ТЕХНОЛОГИЯ ОТБОРА ЛУЧШИХ ПРОТОКЛОНОВ ВИНОГРАДА

Л.П.Трошин, А.С.Звягин

Из всех культурных растений виноградная лоза характеризуется самой высокой мутабильностью генотипов: по каждому давно возделываемому сорту насчитывается от нескольких единиц до нескольких десятков мутантов, лучшие размножены в виде клонов и занимают большие площади в производстве [52, 55, 64]. В мире зарегистрировано и описано более 3 тысяч клонированных мутантов винограда, большая часть которых в 1,5-2 раза превосходит по продуктивности базовые культивируемые вариации.

В настоящее время работа по отбору клонов ведется по методике, утвержденной на первом Международном симпозиуме по клоновой селекции (1971, ФРГ), рассчитанной на почти 20-летнее испытание [52, 55, 64].

Схема клоновой селекции винограда

Годы	Мероприятия	Этапы отбора
1-2	Изучение экспрессии признаков и анализ продуктивности 1-5 тыс. кустов на винограднике	Первичный отбор
3	Отбор не менее 100 протоклонов	
4-5	Размножение, посадка и формирование кустов	
6-8	Испытание в одной повторности (10-15 кустов) каждого протоклона на участке A, отбор 20 претендентов в клоны	Предварительный отбор
9-10	Размножение, посадка и формирование кустов	
11-13	Испытание в трех-пяти повторностях (по 10 кустов) каждого претендента на участке Б, отбор 10 кандидатов в клоны	Промежуточный отбор
14-15	Размножение, посадка и формирование кустов	
16-18	Испытание в разных экологических условиях и на разных подвоях (3-5 повторностей по 30 кустов в каждой) на участке В, отбор 1-2 клонов	Главный отбор
19	Представление клона (клонов) на государственное испытание	

Успехи клоновой селекции, достигнутые в виноградарстве разных стран мира, свидетельствуют о больших реализованных возможностях использования вегетативной изменчивости сортов винограда [1, 2, 3]. Клоновая селекция оказалась настолько эффективным рычагом подъема рентабельности отрасли, что ею стали заниматься во всех ареалах возделывания винограда не только специальные учреждения, но и частные лица. Клоновую селекцию сорта-подвоя, или привойного сорта, становящихся со временем гетерогенными популяциями, стали проводить периодически с интервалом около 50 лет [1].

Индивидуальной клоновой селекцией сортов винограда на Кубани ученые занимались ранее бессистемно и маломасштабно, поэтому в стандартном сортименте Кубани, как и России, до последнего времени не было ни одного клонированного мутантного генотипа [2, 7, 36, 48, 53, 60-61, 65].

Длительность и сложность клоновой селекции обусловили необходимость поиска и применения современных достижений науки с целью увеличения эффективности и ускорения процесса отбора растений. Ниже предложена новая технология клоновой селекции, позволяющая проводить эффективную идентификацию генотипов перспективных высокопродуктивных растений по фенотипам и сократить длительность их отбора до 3-4 лет. Эта технология во многом основана на методах анализа комплексов количественных признаков с использованием современной вычислительной техники и молекулярного анализа ДНК, уже апробированных при решении ряда задач популяционной биологии [7]. Предлагаемая технология клоновой селекции включает следующие основные новые этапы: трехлетнюю "ступенчатую" селекцию по продуктивности, отбор высокопродуктивных протоклонов по комплексу признаков и их молекулярное маркирование по микросателлитным локусам ДНК.

ЭТАП "СТУПЕНЧАТОЙ" СЕЛЕКЦИИ ВИНОГРАДА

В клоновой селекции узловыми моментами являются способы отбора клонов, сроки их испытания и многократная проверка стабильности свойств в потомстве. Эффективность клонового улучшения сортов значительно повышается при условии предварительного проведения на виноградниках массовой и фитосанитарной селекций по положительным признакам.

Несмотря на разработанность общих принципиальных основ, клоновая селекция во многих странах имеет свои особенности, обусловленные климатическими и экономическими факторами.

Так, в Италии, Франции, Испании, Португалии, Турции, Израиле, Южно-Африканской Республике вирусные эпифитотии вынуждают массовую селекцию промышленных насаждений сводить к санитарной, предшествующей клоновому отбору на продуктивность. В ФРГ массовая селекция проводится на клоновых виноградниках, используемых для производства коммерческого посадочного материала, поэтому специальная санитарная селекция в таких условиях не обязательна, так как массовая селекция по отрицательным признакам проводится систематически и санитарное состояние культуры хорошее [8, 9].

В странах восточной Европы (Болгария, Венгрия, Сербия и др.), где распространение вирусных болезней не достигло таких размеров, как на Западе, тесты на вирусы включены в обязательную программу испытания клонов [10, 11].

Массовая и параллельно проводимая фитосанитарная селекции по отрицательным признакам обеспечивают повышение эффективности на 5-10%, по положительным признакам - на 15-25% [9, 12, 13]. При этом на неулучшенных, издавна известных сортах, эффективность селекции заметно выше, особенно на корнесобственных старых насаждениях: разнообразные процессы ведут к накоплению мутантных вариаций у любого размножаемого сорта [14, 15]. Мутантные вариации (протоклоны) в процессе размножения становятся родоначальниками клонов, совокупности которых образуют биотипы в соответствующих экологических условиях. У сортов винограда народной селекции насчитывается от единиц до нескольких десятков биотипов.

Мутантные вариации или протоклоны, как отражение фенотипического разнообразия сорта по количественным признакам служат материалом для массовой и индивидуальной селекции. Массовой селекцией по отрицательным признакам обычно достигается поддержание достоинств сорта на достигнутом уровне (поддерживающий или стабилизирующий отбор), по положительным признакам достигается усиление тех признаков, на которые ведется селекция (улучшающий или направленный отбор). Методика и техника массовой селекции общеизвестны [3, 13, 16].

Как показало время, генетическое улучшение сорта более результативно и экономически весьма выгодно при использовании этапа "ступенчатого" отбора, на основе которого создаются селекционные маточники, включающие представителей всех положительных клонов, и клоновые маточники, состоящие из размноженных лучших клонов [17].

