of Viticulture and Winemaking "Magarach" and North Caucasian Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture. Nauchnyy zhurnal KubSAU = Scientific Journal of KubSAU. 2015;110(06):1-27. <http://ej.kubagro.ru/2015/06/pdf/96.pdf>. (in Russian)

Avidzba A.M., Volynkin V.A., Melkonjan M.V., Polulyakh A.A. Potential grapevine genetic resources in Ukraine. "Magarach". Vinogradarstvo i vinodelie = "Magarach". Viticulture and Winemaking. 2004;3:2-3. (in Russian)

Bosco D., Sinski I., Comachio V., Maia J.D.G., Ritschel P.S., Quecini V. *In vitro* techniques for grapevine germplasm conservation. Acta Hort. 2015;1082:201-205.

Butenko R.G. Kultura izolirovannykh tkaney i fiziologiya rasteniy [Culture of isolated tissues and plant physiology]. Moscow: Nauka Publ., 1964. (in Russian)

Cooper H.D. The International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. RECIEL. 2002;11(1):1-16.

Dettweiler E. Genetic resources – Gene banks. Vitis. 1990;29:57-59.

Dettweiler E., This P., Eibach R. The European network for grapevine genetic resources conservation and characterization. Materials of XXV Congress mondial de la vigne et du Vin. France, Paris, 2004;1-10.

Doroshenko N.P., Khokhlova M.A. The method of creating of gene pool collection *in vitro*. Vinograd i vino Rossii = Grapevine and Wine in Russia. 1993;6:18-21. (in Russian)

Doroshenko N.P., Zhukova T.V. Creation and storage of a grapevine collection *in vitro*. Russkiy vinograd = Russian Grape. 2016;3:8-14. (in Russian)

Eiras-Dias J.E.J. Status of the *Vitis* national collection in Portugal. Report of a Working Group on *Vitis*. Rome, Italy: Bioversity International, 2008;93-94.

Faltus M., Bilavcik A., Zamecnik J. Thermal analysis of grapevine shoot tips during dehydration and vitrification. Vitis. 2015;54:243-245.

FAO. Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Food Agric. Org. United Nations (FAO). Rome, 2014. URL: <http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/seeds-pgr/gbs/en/>.

FAO. The future of food and agriculture – trends and challenges. Food Agric. Org. United Nations (FAO). Rome, 2017.

Golodryga P.Ja., Zlenko V.A., Chekmarev L.A. Metodicheskie rekomendatsii po klonalnomu mikrorazmnozheniyu vinograda [Methodical recommendations for clonal micropropagation of grapevines]. Yalta: Institute "Magarach" Publ., 1986. (in Russian)

Gonzalez-Benito M.E., Martin M.C., Vidal J.R. Cryopreservation of embryogenic cell suspensions of the Spanish grapevine cultivars 'Albarico' and 'Tempranillo'. Vitis. 2009;48(3):131-136.

Gorbunov L.V., Salina A.S., Shiyanova T.P., Volynkin V.O., Polulyakh A.A. Critical zones responsible for the decrease in grapevine rootstock viability when cooled. "Magarach". Vinogradarstvo i vinodelie = "Magarach". Viticulture and Winemaking. 2009;1:19-22. (in Ukrainian)

Katalog ampelograficheskoy kolleksii "Magarach" [Catalog of the ampelographic collection "Magarach"]. URL: <http://magarach-institut.ru> (accessed Nov. 11, 2016).

Kozaki I., Omura M., Matsuta N., Moriguchi T. Germplasm Preservation of Fruit Trees. Preservation of Plant Genetic Resources. Jap. Int. Coop. Agency. 1988;65-74.

Lacombe T. Status of the French *Vitis* National Collection. Report of a Working Group on *Vitis*. Rome, Italy: Bioversity International. 2008;73-74.

Li S.H., Archbold D., London J. Collection, conservation, evaluation and utilization of *Vitis amurensis* germplasm resources in China. Acta Hort. 2015;1082:79-86.

Maghradze D., Maletic E., Maul E., Faltus M., Failla O. Field genebank standards for grapevines. Vitis. 2015a;54:273-279.

Maghradze D., Ocete R., Garcia J.L., Cantos M. Micropropagation and *in vitro* germplasm conservation of Georgian wild grapevines. Vitis. 2015b;54:246-248.

