

Институт садоводства. виноградарства и виноделия

На правах рукописи

Вашакидзе Лариса

**Научные основы идентификации генотипов грузинского
винограда и оптимизации некоторых фитотехнических
мероприятий**

06.01.08 – виноградарство

А в т о р е ф е р а т

**представленный на соискание учёной степени
доктора сельскохозяйственных наук**

**Тбилиси,
2006**

Работа выполнена в институте садоводства, виноградарства и виноделия

Научный консультанты: П.П. Наскидашвили
Академик АСХН Грузии, член-кор.Нац.АН Грузии, заслуженный
деятель науки, Лауреат Государственной Премии, доктор с/х
наук, профессор;

Н. С. Чхартишвили
Академик АСХН Грузии и Международной Академии
Виноградарство и Виноделия, профессор.

Официальные оппоненты: Ортоидзе Т.В.
Доктор с./х. наук

Шатиришвили А. Ф.
Доктор биолог. наук, профессор

Самадашвили Ц. Ш.
Доктор с./х. наук, профессор

Защита диссертации состоится “-----” ----- 2006 г., в 12 часов на заседании
диссертационного совета (Агр. 06.08 №8) в институте садоводства, виноградарства и
виноделия.

Адрес: 0159, Тбилиси, проспект Маршала Геловани, 6.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института СВиВ Грузии.

Автореферат разослан “----“ сентября 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
канд. биолог. наук

(Патарая М.)

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

Актуальность темы – Кавказско-переднеазиатский центр является «самым древним, богатым и интересным очагом происхождения культурных растений. Кавказ – это лаборатория, где в течении тысячелетий в результате деятельности человека протекал процесс формообразования, создавался и формировался драгоценный фонд культурной флоры» [Вавилов Н. И., 1927; Жуковский П. М., 1971].

Природа Грузии одарила нас, а грузинский народ на протяжении веков сохранил и усовершенствовал 525 аборигенных сортов винограда, которые локализованы в отдельные этногеографические группы, носят множество доминантных генов и представляют наилучший генетический и селекционный исходный материал для создания широкого спектра новых сортов.

На современном этапе развития виноградарства, согласно требованиям Института генетических ресурсов растений (IPGRI), для успешного использования в научных и хозяйственных целях различных сортов винограда, а также прогнозирования ожидаемых результатов, необходимо наличие полноценной информации о генотипе сорта; знание наследуемости и изменчивости фенотипических признаков не только на организменном, но также на клеточном и молекулярном уровнях; исследование по биохимическим маркерам чувствительности к биотическим и абиотическим стрессам, т.к. ряд высокоценных хозяйственных признаков под влиянием факторов внешней среды подвергается сильной модификационной изменчивости, и определение степени наследуемости данных признаков в вегетативном поколении связано с большими временными и финансовыми затратами.

414 грузинских сортов винограда на организменном уровне в разное время достаточно хорошо изучены исследователями: Ф. Коленати, В. Старосельским, Д. Табидзе, М. и Р. Рамишвили, Н. Чахнашвили, Ф. Кварацхелия, Ф. Давитая, Н. Церцвадзе и др. и опубликованы в виде капитальных трудов и ампелографий, что нельзя сказать о исследованиях фенотипических признаков на клеточном уровне, их количество весьма незначительно и представлено крайне обособлено. Таким образом, для идентификации сорта и предварительного прогнозирования ожидаемых результатов на сегодняшний день остается актуальным исследование соответственно дескрипторам винограда (*Vitis* ssp., 1997), для каждого сорта в отдельности - характеристик клетки, выявление признаков большого постоянства и незначительной изменчивости и моделирование таких тест-систем, которые с успехом могут быть использованы как с теоретической, так и практической точки зрения. В частности, дадут возможность в сжатые сроки и с минимальными затратами прогнозировать в вегетативном поколении высокоурожайных клонов характер наследования хозяйственно-ценных признаков; установить идентичность полученных саженцев с использованием биологически активных веществ; подобрать для функционально женских сортов наилучшие опылители; установить резистентность грузинских сортов винограда по отношению к стрессорным антропогенным факторам; провести мониторинг на сохранение чистоты грузинского генофонда; разработать теорию и практику размножения и морфогенеза на организменном уровне и *In vitro* и многие другие вопросы, которые будут основой вопросов оптимизации фитотехнических мероприятий винограда.

Цель и задачи исследования - исследование на клеточном и организменном уровне наследственности и изменчивости фенотипических признаков грузинских генотипов винограда согласно требованиям дескрипторов; для предварительного прогнозирования ожидаемых результатов создание базы данных; моделирование тест-системы для идентификации в сжатые

сроки сорта и высокоурожайных клонов; оптимизация мероприятий по размножению винограда и для подбора наилучших опылителей для функционально женских сортов винограда.