"Ступенчатый" отбор лучших растений сорта ведется в течение трех лет на одном и том же винограднике, сортовом маточнике или маточнике первичного отбора. Идея его заключается в следующем.

В первый год осенью отбирается 25% лучших по комплексу селектируемых признаков бессимптомных растений (первый уровень отбора), во второй - около половины из числа растений, отобранных в предыдущем году, или 10-12% от общего числа кустов в насаждении (второй уровень отбора); в третий год - два кустапротоклона: крайний (трансгрессивный) и средний (типичный для сорта) по комплексу признаков (третий уровень отбора). В этот же год проводится молекулярное тестирование изучаемых протоклонов и анализ их фитосанитарного состояния ПЦР-способом. Непрерывный отбор ведется одними и теми же исполнителями, с обязательными записями в специальном журнале и отметками кустов на участке. Для облегчения работы предлагается записи вести в первый год отбора по следующей форме:

```
Ряд Пролет Кустоместо Характеристика признаков учетных кустов 3 2 2 и т. д.
```

Во второй и третий годы забракованные кусты вычеркиваются в журнале и записываются причины браковки. Индивидуальные учеты и наблюдения за отбираемыми растениями ведутся в зависимости от возможностей исполнителей по общеизвестным ампелографическим программам [18]. Появление вирусных и других инфекционных болезней фиксируется в соответствующие периоды вегетации ежегодно при минимально трехкратном осмотре выделенных растений [4, 19].

Осенью 3-го года изучения с отобранных по положительным признакам кустов-протоклонов заготавливаются черенки, которые направляются для создания клоноиспытательного участка или, если работа ведется элитоводами - селекционного маточника, и обязательно одновременно для тестирования на вирусоносительство.

2-3% отобранных растений включают мутационные и модификационные вариации - протоклоны, характеризующиеся не только высокой урожайностью, нормальной силой роста, хорошим качеством винограда, оздоровленным состоянием кустов, но и стабильностью выраженности этих селектируемых признаков [17].

В качестве конкретного примера для демонстрации метода "ступенчатой" селекции рассмотрим трехлетние данные по 107 кустам сорта Каберне-Совиньон, поизрастающим при схеме посадки 3,0 х 1,0 м в учхозе «Кубань» Кубанского госагроуниверсита (табл. 1).

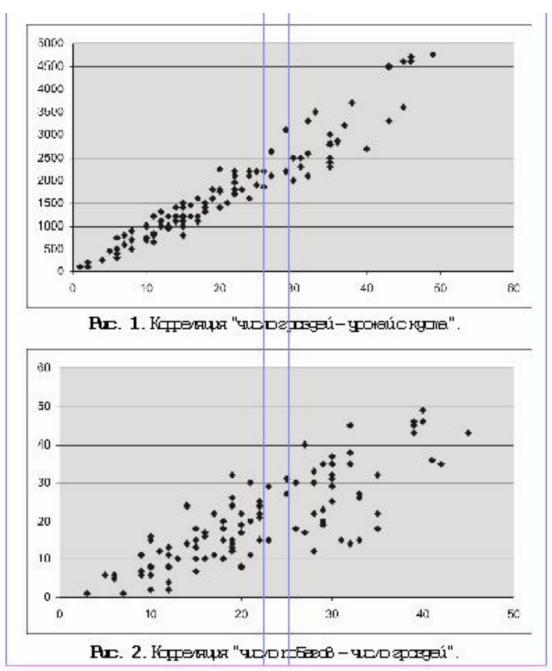
По данным табл. 1 можно выделить группы кустов разной урожайности. Так, наиболее урожайными являлись кусты №№ 74 (4,8 кг), 95 (4,7 кг), 15 и 91 (по 4,6 кг), 69 (4,5 кг) и т. д.; наименее урожайными - кусты №№ 53, 94 и 104 (по 0,1 кг), 37 (0,2 кг), 93 (0,3 кг) и т.д.

Но поскольку урожай с куста прямо зависит от числа гроздей: коэффициент корреляции равен 0,96** (рис. 1) и их массы (коэффициент корреляции 0,22*), а число гроздей на кусте зависит от числа побегов: коэффициент корреляции 0,82** (рис. 2), то необходимо учитывать эти взаимосвязанные факторы формирования урожая при отборе высокопродуктивных кустов-протоклонов и потому следует использовать многомерный способ отбора, разработанный нами и защищенный авторским свидетельством (Животовский и др., 1986).

Для упрощения техники отбора составлена компьютерная программа «Отбор d». Исходные данные вносятся в компьютер в табличной форме EXCEL.

Таблица . Исходные данные дия отбора протокионов

		odunie dar	rmie Avy	4	pa npomo		
Ŋŧ	∏b5eac8	Tpægeú	Уронаці	Nŧ	Note: 1	Ipææi	Урокай
	њжрте	њжре	<u>сжирив,</u> 2		њждте	њжре	сжишта, г
	발생석 ^{사이} 비색임되지점임성은 무료성지정의 HETAN HONGON의 NO	# # 1246-112411205211115546820258411512412241224122612612612612626262626262611261412612412626 # 1246-112411205211165468202582458241312412241226126126126126126126126126126126126126	w #/2255555555555555555555555555555555555			$\frac{\mathbf{p}}{\mathbf{p}} \mathbf{p}_{\mathbf{p}} $	### ### ### #### #####################



Обращаем внимание на то, что применение метода "ступенчатой" селекции позволяет значительно уменьшить количество изучаемых кустов в последующих уровнях отбора без уменьшения эффективности на фоне всех исходно взятых растений. Так, в рассмотренном примере при "ступенчатой" селекции необходимо было учесть урожай лишь со 107 кустов в 2003 г., с 27 кустов (25% от исходной популяции) в 2004 г. и с 6 кустов (5,6% от исходной популяции или 21,4% от числа отобранных кустов в предыдущем году) в 2005 г., в то время как при полном изучении требуется учитывать урожай всех 107 растений в течение всех лет исследований. Трудозатраты по предложенному способу заметно уменьшаются, а эффективность отбора возрастает в несколько раз.