Manuil'skiy V.D. Formirovanie kriorezistentnosti i ustoychivosti rasteniy k nizkim temperaturam [The formation of cold and frost resistance in plants]. Kiev: Nauk. Dumka Publ., 1992. (in Ukrainian)

Marković Z., Chatelet P., Sylvestre I., Kontić J.K., Engelmann F. Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) *in vitro* shoot tips. Cent. Eur. J. Biol. 2013;8:993-1000.

- Marković Z., Preiner D., Stupić D., Andabaka Ž., Šimon S., Vončina D., Maletić E., Karoglan Kontić J., Chatelet P., Engelmann F. Cryopreservation and cryotherapy of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*. 2015;54:247-251.
- Maul E., This P. GENRES 081 – a basis for the preservation and utilization of *Vitis* genetic resources. Maul E., Eiras Dias J.E., Kaserer H., Lacombe T., Ortiz J.M., Schneider A., Maggioni L., Lipman E. (Compilers): Report of a Working Group on Vitis. First Meeting, 12–14 June 2003, Palić, Serbia and Montenegro. Rome, Italy: Bioversity International, 2008;13-22.
- Maul E., Töpfer R., Carka F., Cornea V., Crespan M., Dallakyan M., de Andrés Domínguez T., de Lorenzis G., Dejeu L., Goryslavets S., Grando S., Hovannisyan N., Hudcovicova M., Hvarleva T., Ibáñez J., Kiss E., Kocsis L., Lacombe T., Laucou V., Maghradze D., Maletić E., Melyan G., Mihaljević M.Z., Muñoz-Organero G., Musayev M., Nebish A., Popescu C.F., Regner F., Risovanna V., Ruisa S., Salimov V., Savin G., Schneider A., Stajner N., Ujmajuridze L., Failla O. Identification and characterization of grapevine genetic resources maintained in Eastern European Collections. *Vitis*. 2015;54:5-12.
- Naumova L.G., Ganich V.A. Past and present of ampelographical collections of ARRIV&W. "Magarach". *Vinogradarstvo i vinodelie* = "Magarach". *Viticulture and Winemaking*. 2015;3:20-23. (in Russian)
- Negrul A.M. Proiskhozhdenie kulturnogo vinograda i ego klassifikatsiya [Origin of cultivated grapevines and their classification]. *Ampelografiya SSSR* [Ampelography in the USSR]. Moscow: Pishchepromizdat Publ., 1946;1:159-216. (in Russian)
- Pavlova I.A., Klimenko V.P. Collection of grapevine varieties, hybrids and clones under *in vitro* conditions. Tezisy dokladov i soobshcheniy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, posvyashchennoy 180-letiyu NIViV "Magarach". "Perspektivy razvitiya vinogradarstva i vinodeliya v stranah SNG". Yalta, 28–30 oktyabrya 2008 g. [Abstracts from the International Scientific and Applied Conference Dedicated to the Centenary of the Institute of Viticulture and Winemaking "Magarach" "Prospects for the Development of Viticulture and Winemaking in CIS Countries". Yalta, 28–30 Oct. 2008]. Yalta, 2008;1:80-81. (in Russian)
- Pavlova I.A., Klimenko V.P. Creation and prospects of use of an *in vitro* collection of grapevine varieties and hybrids. Tezisy Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii, posvyashchennoy 200-letiyu Ch. Darvina i 200-letiyu Nikitskogo botanicheskogo sada "Aktualnye problemy prikladnoy genetiki, selektsii i biotekhnologii rasteniy". 3–6 noyabrya 2009 g., Yalta [Abstracts of Intern. Conf. in commemoration of the 200th anniversary of Charles Darwin and the 200th anniversary of Nikitsky Botanical Gardens "Actual Problems of Applied Genetics, Breeding and Biotechnology of Plants". Yalta, 3–6 Nov. 2009]. Yalta, 2009;149. (in Russian)
- Pelengic R., Koruza B. Slovenia grapevine germplasm. *Acta Agriculturae Slovenica*. 2012;99(3):429-432.
- Polulyakh A.A., Volynkin V.O. Genetychni resursy vynogradu Ukraïny: zberezhennya, vyvchennya i vykorystannya [Grapevine genetic resources in Ukraine: conservation, study, and use]. *Genetychni resursy roslyn* [Plant Genetic Resources]. Harkiv: NCGRRU Publ., 2008;5:23-34. (in Ukrainian)