Достижение намеченной цели предусматривает:

1. Исследование цитологических, палиноморфологических и анатомических критериев для выявления признаков большого постоянства и незначительной изменчивости, разработка тест-систем для идентификации грузинских генотипов винограда;
2. Кластерного анализа критериев меристемных клеток, пыльцевых зёрен, нижнего эпидермиса листа грузинских генотипов винограда;
3. С использованием разработанных тест-систем: исследование высокоурожайных клонов; изучение устойчивости грузинских генотипов винограда к антропогенным факторам; испытание некоторых биологически активных веществ в качестве стимуляторов и установление идентичности полученных с их использованием саженцев;
4. Изучение процессов опыления и плодообразования грузинских генотипов винограда;
5. На примере Тавквери, подбор научно обоснованного наилучшего опылителя для функционально женских сортов винограда;
6. Установление режимов культивирования и подбор питательных сред для микрочлонарного размножения *In vitro*;
7. Установление закономерности получения селекционного материала в сжатые сроки с использованием методов индуцированного мутагенеза и *In vitro*;
8. Составление базы данных сорта Горула и клона №21;
9. Разработка простейшего метода для анатомического исследования сортов и форм;
10. Обобщение полученных результатов, разработка научно-обоснованных рекомендаций для исследователей и практиков виноградарей.

Научная новизна работы. Впервые в практике виноградарства, согласно дескрипторам винограда, изучены: критерии меристематических клеток, пыльцевых зёрен, нижнего эпидермиса листа грузинских генотипов винограда, роль происхождения в фенотипической изменчивости допущенных к распространению сортов; кариология; цитогенетика в митозе и мейозе; разработана тест-система для идентификации сортов и форм.

С использованием тест-системы исследованы:

- высокоурожайные клоны Горула, Цицка, Цоликоури, Крахуна и Оцханури Сапере, выделенные из грузинского генофонда;
- устойчивость грузинского генотипа винограда к повышенной концентрации тяжёлых металлов в почве Квемо Болниси, Хатисопели. Целесообразность использования продукции полученной в этой местности:

_ для получения цитогенетически идентичного саженца в качестве биостимуляторов испытаны полученные из отходов виноградной лозы и винограда экологически чистые лигнин-кремниевые и лигнин-полисахаридные комплексные препараты: ЛКП-1, ЛКП-2 и №1.

_ исследована цитогенетическая идентичность саженца, полученного с использованием биоактиватора биораг.

_ Проведен: кластерный анализ критериев меристематических клеток, пыльцевых зёрен, аппарата устьиц нижнего эпидермиса листа. Составлены дендрограммы.

_ Изучен: тип опыления грузинских генотипов винограда и процесс плодообразования; выявлено аддитивное воздействие само- и перекрестноопыления, характерное для грузинских сортов.

– Опираясь на цитологические исследования, для нормального протекания процесса опыления-оплодотворения и обеспечения высокого и качественного урожая, на примере Тавквери, для функционально женских сортов составлена модель подбора наилучшего сорта-опылителя.

– Исследовано: в грузинских сортах Горула и Будешури цители чувствительность к различным дозам Cs-137 и этиленмина; возможность их использования для получения широкого спектра генетически изменённых растений.

– Для микроклонарного размножения винограда In vitro и получения цитогенетически идентичного микроклона исследована модифицированная питательная среда и установлен режим культивирования; на культивированных эксплантах исследованы токсичность и цитогенетический эффект биологически активных веществ, входящих в питательную среду.

– Соответственно требованиям дескрипторов винограда изучены на клеточном уровне допущенные к распространению сорта винограда, при этом, количественные и качественные признаки кодированы, оценены и составлена база данных для сорта Горула и клон №21, которые будут внесены в европейскую базу данных Vitis.

– Разработан простой метод для исследования эпидермиса листа сортов и форм.

Практическая ценность исследования и реализация – Получен богатый экспериментальный материал по стабильности и изменчивости фенотипических признаков грузинских генотипов винограда, имеющий огромное значение как с хозяйственной точки зрения, так и для научной целей, при предварительном прогнозировании ожидаемых результатов в ходе реализации сорта, при составлении паспорта и монографии.

Из грузинских генотипов, исследованных по дескрипторной программе один сорт и его клон размещены в базу данных Vitis.