Следует отметить, что "ступенчатая" селекция приводит к значительному снижению гетерогенности сорта по любому селектируемому признаку, в т.ч. и урожаю с куста. Практически в результате использования метода "ступенчатой" селекции достигается отбор 5-6% высокопродуктивных кустов-протоклонов, т.е. 50-60 растений из 1000 или 250-300 растений из 5 тыс. кустов, первоначально взятых для работы по совершенствованию сорта клоновой селекцией. Эти кусты-протоклоны заметно выровнены по продуктивности.

Действительно, обратившись к нашему примеру, можно убедиться в том, что коэффициент вариации CV трех биолого-хозяйственных признаков в 2003 г. составлял 44, 56 и 62% (табл. 2), в 2004 г. стал в группе отобранных 28 кустов меньше: CV = 43, 40 и 46%, а у 6 протоклонов отбора 2005 г. - еще меньше: CV = 42, 22 и 28%.

Результаты "ступенчатой" селекции по 107 кустам сорта Каберне-Совиньон по данным об урожае за 2003-2005 гг. представлены в табл. 2-3.

У отобранных 6 кустов средние значения признаков составили 29 побегов, 41 гроздь и 3717 г массы урожая на фоне 23, 26 и 2264 г у 22 забракованных кустов, что свидетельствует о достигнутой цели: прогресс по урожаю достигнут на уровне 64%.

Средние значения: 21,8 побегов, 20,4 гроздей, 1708,9 г урожая с куста.

```
Сренеквадратичные отклонения: 9.5; 11,4; 1056,9.
Коэффициенты вариации, %: 43,7; 56,3; 61,8.
Обобщенные параметры:
M = 91,208: VAR = 713,528:
                                CV = 74.077:
                                                 29,287: R = 0.901.
Ранжированные расстояния д.:
      0.120
              0.157
                       0.158
                               0.294
                                       0.341
                                               0.413
                                                       0.425
                                                                0.427
      0.444
              0,465
                       0.490
                               0.497
                                       0.500
                                               0,505
                                                       0,505
                                                                0.506
      0,507
              0,523
                       0,546
                               0,548
                                       0,549
                                               0,555
                                                       0,555
                                                                0,577
                       0,594
      0,586
              0,587
                               0,597
                                       0,597
                                               0,626
                                                       0,644
                                                               0,647
                                               0,720
                                       0,690
                                                               0,722
      0,651
              0,658
                       0,670
                               0,670
                                                       0.721
              0,730
      0,725
                       0,744
                               0,748
                                       0,764
                                               0,764
                                                       0,779
                                                               0,789
      0,793
              0,794
                       0.807
                               0,830
                                       0.831
                                               0.831
                                                       0.836
                                                               0.844
      0.846
              0,850
                       0.868
                               0,868
                                       0.896
                                               0.902
                                                       0.904
                                                                0.911
      0,916
              0,926
                       0,950
                               0,957
                                       0,962
                                               0,966
                                                       0,970
                                                                0,977
      0,980
              0,989
                       0,992
                               1,006
                                       1,012
                                               1,015
                                                       1,054
                                                                1,170
                                               1,241
      1,170
              1,181
                       1,190
                               1,210
                                       1,220
                                                       1,272
                                                                1,311
              1,320
                       1,369
                                       1,479
                                               1,497
                                                       1,522
                                                                1,569
      1,317
                               1,378
                       1,649
                               1,679
      1,593
              1,639
                                               1,754
                                                       1,755
                                       1,684
                                                               1,839
      1,865
              1,884
                       1,895
                                                  50
                                                        45
Номера кустов
                 26
                       18
                              27
                                     34
                                           25
                                                               57
                 59
                       10
                              46
                                     29
                                           11
                                                  22
                                                        56
                                                               98
                  6
                       55
                              12
                                    88
                                           60
                                                  17
                                                        73
                                                               90
                                                               79
                 65
                       39
                             103
                                     62
                                           63
                                                  97
                                                        41
                                            7
                                                  96
                 24
                              40
                                      8
                                                        48
                                                               47
                        1
                 51
                      100
                              61
                                     5
                                                  44
                                                        68
                                                               67
                                           86
                 31
                      106
                              52
                                     85
                                            4
                                                  42
                                                        93
                                                               13
                                                  70
                                                        20
                                                               99
                101
                       66
                              54
                                     21
                                           33
                  9
                      102
                              37
                                     71
                                           80
                                                  94
                                                        82
                                                               84
                  3
                       14
                              83
                                    107
                                          104
                                                  92
                                                        58
                                                               77
                 53
                             105
                                                        75
                                                               23
                        2
                                    78
                                           76
                                                  64
                 16
                       19
                              81
                                     30
                                           72
                                                  28
                                                        38
                                                               36
                 32
                       49
                                                               91
                              35
                                    89
                                           43
                                                  74
                                                        15
                 87
                       69
                              95
Примечание: жирно выделены 28 отобранных для последующего изучения кустов.
                                                                                                     Таблица 3
                 Выделение "средних" и "крайних" фенотипов среди 28 кустов в 2004 г.
Средние: 24,2; 28,8; 2575,0.
Коэффициенты вариации: 43,3; 40,3; 45,9.
Обобщенные параметры:
M = 121,628; VAR = 1340,826; CV = 62,364; 30,106; R = 0,788.
Ранжированные расстояния до:
      0,359
              0.371
                       0.416
                               0,430
                                               0,699
                                                       0.783
                                                               0,788
                                      0,464
      0,823
              0,827
                       0,880
                               0,906
                                       0,936
                                               0,973
                                                       1.009
                                                                1,022
              1,056
      1,036
                       1,072
                               1,113
                                       1,139
                                               1,155
                                                       1,187
                                                                1,204
      1,276
              1,276
                       1,283
                               1,621
Номера кустов:
                 15
                               5
                                     19
                                           11
                                                  25
                                                        23
                                                                6
                         1
                                                  27
                                                        21
                  13
                         7
                              28
                                     16
                                           24
                                                               14
                               9
                  8
                                     12
                                           10
                                                        20
                                                                3
                         4
                                                  17
                 18
                         2
                              22
                                    26
Примечание: жирно выделены кусты для изучения в 2005 г.
                                                                                                     Таблица 4
                  Выделение "средних" и "крайних" фенотипов среди 6 кустов в 2005 г.
```