- Polulyakh A.A., Volynkin V.A. World ampelographic collection of the National Institute of Vine and Wine "Magarach". *Sbornik nauchnykh trudov NIViV "Magarach" "Vinogradarstvo i vinodelie"* [Proceedings of the National Institute of Viticulture and Winemaking "Magarach"]. Yalta, 2014;5-10. (in Russian)
- Polulyakh A.A., Volynkin V.A. Grapevine genetic resources of institute "Magarach" and the modern approach to the classification of wild and cultivated grapevines of Crimea by ampelographic characters. "Magarach". *Vinogradarstvo i vinodelie* = "Magarach". *Viticulture and Winemaking*. 2015;4:6-8. (in Russian)
- Pristalov A.I., Bondar' I.N., Polulyakh A.A., Likhovskoy V.V. *Vinogradarstvo Slobozhanshchyny: istoriya, problemy, perspektivy sozdaniya i sohraneniya kolektsiy* [Viticulture of Sloboda Ukraine: history, problems and prospects for the creation and preservation of collections]. *Visnyk Harkivs'kogo nacional'nogo universytetu im. V.N. Karazina. Seriya Biologiya. Vypusk 20*. [Bulletin of the Karazin Kharkov National University. Biology series. Issue 20]. Har'kov, 2014;1100:53-60. (in Ukrainian)
- Reed B.M., Engelmann F., Dulloo M.E., Engels J.M.M. Technical guidelines for the management of field and *in vitro* germplasm collections. IPGRI Handbooks for Genebanks No. 7. Int. Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 2004.
- Ryabchun V.K., Boguslavs'kiy R.L. *Problemy ta perspektivy zberezhennya genofondu roslyn v Ukraïni* [Problems and Prospects of Preserving the Gene Pool of Plants in Ukraine]. Harkiv, 2002. (in Ukrainian)
- Tehrim S., Sajid G.M. *In vitro* establishment, conservation and its implications for grape germplasm biodiversity. *Romanian Biotechnol. Lett*. 2011;16(6):6785-6789.
- Verzhuk V.G., Filipenko G.I., Tikhonova N.G., Zhestkov A.S., Lupyshcheva Ju.V., Pupkova N.A., Mikhaylova E.V., Savel'ev N.I., Dorokhov D.S. *Razrabotka metodov kriosokhraneniya genetycheskikh resursov rasteniy plodovykh i yagodnykh kul'tur* [Development of methods for cryopreservation of plant genetic resources of fruit and berry crops]. *Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii* = *Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2009;166:353-357. (in Russian)
- Volynkin V.A., Polulyakh A.A. *Katalog ampelograficheskoy kolektsii Instituta vinograda i vina "Magarach"* [Catalog of the ampelographic collection of the Institute of Viticulture and Winemaking "Magarach"]. Chast I. *Aborigenyye i mestnye sorta Kryma* [Part 1. Autochthonous and local varieties of the Crimea]. Yalta: Institute "Magarach" Publ., 2004. (in Russian)
- Volynkin V.A., Polulyakh A.A. *Evolutsionnoe formirovanie mirovogo genofonda morozoustoychivogo vinograda* [Evolutionary formation of global gene pool of frost grapes]. *Mizhvidomchyj tematychnyj naukovyj zbirnyk "Vinogradarstvo i vinorobstvo"* [Interdepartmental thematic scientific collection "Viticulture and winemaking"]. Odessa, 2007;45(2):25-29. (in Ukrainian)
- Volynkin V., Polulyakh A., Chizhova A., Roshka N. *Ukraine: native varieties of grapevine. Caucasus and Northern Black Sea Region Ampelography*. COST. *Vitis*. 2012;405-473.
- Volynkin V.A., Zlenko V.A., Likhovskoy V.V., Polulyakh A.A. *Breeding of grapevine intergeneric hybrids of the Vitaceae family on the basis of methods of experimental allopolyploidy and in vitro culture of embryos*. "Magarach". *Vinogradarstvo i vinodelie* = "Magarach". *Viticulture and Winemaking*. 2009;1:12-14. (in Russian)