Установлена роль генотипа и места происхождения в фенотипической изменчивости допущенных к распространению сортов; выявлены признаки большого постоянства и незначительной изменчивости, имеющие ампелографическую, хозяйственную и научную ценность. Для идентификации генотипов грузинского винограда разработана тест-система, практическая значимость которой состоит в осуществлении мониторинга с целью защиты чистоты грузинского генофонда в связи с загрязнением антропогенными факторами биосферы и, своевременного удаления из виноградников отрицательных клонов; выявлении токсического влияния на грузинские генотипы винограда факторов-загрязнителей и их генетической активности; исследовании в сжатые сроки типов наследования признаков у клонов с высокими хозяйственными признаками, выделенных из грузинского генофонда винограда, и др.

Кластерным анализом показателей клеточных критериев грузинских генотипов винограда подтверждается правомочность классификации грузинскими ампелографами проф. Д. Табидзе и Н. Церцвадзе Рача-Лечхумского сорта Цулукидзис тетра по морфологическим признакам в группу Ркацители, его грузинское происхождение и распространение из Грузии в Европу.

– С использованием тест-системы установлено:

- наследование в поколениях хозяйственно ценных признаков высокоурожайных клонов Горула №21, Цицка №1298, Цоликоури №1093, Крахуна №1170 и Оцханури сапере №1260; и целесообразность их размножения.
- биостимуляторная природа лигнин-кремниевых комплексов экологически чистых препаратов ЛКП-1 и ЛКП-2 и лигнин-полисахаридного препарата №1, полученных в результате переработки отходов виноградной лозы и винограда, показана целесообразность их применения для получения высококачественных генетически идентичных саженцев;

- положительный эффект воздействия на цитогенетику клетки биоактиватора Биорага, и перспектива его использования для получения генетически идентичных привитых саженцев;
- устойчивость грузинских генотипов винограда Ркацители, Саперави, Тавквери и Картлис тита к повышенным концентрациям тяжёлых металлов в почве Хатисопели Болнисского р-на, безопасность использования полученной там продукции.

– В результате изучения типа опыления и плодообразования грузинских генотипов винограда установлено аддитивное воздействие само- и перекрёстного опыления на плодообразование, ведущая роль самоопыления. В сортах Ркацители и Цулукидзис тетра зафиксировано явление клейстогамии, а в клоне Горула №21 - не совсем характерное для винограда полиэмбрионии – развитие двух растений из одного семени; из поры пыльцевых зёрен выход разветвлённой трубки; в функционально женских сортах: Тавквери, Асуретули шави, Сапена и Базалетури наличие фертильных пыльцевых зерен, в условиях самоопыления возможность частичного оплодотворения своей пылью и реальность поиска в насаждениях винограда таких клонов, соцветия которых в большом количестве содержат двуполые цветы, что исключает целый ряд сложностей и расходов, связанных со смешанными насаждениями или искусственным опылением. Но до выделения таких клонов из виноградников, опираясь на цитологические исследования, на примере Тавквери, для функционально женских сортов составлена модель подбора наилучших опылителей: совпадение фаз цветения сортов опылителей и опыляемых → палиноморфологическое исследование → восприимчивость рылец цветков → прорастание пыльцевой трубки в столбике → оплодотворение и плодообразование → механический анализ полученных ягод и гроздьев, что будет предусмотрено в схеме посадки новых виноградников.

– С использованием метода индуцированного мутагенеза для получения селекционного материала выявлена доза и экспозиция Cs-137 и ЭИ; разработаны закономерности получения широкого спектра генетически различных растений.

– Для морфогенеза растения в условиях *In vitro* подобраны питательные среды и определены оптимальные условия для культивирования виноградных сортов и размножения уникального селекционного материала; выявлены питательные среды для получения широкого спектра генетически различных растений регенерантов

– Полученные автором результаты исследования будут использованы для индуцирования и идентификации в сжатые сроки новых селекционных форм винограда, для осуществления мониторинга на цитогенетику генофонда виноградной лозы, а научно-обоснованные лучшие сорта-опылители для получения высокого и качественного урожая, для составления рациональной схемы посадки виноградников; для палинологического изучения материалов археологических раскопок.

Достоверность полученных результатов – подтверждена многократными математическими анализами и применённым методом математической статистики.