Средние: 29,3; 40,7; 3716,7 Сренеквадратичные отклонения: 13,7; 8,8; 1022,6 Коэффициенты вариации: 46,8; 21,8; 27,5 Обобщенные параметры: M = 164,280; VAR = 1701,227; CV = 36,378; 25,107; R = 0,624Ранжированные расстояния d_o: 0,741 0,826 0,689 0,764 1,163 4 2 6 Номера кустов: 1 3

Для ранжировки растений с учетом всей исходной информации о комплексах признаков был в свое время разработан биометрический метод d_0 , названный показателем типичности. Показатель типичности удобен при сравнении расстояний, оцененных по разным наборам признаков (табл. 2). При этом "расстояние" какого-либо растения от "центра" популяционного распределения признаков служит мерой типичности его в сравнении с условным растением, характеризующимся средними значениями признаков. Теоретически, минимально возможное значение d_0 , равное 0, достигается для того растения, значения всех признаков которого совпадают со средне-популяционными значениями. Практически растений, для которых d_0 = 0 или близко к 0, не обнаруживается. Генотипическая формула таких типичных растений, идентифицируемых по фенотипам, обычно соответствует в норме сортовой.

Для поддержания сорта Каберне-Совиньон необходимо размножить куст-протоклон 1 (d_0 = 0,69: побегов 44, гроздей 45, урожай 3,6 кг, масса грозди 80 г), а для его улучшения - куст-протоклон 5 (d_0 = 1,16: побегов 12, гроздей 24, урожай 3,0 кг, масса грозди 125 г) с тем, чтобы в целях обеспечения внутрисортовой стабильности в вегетативном потомстве оставить по одному на каждое направление селекции, а менее ценные забраковать. Более того, в вегетативном потомстве протоклон 1, отобранный в качестве типичного для селектируемого сорта, должен служить контролем к протоклону 5, который отбирался с целью повышения продуктивности сорта.

Достигнутые преимущества, т.е. высокая урожайность и ее выровненность, сохраняются при размножении в последующем вегетативном потомстве, что доказано практиками во всех виноградопроизводящих странах мира.

Особенно наглядно уменьшение изменчивости всего комплекса учтенных признаков при использовании обобщенного коэффициента вариации, учитывающего не только вариабельность отдельных признаков, но и степень их взаимосвязи [22]. По изученным биолого-хозяйственным признакам (табл. 4 и 5) обобщенные коэффициенты вариации для растений первого и второго отбора были, соответственно, 74,1% и 62,4%.

Известно, что любой направленный отбор, в том числе и по методу "ступенчатой" селекции, приводит наряду с увеличением выраженности селектируемого признака, также и к дисбалансу его с остальными. Так, например, при достижении урожайности 350 ц/га у сорта Рислинг и 500 ц/га у сорта Мюллер Тургау наблюдалось резкое падение качества сырья и возрастание степени поражения грибными болезнями [8]. Поэтому в последние годы наряду с отбором на продуктивность, клоновую селекцию винограда проводят еще и по комплексу других количественных признаков.

Этот подход означает выделение растений, отличающихся по совокупности признаков (и не только селектируемых) от остальных кустов данной совокупности. Однако методическая неразработанность затрудняла внедрение подобного подхода в практику виноградарства. Между тем биометрические методы выделения растений по комплексу количественных признаков в целом разработаны [7].

БИОМЕТРИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КЛОНОВОЙ СЕЛЕКЦИИ

Как показано выше, "ступенчатая" селекция увеличивает фенотипическую гомогенность отобранных растений по признакам продуктивности, в частности, урожаю с куста. Но это не означает их генетической однородности. Важнейшей задачей после (или во время) проведения "ступенчатой" селекции является выделение среди отобранных растений генетически отличных от базисного сорта, так называемых протоклонов, поскольку только они могут сохранить достигнутые отбором преимущества.

Нередко на протяжении многолетних наблюдений за выделяемыми растениями удается обнаружить среди них качественные генетически обусловленные вариации по маркерным морфологическим или биолого-хозяйственным признакам. В доказанных случаях клоны характеризуются отличающейся от базового сорта (культивара) осенней окраской листьев (Пино черный урожайный), более ранним созреванием урожая (Пино черный урожайный, Кокур красный, Долгий скороспелый), большей продуктивностью (Красностоп анапский, Мцване кумстевана), окраской ягод (Сильванер красный, розовый, синий), типом цветка (Мурведр женский, Матраса махровоцветковая), специфическим ароматом ягод (Траминер ароматико), большей рассеченностью листьев (Кокур белый петрушечный, Шасла рассеченная) и многими другими признаками [20, 24]. Мутации в этих и подобных случаях затрагивали гены, которые благодаря плейотропному действию приводили к качественному изменению ряда скоррелированных признаков.

Мутации на уровне целых хромосом - геномные - приводят к полиплоидии, т.е. удвоению их набора. Тетраплоидные формы винограда закрепляются в виде самостоятельных сортовых названий: Шасла гро Куляр белая или розовая, Кишмиш белый крупноягодный, Рислинг крупноягодный, Шабаш крупноягодный, Мускат александрийский крупноягодный и др. [25]. По фенотипу они резко отличаются от исходного сорта: мощные по росту, с укороченными междоузлиями, более крупными листьями, соцветиями и ягодами и др. Идентифицировать генотипы по фенотипам в таких случаях не представляет большой трудности.

Протоклон может быть выделен и по качественно измененным повторяющимся из года в год биологохозяйственным (культуральным) признакам. Например, дефекты цветка, усыхание соцветий, горошение ягод и сильный рост прямо указывают на генотипически обусловленную малоурожайность или бесплодность (при условии отсутствия поражения инфекционными заболеваниями); сильная рассеченность листьев и горошение ягод - "сигнал" низкоурожайной вариации; более интенсивная окраска ягод, лучшая их сахаристость и наличие в них возникших привкусов - свидетельство проявления положительной генотипической вариации. У протоклонов фенологические фазы могут проходить в другие сроки и т.д.