Апробация работы – материалы диссертации апробированы на нескольких десятках научных форумов, среди них: на международ. заседаниях – Химический мутагенез [Москва – 1979-1985], на международ. симпозиуме – половые процессы и эмбриогенез [Москва, 1973], на Закавказской конференции – Виноградарство, виноделие и субтропические культуры [Ереван, 1973], на Молдавской Республиканской конференции [Кишинёв, 1974], на II научной конференции учёных-биологов [Тбилиси, 1976], на III, IV, V съездах общества Грузинских генетиков и селекционеров [Тбилиси, 1977, 1981, 1986], на III, IV, V, VI съездах международ. общества генетиков и селекционеров [Ленинград, 1977; Кишинёв, 1981; Москва, 1986; Минск,

1992], на международ. заседании по древесным растениям [Махарадзе – Анасеули, 1979], на I и II международ. заседании по вопросам генетики развития растений [Ташкент, 1980; Ташкент, 1990], на международ. заседании – “Продуктивность субтропических культур” [Махарадзе – Анасеули, 1982], на научно-практической конференции Чечено-Ингушетии [Грозно, 1982], на заседании молодых научных сотрудников [Одесса, 1982], на международ. заседании – Вопросы опыления-оплодотворения растений [Ленинград, 1985], на международ. конференции – Селекция винограда [Кишинёв, 1987], на международ. научной конференции – посвящённой 100 летию Н. И. Вавилова [Тбилиси, 1987], на международ. конференции – Биология культивированных клеток и биотехнология [Новосибирск, 1988]; на научно-технической конференции [Тбилиси, 1984], на симпозиуме – вопросы морфологии растений [Тбилиси – Веджини, 1990], на научной сессии – посвящённой 90-летию со дня рождения акад. Н. Хомизурашвили [Тбилиси, 1990] на симпозиуме – Вопросы цитозембриологии растения [Италия – Вила, Олмо, Комо, 1990], на научно-практической конференции – Генофонд сель. хоз. растений и животных; изучение, защита, применение [1994], на международ. научной конференции [Тбилиси, 1997], на международной научной конференции, посвящённой 110-летию со дня рождения проф. Декапреловича [Тбилиси, 1997], на международной конференции, посвящённой актуальным вопросам виноградарства и виноделия [Ялта, 2003].

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 274 печатных на компьютере страницах; содержит: общую характеристику научно-исследовательской работы, введение, экспериментальную часть, 54 таблиц, 11 диаграмм, 18 фотографий, 69 микрофотографий, к каждой главе прилагается литературный обзор, выводы, рекомендации и список цитированных литературных источников, 69 грузинских и 179 зарубежных.

Публикации. Материалы диссертации опубликованы в 66 научных трудах.

Основное содержание диссертационной работы

Введение

Кратко обзревается исторические и этнографические материалы о грузинском винограде, о его месте в очагах формообразования культурных (*Vitis vinifera* ssp. *sativa* D.C.) сортов винограда, классифицирование; значительные работы, касающиеся консервации, изучения и обогащения грузинского генофонда осуществлённые за последние годы; направления приведённых в диссертации исследований, необходимость их проведения и перспектива в теории и практике виноградарства.

Экспериментальная часть

а) объект исследования, место проведения опытов и методика исследования

Объект исследования – допущены к распространению согласно закону Грузии о винограде и вине 25 аборигенных; 8 диких и один одичавший сорт и форма винограда, 5 высокоурожайных клонов и 3 гибридных сорта, выведенных научной селекцией

Место проведения исследований – Грузинский научно-исследовательский институт садоводства, виноградарства и виноделия, лаборатория цитогенетики; лаборатория тканевых культур Института физиологии РАН; экспериментальные базы НИИСВиВ в Вашлиджвари и Галавани.

Методика исследований – виноградарстве [Лазаревский, 1946; Простоведов, 1946; Негруль, 1958; Методические указания по селекции винограда 1974; Церцвадзе, 1983;

Рамишвили, 1986] в генетике [Дубинин, Щербаков, 1965; Немцева, 1970] в цитологии [Прозина, 1987; Паушева, 1988; Автандилов, 1990], In vitro - методика культивирования клеток и тканей [Бутенко, 1966] и современные дескрипторы виноградной лозы (*Vitis* ssp., 1997).

Исследования проводились на клеточном и организменном уровнях.

На клеточном уровне изучались:

критерии клетки меристемы – параметры (длина, ширина, диаметр ядра), морфология хромосом, число хромосом, ploидность; активность клеточного деления, цитогенетика митоза и мейоза, частота аберрантных клеток и спектр аббераций.

Критерии пыльцевого зерна: параметры и морфология (длина и ширина в воздушно-сухом состоянии, а диаметр – в ацетокармине), пористость, степень оплодотворения и прорастаемости на искусственных питательных средах и в естественных условиях на рыльце, продолжительность жизнедеятельности.

Критерии нижнего эпидермиса листовой пластинки: на временных препаратах, приготовленных по методике отпечатков [Hill, Khicli, Rundol, 1984] и нашей [Вашакидзе, 2000], на 50 парах устьиц изучалось: количество устьиц на единицу площади (1мм²) листовой пластинки, параметры (длина, ширина), количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц.

Тип опыления и процессы плодообразования в грузинских генотипах винограда изучались по следующей схеме: самоопыление, свободное опыление, апомиксис.

В варианте самоопыления, за две недели до цветения, проводили изолирование 20-30 соцветий, и после окончания цветения, через две недели, учитывали количество завязавшихся ягод, устанавливали % плодообразования. В варианте свободного опыления, также на 20-30 соцветиях за две недели до и после окончания цветения учитывали количество бутонов и завязавшихся ягод. В обоих вариантах после сбора урожая было определено количество безсеменных ягод, ягод с 1, 2, 3, 4 и более семенами.

С целью изучения склонности к апомиксису, в изолированных за две недели до цветения соцветиях, за 5-6 дней до цветения проводили кастрирование цветков. Через две недели после цветения проводили учет завязавшихся ягод. Экспериментальные данные трех вариантов были сопоставлены и установлен тип опыления.

Для функционально женских сортов винограда (Тавквери, Асуретули шави, Сапена, Базалетури) на примере Тавквери проводился подбор научно-обоснованного опылителя на клеточном уровне. Изучалась восприимчивость рыльцев цветков к различным сортам пыльцевого зерна. Спустя 24 часа после опыления, в течение 5 дней, на зафиксированном материале учитывалось количество проросших пыльцевых зерен, влияние прошедшего после опыления времени и генотипа на показатели завязывания ягод.

Контролем были взяты свободноопыленные и зафиксированные в то же время цветки.

На организменном уровне – на соцветиях учитывалось количество завязавшихся ягод. Определялся урожай на одном кусте. Путем взаимосоопоставления данных, полученных на клеточном и организменном уровнях, были выявлены наилучшие сорта-опылители.

Испытание в качестве биостимуляторов экстрактов, полученных из отходов виноградной лозы и винограда проводилось на черенках с 2-3 глазками по следующей схеме: лигнин-кремниевые комплексные препараты ЛКП-1 и ЛКП-2 (автор М. Бежуашвили) были испытаны на сортах Ркацители, Горули мцване, Чинури, Хетура; концентрации экстрактов – 1, 2 и 3 г/л, экспозиция – 48 часов; по 15 повторов. Контроль – обработанные и необработанные в водных растворах сырьё и помещенные в воду черенки.

Препарат – лигнин-полисахаридный комплекс №1 (авторы Л. Муджири, Е. Калатошвили). Сорта: Ркацители, Горули мцване, Тавквери, Картлис тита. Концентрации –

1/10; 1/15; 1/20; 1/30; 1/40. Экспозиция - 24, 48 и 72 часа, повторность – 15-15. Контроль – экстракт (без гидролиза), черенки, помещенные в воду.

На черенках, обработанных вышеуказанными тремя препаратами, фиксировалось время развития корневой системы, интенсивность. Для определения идентичности саженцев проводилось цитогенетическое исследование меристематических клеток.

Для получения селекционного материала в сжатые сроки инцухтированные и стратифицированные семена (по 200 штук) сортов винограда Горула и Буденшури цители обрабатывали 6 дозами Cs-137 (40,60, 80, 100, 150, 200 Гр, мощность – 5,50 Гр/мин) и этиленимином (4 концентрации – 0,05-0,1-0,3-0,5%; экспозиция – 24 часа). Контроль составили необработанные семена в том же количестве. Часть семян высевалась в парниковых условиях. Учитывали всхожесть и количество выживших семян. Изучалась морфогенетика; часть семян прорастала в лабораторных условиях в термостате при температуре 28-30⁰С. Материал фиксировался, окрашивался и изучался под микроскопом.

Для микроразмножения растений In vitro базисом были использованы разработанные в лаборатории культуры тканей Института физиологии растений РАН [Бутенко, 1966] и модифицированные нами [Вашакидзе, 1975] методы..