При отборе клонов по качественным морфобиологическим корреляциям (например, по осенней желтой окраске листьев у Пино черного урожайного, сопряженной с ранним созреванием ягод и высокой урожайностью клона) стоит задача улучшения сорта главным образом по одному селектируемому хозяйственно важному признаку. Но, как показал многолетний опыт селекционеров-виноградарей [1], отбор морфологически

измененных качественных вариаций оказывается в подавляющем большинстве случаев малоэффективным, т.к. они при вегетативном размножении, сохраняя изменения, оказываются менее продуктивными.

По сравнению с методикой отбора кустов по генотипическим вариациям, которые приводят к явным качественным морфобиологическим уклонениям от основной массы растений, отбор только по полигенным признакам (например, по высокой продуктивности и устойчивости к серой гнили) более длителен и сложен, но зато более эффективен [9]. Трудоемкость заключается в многолетней индивидуальной оценке стабильности проявления селектируемых признаков у большого числа выделенных кустов и их вегетативном потомстве. При этом отбор желаемых клонов требует тем больше времени, чем выше уровень урожайности насаждения в целом и однообразнее по этому показателю растения.

Следует отметить, что недооценка многими специалистами отбора высокопродуктивных клонов по вариациям количественных признаков отчасти вызвана еще и тем, что во многих случаях при вегетативном размножении отмечается снижение урожайности до уровня основного сорта. Такое происходит в тех случаях, когда в качестве клонов выделяются формы не с наследственными изменениями признаков, а лишь модификации, обусловленные неодинаковыми микроусловиями произрастания: влагообеспеченностью, механическим составом почвы, уровнем минерального питания, отсутствием конкурентоспособности соседних кустов, наличием выпадов, экологическим последействием стартовой мощности развития саженцев и кустов и др. Действительно, наблюдаемая фенотипическая изменчивость количественных признаков в границах сорта может быть полностью модификационной, если, например, сорт по сути есть вегетативно размноженная гибридизированная форма (Молдова, Подарок Магарача, Юбилейный Магарача и др.). Но она может включать и генетическую компоненту, если сорт представлен популяцией клонов (Мускат белый, Рислинг, Пино черный, подвойные сорта и др. [27]), а также быть обусловленной взаимодействием генотип-среда [28]. Именно в таких случаях идентификация генотипов по фенотипам особенно сложна.

Доказуемость генотипической обусловленности вариаций по наиболее важным количественным признакам во многих случаях весьма затруднительна. Рассуждения о полигенах как факторах, ответственных за количественную вариацию и происхождение этого типа изменчивости через медленное, но непрерывное накопление в них мутаций, не проявляющих себя в отдельности, не всегда принимаются. Тем не менее представления о полигенной обусловленности большей части количественной изменчивости представляются аргументированными [7]. Более того, успехи молекулярной генетики позволяют указать еще на одну возможную причину появления наследственных изменений - генетические элементы, способные мигрировать внутри генома и активизировать действие многих генов, в том числе детерминирующих проявление количественных признаков у растений [1]. Также и достижения биохимической генетики позволяют выявлять генетические маркеры, ассоциативно связанные со сдвигом ряда признаков у культурных растений [26]. Что же касается винограда, то успехи практики клоновой селекции принесли несомненные доводы в пользу существования генотипических вариаций количественной природы, не обязательно связанных с качественными морфологическими изменениями.

Можно полагать, что наследственно новые вариации могут отличаться от исходной популяции по большому числу количественных признаков, определяемых интегрированной системой генов. И если даже по каждому из признаков в отдельности эти отличия невелики, суммарно они могут быть выделены на основе анализа комплекса признаков. А именно это и требуется при отборе высокопродуктивных клонов, т.к. необходимо улучшение сорта по комплексу признаков урожайности, устойчивости к неблагоприятным условиям, периоду вегетации, сахаронакоплению и др. При этом следует ориентироваться на поиск растений, отклоняющихся от среднепопуляционных значений признаков, т.к. среди них более вероятно нахождение мутаций и редких комбинаций генов [7, 30, 31].

С целью выявления генетически новых высокопродуктивных клонов среди 5-6% выделенных на маточнике первичного отбора материнских кустов или среди всех изучаемых кустов на маточниках последующих отборов, и предложена методика, основанная на методах многомерного биометрического анализа изучаемого комплекса количественных признаков.

Важным условием для такого выявления мы считаем включение в анализ не только культуральных признаков (урожай с куста, сахаристость, линейный прирост, средняя масса грозди, кислотность и др.) но также и морфологических признаков, возможно и не связанных непосредственно с продуктивностью. Для растений это могут быть признаки листа, важность изучения которых показана в исследованиях на различных видах древесных и травянистых растений [32-34]. Поэтому нами последовательно изучалась метамерная, внутрисортовая и межсортовая изменчивость по 11 признакам листа, включающим линейные и угловые параметры.

Обязательным условием работы является сбор экспериментального материала по обоснованным методикам. В частности, в клоновой селекции как ветви ампелографии - по ампелографическим методикам. Экспериментальный материал может включать любые наблюдения, учеты и анализы, но обязательно их набор вписать в EXCEL-матрицы для "базы данных" [35, 36].

В работе по клоновой селекции на продуктивность привлечены морфологические и биолого-хозяйственные количественные признаки, внесенные покустно в матрицы исходных данных.

Необходимость привлечения комплекса признаков была вызвана тем, что количественные признаки взаимосвязаны между собой, и отбор по одному из них всегда ведет к изменению других признаков. Кроме того, виноград как многолетняя культура обладает экологическим последействием, в целом способствующим сохранению структуры темпоральной изменчивости анализируемых кустов. Но из-за наличия у винограда сильных взаимодействий генотип-среда, у отобранных растений может не быть высокой повторяемости каждого из признаков в отдельности (табл. 5-7). В то же время по комплексу признаков могут наблюдаться устойчивые закономерности [7].