Для морфогенеза и микроразмножения растений из изолированных эксплантатов, при подборе питательных сред и разработке режима выращивания, 2-3-х см-вые эксплантаты высевались на питательную среду M&S в 10 вариантах. Состав среды 8 вариантов был постоянным (макро- и микросоли по M&S, соответственно, 100 мл/л и 1 мл/л; витамины Уайта 1 мл/л; мезоинозит – 100 мг/л; сахароза -20 г/л и агар – 8 г/л), менялись только биологически активные вещества и их количества, что, соответственно подварианту составляло 1, 2, 3 мл/л кинетина, феруловой к-ты, 2,4-дихлор-феноксисукусную к-ту 0.2; 0.3 и 0.5 мг/л. В 9-м варианте добавлялись Fe-хелаты – 5 мл/л, цистеин – 30 г/, ИУК – 1 мг/л, бензаденин – 0.2 мг/л, сахароза – 30 г/л.. Десятый вариант служил контролем, куда входили макро- и микроэлементы M&S, витамины (Уайта), сахароза, мезоинозит и агар в том же количестве, что и в первых 8 вариантах.

Культивация изолированных эксплантатов протекала в культивационной комнате при температуре 26-27⁰ С, фотопериоде – 16 часов, освещении – 6000-8000 люкс, 8 часов темноты в условиях 20-22⁰ С температуры и относительной влажности воздуха - 70-75%.

На культивируемых эксплантатах учитывалось начало органогенеза, количество полученных растений-регенерантов; изучалась активность деления меристематических клеток растений-регенерантов, хромосомная и геномная изменчивость и др.

Анализ на клеточном уровне проводился на микроскопах МБИ-3; МБИ-6 и PZO. Для микрофотографирования использовалась фотопленка «Микрат-200».

Полученные данные обрабатывались методами математической статистики [Доспенхов, 1986; Рокицкий, 1967; Лакин, 1990]. Достоверность данных определялась с точностью $p < 0.05$; 0.01; 0.001; кластерный анализ проводился с использованием SPSS^R статистического программного пакета по методу Бююля и Цефеля [2002].

б) Результаты исследования

Глава I.

Разработка тест-систем идентификации грузинских генотипов винограда

Культурные сорта винограда (*vitis vinifera* ssp. *sativa* D.C.) гетерогенны, характеризуются сильным полиморфизмом; некоторые ценные хозяйственные и селекционные признаки под влиянием окружающей среды подвергаются сильным модификационным изменениям, из-за

чего их прогнозирование в поколениях только по внешним фенотипическим признакам осложнено.

Исходя из вышесказанного, по дескрипторам, составленным Международным институтом генетических ресурсов растений (IPGRI) для 80 сельскохозяйственных культур, и среди них - для винограда, при получения полноценной информации о сорте, обязательным условием является исследование растений комплексно, по морфологическим, цитологическим и молекулярным маркерам.

1. Цитологические характеристики

Критерии клеток. Меристематические ткани корней грузинских генотипов винограда характеризуются маленькими клетками различной величины; длина 16.1 ± 0.3 – 19.7 ± 0.3 мкм, ширина – 11.6 ± 0.3 – 15.0 ± 0.2 мкм, и диаметр ядра 4.2 ± 0.1 – 6.0 ± 0.1 мкм.

Максимальными показателями характеризуются длина клетки сорта Муджуретули (19.7 мкм); ширина сорта Цицка (15.0 мкм) диаметр ядра – Горули мцване и Цулукидзис тетра (5.9-6.0 мкм); а минимальными показателями - длина (16.1 мкм) и ширина (10.0 мкм) сорт Тавквери; диаметр ядра Оджалеши (4.2 мкм), остальные сорта занимают промежуточное место между ними.

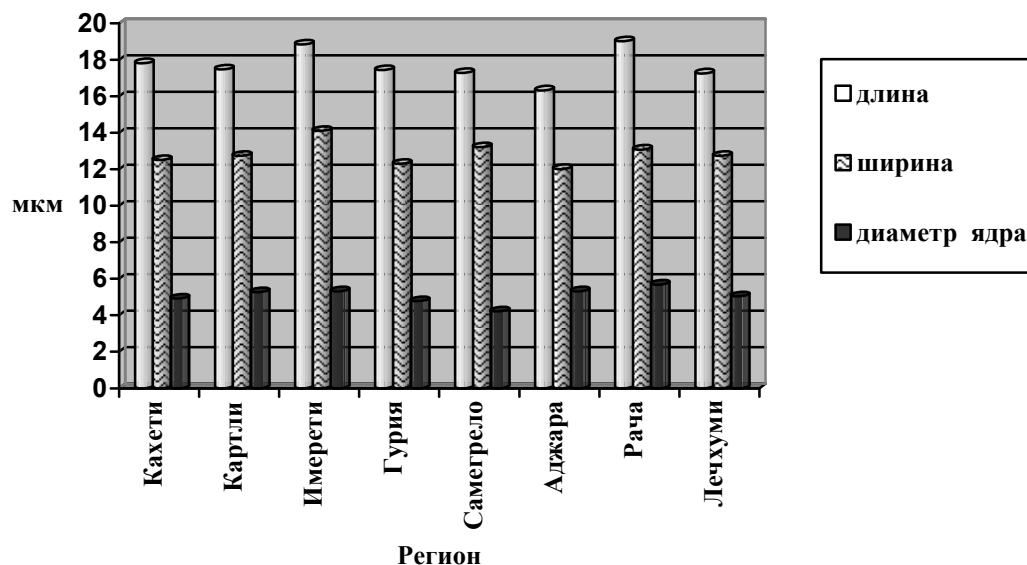
Данные показатели по коэффициенту вариации – мало изменяющиеся признаки, имеют ампелографическую ценность и могут быть использованы маркерами при идентификации сорта.

Существующая между критериями клеток разница наблюдается и по регионам. Максимальные параметры – длина (19.7) мкм, ширина (14.1 мкм) и диаметр ядра (5.7 мкм) характерны для сортов винограда регионов Рача и Имеретии, а минимальные – для сортов Аджарского региона, сорта остальных регионов занимают промежуточное положение между ними (диаграмма 1).

Плоидность. Существующими исследованиями хромосомное число вида, сорта и форм постоянно и оно остается неизменным в онтогенезе и филогенезе [Sundarson. Ray, Seethaih, 1973; Nazra, Sharma, 1970; Топалэ, 1983 и др.].

В результате кариологического изучения районированных аборигенных, культурных, а также полученных научной селекцией гибридных сортов винограда, клонов, некоторых диких и одичавших сортов и форм, установлено, что хромосомный комплекс их клеток диплоиден ($2n=38$), хотя выделенные среди них селекционерами: В.Гоциридзе, В.Лоладзе, Ц.Эсакия крупноягодные формы сортов Ркацители, Саперави, Цоликоури, клона сорта Горула – тетраплоидны, триплоидны и диплоидно-тетраплоидные.

Параметры клеток грузинских генотипов винограда по регионам



Митоз. Высокая активность деления клеток, в соответствии с общим состоянием организма, показатель сильного роста. Как свидетельствуют микроскопические исследования, в меристематических клетках грузинских генотипов винограда процесс митоза протекает нормально и характеризуется более высокой активностью. Их митотических индекс колеблется в пределах от 4.8 ± 0.2 до $8.6 \pm 0.3\%$, что указывает на высокий потенциал роста грузинских сортов (табл. 1).

Цитогенетика. Ускоренное развитие цивилизации поставило человечество перед существенной проблемой – опасностью загрязнения окружающей среды как в глобальном, так и в региональных масштабах, что является мощным экологическим фактором и может воздействовать на генетическую программу всего живого, изменить, усилить мутационные процессы.

В связи с отмеченным, с целью предотвращения загрязнения отрицательными мутационными формами генофонда, обязательно учредить мониторинг за его цитогенетикой; т.к. в нем (генофонде) резко выражена склонность к соматическим, почковым мутациям, которые часто носят отрицательный характер, и в результате вегетативного размножения могут быть распространены в новых насаждениях.

В результате микроскопических исследований грузинских промышленных сортов винограда и некоторых высокоурожайных клонов выявилось, что в геноме клеток меристематических тканей грузинских генотипов, исключая единичные случаи, изменения не индуцируются. Хромосомный комплекс в основном диплоидный $2n=38$. Изменения зафиксированы только в клетках клона сорта Горула, где рядом с диплоидными, наблюдалось существование тетраплоидных клеток ($2n=4x=76$), число которых составляет $12.0 \pm 2.5\%$.

Таблица 1

Активность деления клеток грузинских генотипов винограда

Сорт	Количество просмотренных клеток N	Количество клеток находящихся в делении					
		профаза	метафаза	анафаза	телофаза	Всего	
						n	%
Ркацители	4880	46	138	102	73	379	7.8±0.4
Саперави	5809	50	117	103	85	355	6.1±0.3
Горули мцване	4332	31	32	101	9	173	5.7±0.4
Горула	4233	35	73	87	25	220	5.1±0.3
Будешури цители	4007	31	51	77	43	202	5.0±0.3
Чинури	4143	15	90	93	16	214	5.2±0.3
Цицка	4160	25	76	40	60	201	4.8±0.3
Цоликоури	5900	55	172	75	63	365	6.2±0.3
Крахуна	4187	37	75	63	19	204	4.9±0.3
Оцханури сапере	4192	47	88	75	17	227	5.4±0.3
Александроули	4177	21	120	122	50	323	7.7±0.4
Муджуретули	4214	25	125	103	54	307	7.3±0.4
Цулукидзис тетра	4055	17	43	97	55	212	5.2±0.3
Усахелоури	4130	19	115	89	18	241	4.8±0.3
Кахури мцване	4733	45	129	107	87	368	7.8±0.4
Асуретули шави	5407	53	137	109	81	380	7.0±0.3
Тавквери	5578	29	22	26	35	485	8.6±0.3
Киси	4521	14	112	133	94	353	7.8±0.4