Морфометрические данные листьев сорта Каберне-Совиньон

Номер листа	1	2	3	53	
Длина листа	17,0	18,0	18,0	18,9	
Ширина листа	17,0	23,0	19,0	18,6	
Длина черешка	12,0	21,0	15,0	12,5	
Длина средней жилки	11,0	14,0	13,0	13,5	
Длина верхней боковой жилки	11,0	17,0	11,0	12,0	
Длина нижней боковой жилки	7,0	12,0	11,0	9,0	
Верхнее добухтовое	6,0	7,0	6,0	7,3	
Нижнее добухтовое	5,0	7,0	5,0	7,7	
Угол альфа	145,0	129,0	115,0	136,4	
Угол бета	73,2	74,0	58,0	94,7	

Вариационный анализ измерений листьев сорта Каберне-Совиньон

Таблица 6

Признак	Среднее значение	Ошибка среднего	Средне- квадра- тичное	Дисперсия	CV	
Длина листа	17,9	0,2	1,38	1,8978	7,7	
Ширина листа	17,1	0,2	1,69	2,8699	9,9	
Длина черешка	13,1	0,3	2,17	4,6954	16,6	
Длина средней						
жилки	12,9	0,1	1,11	1,2451	8,6	
Длина верхней						
боковой жилки	11,2	0,2	1,65	2,7181	14,7	
Длина нижней	0	0.0	4.07	4 (007	45.0	
боковой жилки	8	0,2	1,27	1,6227	15,9	
Верхнее						
добухтовое	5,4	0,1	0,92	0,8527	17	
Нижнее						
добухтовое	4,8	0,1	0,83	0,6969	17,3	
Угол альфа	55,1	1,1	8,01	64,1548	14,5	
Угол бета	79,5	1,5	10,93	119,4264	13,7	

Таблица 7

Корреляционный анализ морфометрических данных листьев протоклона 1 сорта Каберне-Совиньон

Признак	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Длина листа	1										
Ширина листа	0,55	1,00									
Длина черешка	0,37	0,71	1,00								
Длина средней											
жилки	0,86	0,58	0,43	1,00							
Длина верхней											
боковой жилки	0,38	0,57	0,35	0,54	1,00						
Длина нижней											
боковой жилки	0,11	10,51	0,36	0,30	0,48	1,00					
Верхнее добухто	вое 0,4	120,48	30,52	0,41	0,28	0,01	1,00				
Нижнее добухтов	oe 0,3	40,45	0,37	0,37	0,43	0,35	0,60	1,00			
Угол альфа	-0,21	-0,44	-0,21	-0,18	0,03	-0,14	-0,16	0,04	1,00		
Угол бета	-0,05	-0,33	-0,25	-0,10	0,05	0,01	-0,21	0,11	0,67	1	

Отметим еще раз, что необходимым и важным звеном в отборе по комплексу признаков являются методы многомерной статистики, внедрение которых в практическую селекцию возможно лишь на базе ЭВМ.

МАРКИРОВАНИЕ ГЕНОТИПОВ ВИНОГРАДА

Как известно, прежде чем приступать к реализации клонового отбора, требуется установление генетической гетерогенности данной популяции винограда как совокупности протоклонов. Традиционным подходом к оценке гетерогенности является испытание по потомству [38]. Для многолетних культур эти подходы трудно реализовать из-за длительности межгенерационного периода.

Можно предложить оценку гетерогенности по данным одного поколения на основе сопоставления внутри- и межиндивидуальной изменчивости количественных признаков [7, 32, 34]. Для винограда мы рекомендуем использовать с этой целью 11 морфометрических признаков листьев, которые учитываются на каждом кусте, взятые с 9-12 узлов побегов. Например, по данным об изменчивости 50 растений сорта Каберне-Совиньон (5 листьев на растении) мы оценили долю межкустовой изменчивости ("эколого-генетическую компоненту") по всем 11-ти признакам. Поскольку данный экспресс-метод оценки гетерогенности является приближенным, устанавливая лишь "эколого-генетическую" компоненту общей фенотипической изменчивости, хотя работоспособность его в целом не вызывает сомнений, мы обратились к более совершенному методу тестирования генотипов. Надежность методов биохимической и молекулярной генетики, позволяющих идентифицировать генетические различия между растениями по спектру белков, ферментов, рестрикционных фрагментов и др., общеизвестна.

Это направление исследований на различных сельскохозяйственных объектах особенно интенсивно развивается в последние годы. Совместно с изложенными биометрическими подходами они решают проблему клоновой селекции и потому мы их активно внедряем в теорию и практику селекции винограда.

Выделение новых протоклонов винограда основано на использовании природного или созданного человеком генетического разнообразия. Для обнаружения, оценки и охраны этого разнообразия, отбора растений, несущих хозяйственно ценные признаки, и отслеживания этих признаков в процессе селекции и в семеноводстве используют легко распознаваемые фенотипические проявления генов - маркеры.

Издавна применяемые в этих целях морфологические и биохимические маркерные признаки указывают на особенности формы, окраски или биохимического состава растения. Число их не так уж и велико, к тому же полигенная структура многих признаков строения и состава растений ограничивает возможности генетического картирования агрономически важных генов и контроля над переносом этих генов в новые формы растений. Развитие методов молекулярной биологии, в частности, таких как рестрикционный анализ, полимеразная цепная реакция (ПЦР)- амплификация ДНК, сиквенс ДНК - определение последовательности ДНК привело к появлению нового класса молекулярно-генетических маркеров — фрагментов ДНК, соответствующих нуклеотидным последовательностям, входящих непосредственно в структуру агрономически важного гена или сцепленного с этим геном признака или их совокупности.

Высокая степень полиморфизма, характеризующая микросателитные ДНК-маркеры, позволяет использовать их в изучении генетического разнообразия виноградных клонов и сортов. В настоящее время ДНК-технологии широко используются для разработки методов управления потоком генетического материала (селекция с помощью молекулярно-генетических маркеров — MAS, в этих целях — картирование, маркирование главных генов количественных признаков — QTL; сохранение биоразнообразия с использованием молекулярно-генетических маркеров).

Использование маркеров - «сигналий», изменчивость которых связана с признаками, важными для селекционеров, началось с работ А.С. Серебровского (1926). В дальнейшем оказалось, что наиболее удобными маркерами являются полиморфные варианты белков (маркеры структурных генов) и фрагментов ДНК (различные участки структурных генов, анонимные последовательности ДНК).

На первом этапе велось изучение возможности использования ДНК-маркеров для оценки уровня полиморфизма между протоклонами и сортом Каберне-Совиньон с применением микросателлитных маркеров, что оказалось сложным делом: впервые в отечественном виноградарстве были использованы микросателлитные маркеры для оценки генетической дистанции между клонами и сортами винограда.

Объектом исследований послужили протоклоны винограда Каберне-Совиньон и его клоны 5A, 15, 14, 217, 169.

В процессе выделения ДНК были опробованы следующие методики: 1) СТАВ-метод (Doyle & Doyle, 1987) – ДНК не выделилась; 2) СТАВ-метод, модифицированный для винограда (Doyle & Doyle, 1990) – эта методика была модифицирована за счет использования NaCl, для удаления полисахаридов и PVP (polyvinylpolypyrrolidone), для удаления полифенолов – эта методика не обеспечила чистоты ДНК, соответствующей для проведения ПЦР; 3) при экстракции ДНК с использованием сорбента (siliki) получены образцы ДНК с чистотой, необходимой для проведения ПЦР.

Для анализа генетического разнообразия материала были отобраны 6 микросателлитных (SSR) маркеров, взятых в базе данных www. gramene. org: VrZAG62, VRZAG79, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2.

Полимеразная цепная реакция проводилась в реакционном объеме 25 мкл и включала воду для ПЦР, буфер, dNTP, P1, P2, ДНК, taq, масло и 40 нг ДНК. Концентрация ДНК предварительно проверена методом разведений и электрофорезом в 2% агарозном геле.

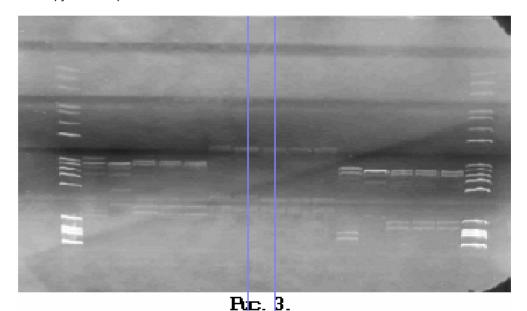
ПЦР была проведена по следующей программе: состоящую из одного шага денатурации (5 мин в 94°С), затем 40 циклов (30 сек при 92°С; 30 сек при отжиге температуры, расчетной приблизительно на 5°С меньше, чем теоретическая температура отжига на основе олигонуклеотидной последовательности и 1 минуты при 72°С). Заключительным шагом было удлинение при 72°С в течение 7 мин. Анализ продуктов ПЦР был выполнен электрофоретическим разделением в 8% полиакриламидном геле при напряжении 200 вольт в течение 3 ч. Образцы в геле окрашивали раствором бромистого этидия 5 мкг/мл в течение 30 мин и фотографировали в ультрафиолете. Для подсчета позиций образцов ДНК использовали программу gelpro3.2.

Аллельное разнообразие генотипов по микросателлитным маркерам

Сорт	5	15	14	217	169	Маркеры
193	189	189	191	191	191	Vrzag62
147	147	147	147	147	147	VVS2
178	174	174	178	176	180	Vvmd27
245	255	255	257	255	255	Vvmd5
251	251	251	251	251	251	Vrzag79
243	239	243	241	241	241	Vvmd7

Анализ данных табл. 8 показывает, что по маркерам VRZAG62, VVMD27, VVMD5 и VVMD7 клоны Каберне-Совиньона по размеру аллелей отчетливо различаются: их различия варьируют в пределах 2-12 пар нуклеотидов (пн). Это свидетельствует о наличии полиморфизма по вышеназванным микросателлитным локусам: проведение клоновой селекции сорта оказалось весьма успешным.

Наличие неодинаковых аллей по многим маркерам у большинства генотипов подтверждает генетические различия клонов в группе Каберне-Совиньон.



Разработанная методика отбора протоклонов винограда проверена также на сортах Мерло, Рислинг, Шардоне, Пино и др. Протоклоны размножаются методом ин витро. Часть из них в качестве клонов передана в Госсорткомиссию РФ. Их характеристики приведены в следующем разделе этого сборника.

ВЫВОДЫ И ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Клоновая селекция - действенный рычаг подъема урожайности, качества и повышения адаптивности сортов винограда - обычно проводится по международной схеме на протяжении 18-20 лет.

Исходя из опыта работы по традиционной схеме, предложен авторский подход к клоновой селекции, включающий новые элементы "ступенчатой" селекции на продуктивность и отбор высокоурожайных клонов по комплексу признаков. "Ступенчатая" селекция основана на ежегодном жестком отборе лучших кустов винограда из числа отобранных кустов в предыдущем году. В течение трех лет из 1000 анализируемых растений, например, производится отбор, последовательно, 250 и 25 лучших из них, и в конце - 2 протоклонов, характеризующихся высокой урожайностью, хорошей силой роста и оздоровленным состоянием кустов (без симптомов вирусных и бактериальных заболеваний), а также, что очень важно, стабильностью развития селектируемых количественных признаков.

Оставшиеся в третьем году отбора 25 кустов изучаются по полной ампелографической программе. Собранная информация заносится в матрицы исходных данных, которые обрабатываются на ЭВМ методом многомерной статистики.

С помощью показателя типичности d_o (программа обработки на компьютере имеется) выделяются кустыпротоклоны нетипичные (предположительно генетически новые варианты) и типичные по комплексу биологохозяйственных и морфологических признаков, которые затем ускоренно размножаются современными технологиями. Нетипичные протоклоны в качестве родоначальников служат основой улучшающей, а типичные - поддерживающей селекции. Причем, типичные растения являются также контролем к нетипичным.

Для гарантированности эффекта отбора протоклоны тестируются по ДНК ПЦР-анализом.

Разработанная методика отбора высокопродуктивных клонов, во-первых, в несколько раз сокращает длительность процесса клоновой селекции винограда, а во-вторых, значительно снижает объемы исследований. Все это в целом обеспечивает ее достаточную эффективность.

С помощью этой методики отобраны протоклоны сортов Каберне-Совиньон, Мерло, Пино белый, Рислинг, Шардоне и др. Их характеристики освещены в следующем разделе книги. Там же описаны сорта винограда, представляющие «целину» клоновой селекции.

Литература

- 1. А.с. № 1417842 СССР, МКИ А 01 H 1/04, А 01 G 17/00. Способ клонового отбора винограда по комплексу признаков / Л.А.Животовский, Л.П.Трошин, В.А.Драновский и др. Заявка № 3998394: от 27.12.1985. Зарег. 22.04.1988, опубл. 23.08.1988. Бюл. 1988. № 31.
- 2. Вердеревская Т.Д., Маринеску В.Г. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда. Кишинев: Штиинца, 1985. 311 с.
- 3. Глотов Н.В. Оценка генетической гетерогенности природных популяций: количественные признаки // Экология. 1983. № 1. С. 3-10.
- 4. Голодрига П.Я., Суятинов И.А., Трошин Л.П. Современные вопросы клоновой и генетической селекции винограда // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. т. 54, вып. 2, Л., 1975. С. 101 112.
- 5. Голодрига П.Я., Трошин Л.П. Исследования по установлению взаимодействия генотип-среда у многолетних растений // Генетика количественных признаков сельскохозяйственных растений. М.: Наука, 1978. С. 116-128.
- 6. Голодрига П.Я., Трошин Л.П., Титов А.П. Современное состояние виноградарства и селекция винограда в ФРГ // Виноделие и виноградарство СССР. 1979 № 4. С. 34-36.
- 7. Драновский В.А., Трошин Л.П. Массовая и фитосанитарная селекция необходимость современного виноградарства // Виноград и вино России. 1995.
 - No 4. C. 20-23
- 8. Животовский Л.А. Интеграция полигенных систем в популяциях. М: Наука, 1984. 183 с.
- Животовский Л.А. Обобщенные показатели популяционной изменчивости по совокупности количественных признаков // ДАН СССР. 1980. Т. 260,
 6. С. 1459-1462.
- 10. Звягин А.С., Трошин Л.П. Паспортизация сортов и клонов винограда // Материалы шестой региональной научно-практической конференции молодых ученых "Научное обеспечение агропромышленного комплекса". Краснодар, 2004. С. 116-117.
- 11. Идентификация видов, сортов и клонов винограда по белкам как маркерам генов: (Методические указания) / В.И.Клочнева, Л.П.Трошин, А.В.Шурхал и др.; ВАСХНИЛ. М., 1990. 35 с.
- 12. Кендалл М., Стьюарт А. Многомерный статистический анализ и временные ряды. М.: Наука, 1976. 736 с.
- 13. Клоновая селекция в Раушедо (Италия). Проспект. Пер. с. итал., 1985. 13 с.
- 14. Клоновая селекция винограда. Под ред. М.С. Журавля. Кишинев: Штиинца, 1977. 152 с.
- 15. Клоновое улучшение сорта Рислинг / Л.П.Трошин и др. // Виноделие и виноградарство СССР. 1978. № 7. С. 26-30.
- 16. Клоны белых сортов винограда в центральной зоне Краснодарского края и перспективы использования их в виноделии / Т.И.Гугучкина и др. // Новации и эффективность производственных процессов в виноградарстве и виноделии. Т. І. Виноградарство. Краснодар, 2005. С. 98-104.
- 17. Методика изучения генофонда винограда по унифицированным матрицам для создания "банка данных" / П.Я. Голодрига, Н.П. Дубовенко, Н.Г. Нилов. Ялта, 1983. 12 с.
- 18. Методические рекомендации по массовой и клоновой селекции винограда / П.Я. Голодрига и др. Ялта, 1976. 31 с.
- 19. Рисованная В.И., Трошин Л.П. Характеристика видов и сортов рода Vitis с использованием молекулярно-генетических маркеров // Молекулярно-генетические маркеры и селекция растений. Киев, 1994. С. 56.
- 20. Рисованная В.И., Трошин Л.П., Фролова Л.И. Гетерогенность высокопродуктивных клонов Муската белого по спектрам изоферментов // Молекуляр.-генет. маркеры растений. Киев, 1996. С. 32-33.
- 21. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. М.: Наука, 1985. 272 с.
- 22. Солдатов П.К. Вегетативная изменчивость растений винограда и ее значение в селекции. Ташкент: Узбекистан, 1984. 150 с.
- 23. Топалэ Ш.Г. Полиплоидия у винограда. Кишинев: Штиинца, 1983. 215 с.
- 24. Трошин Л.П. Компьютерный сервис в селекции винограда // Мат. обеспечение и компьютерный сервис в селекции растений. Тверь, 1991. С. 42.
- 25. Трошин Л.П. Методология клоновой селекции винограда // Формы и методы повышения экономической эффективности регионального садоводства и виноградарства. Организация исследований и их координация. Часть 2. Виноградарство. Краснодар, 2001. С. 92-94.
- Трошин Л.П. Методы отбора по комплексам признаков в селекции винограда // Методы отбора по комплексам признаков в селекции растений / АН СССР. УОГиС им. Н.И.Вавилова. ВНИИВиПП "Магарач". - Ялта, 1989. -С. 119-121.
- 27. Трошин Л.П., Животовский Л.А. Методические рекомендации по клоновой селекции винограда на продуктивность / ВНИИВиПП "Магарач". Инт общей генетики им. Н.И.Вавилова. Ялта, 1987. 36 с.
- 28. Трошин Л.П., Суятинов И.А., Грамотенко П.М. Состояние и задачи ампелографии и клоновой селекции винограда //Виноделие и виноградарство СССР. 1980. № 8. С. 42-45.
- 29. Федоров Ю.К., Трошин Л.П., Адибеков О.В. Програмное обеспечение ЭВМ для анализа селекционной информации //Формы и методы повышения экономической эффективности регионального садоводства и виноградарства. Организация исследований и их координация. Часть 2. Виноградарство. Краснодар, 2001. С.123.
- $30.\,Atti$ del Simposio internazionale sulla selezionale clonale dell vite. C.N.R., 1981. $399\,s.$
- 31. Schoffling H. Die Klonenselektion bei Ertragrebsorten. Ingolstadt, 1984 (Nachdruch). 24 s.

Опубликовано в сборнике:

ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ЭЛИТНОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА И ВИНОГРАДНОЙ ПРОДУКЦИИ, ОТБОРА ЛУЧШИХ ПРОТОКЛОНОВ ВИНОГРАДА

(РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ ВИНОГРАДАРСКИХ ХОЗЯЙСТВ КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ)

Под общей редакцией профессора Л.П. Трошина КРАСНОДАР-2005