Что касается изменений в структуре хромосом, оно различается по сортам и регионам. Частота анафазных абберантных клеток по отдельным сортам колеблется в среднем от $0.3\pm 0.02\%$ до $2.3\pm 0.9\%$. Самый низкий показатель ($0.3\pm 0.02\%$) характерен для сорта Усахелоури, а высокий ($2.3\pm 0.9\%$) - для Горули мцване. По регионам показатель достигает 0.7-1.5%. Низкий характерен для Рача-Лечхуми, а сравнительно высокий (1.5%) для сортов винограда Картлийской виноградской зоны (Табл.2).

Изменения в хромосомной структуре в основном возникают как в пресинтетической (G_1), так и постсинтетической (G_2) стадии, находятся в пределах допустимой нормы и не могут оказать никакого влияния на жизненный цикл растения.

Изменения фиксируются и в процессе мейотического деления клона Горула №21. В I и II анафазах микроспорогенеза отмечается больше нарушений по сравнению с контролем; нарушения представлены в виде единичных и двойных хромосомных мостов и фрагментов; асимметричными, трехполюсными анафазами, неравномерным распределением хромосом; повышено число измененных диад, что отражается и на качестве оплодотворяемости пыльцевых зерен, которая у клона, по сравнению с сортом (86.4%), относительно ниже и составляет 70.2%.

Таблица 2

Частота и спектр хромосомных aberrаций в меристематических клетках грузинских генотипов винограда

Сорта	Количество просмотренных корней	Количество просмотренных анафаз	Изменённых анафаз		Мосты (%)				Фрагменты (%)		слепшиеся хромосомы (%)	отсталые хромосомы (%)	асимметричные хромосомы (%)	
			n	P±Sp (%)	I	II	-	=	-	-				
Ркацители	20	524	3	0.6±0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
Саперави	“	293	6	2.0±0.8	-	-	-	-	33	-	-	-	-	67
Тавквери	“	396	5	1.3±0.6	50	-	-	10	20	-	20	-	-	-
Чинури	“	649	8	1.2±4.3	25	25	-	-	25	-	-	-	-	25
Горула	“	818	11	1.4±1.1	36	-	-	-	18	-	-	-	18	27
Горули мцване	“	302	7	2.3±0.9	43	-	-	-	14	-	-	-	-	43
Цицка	“	524	6	1.1±0.5	33	-	-	-	17	-	-	-	-	50
Цоликоури	“	599	8	1.3±0.5	25	-	-	-	-	-	-	-	-	75
Крахуна	“	402	3	0.7±0.4	25	-	-	-	50	-	-	-	-	25
Оцханури сапере	“	798	3	0.4±0.2	25	-	-	-	-	-	-	-	-	75
Александроули	“	706	4	0.6±0.3	25	-	-	-	25	-	-	-	25	25
Муджуретули	“	792	5	0.6±0.3	40	-	-	-	-	-	20	-	-	40
Цулукидзис тетра	“	769	9	1.6±0.4	22	-	-	-	33	-	-	-	22	22
Усахелоури	“	637	2	0.3±0.02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
Чхавери	“	732	10	1.4±0.4	50	-	-	-	20	-	10	-	-	20
Сацурави	“	315	4	1.3±0.1	50	25	25	-	-	-	-	-	-	-

Ядрышко с генетической точки зрения связано с хромосомами, выполняет значительную роль в процессе деления, с его помощью происходит синтез рибосомных субъединиц и рибосомных РНК и построение белков-гистонов. Ядрышко подвергается циклическим изменениям. В некоторых растениях исчезает в конце профазы или в начале метафазы, а что касается винограда, согласно исследователям [Араратян, 1942] и моим экспериментальным данным [Вашакидзе, 1987; 1993], здесь имеет место его необычное поведение. В 20-30% метафаз ядрышко обесцвечивается, уменьшается в размерах, принимает форму лабильной капли, не разрушается и в такой форме переходит в анафазу.

2. Особенности пыльцевого зерна грузинских генотипов винограда

Морфо-физиологические особенности пыльцевого зерна являются одним из важных биологических признаков сорта. От качества созревания пыльцевого зерна зависят нормальное

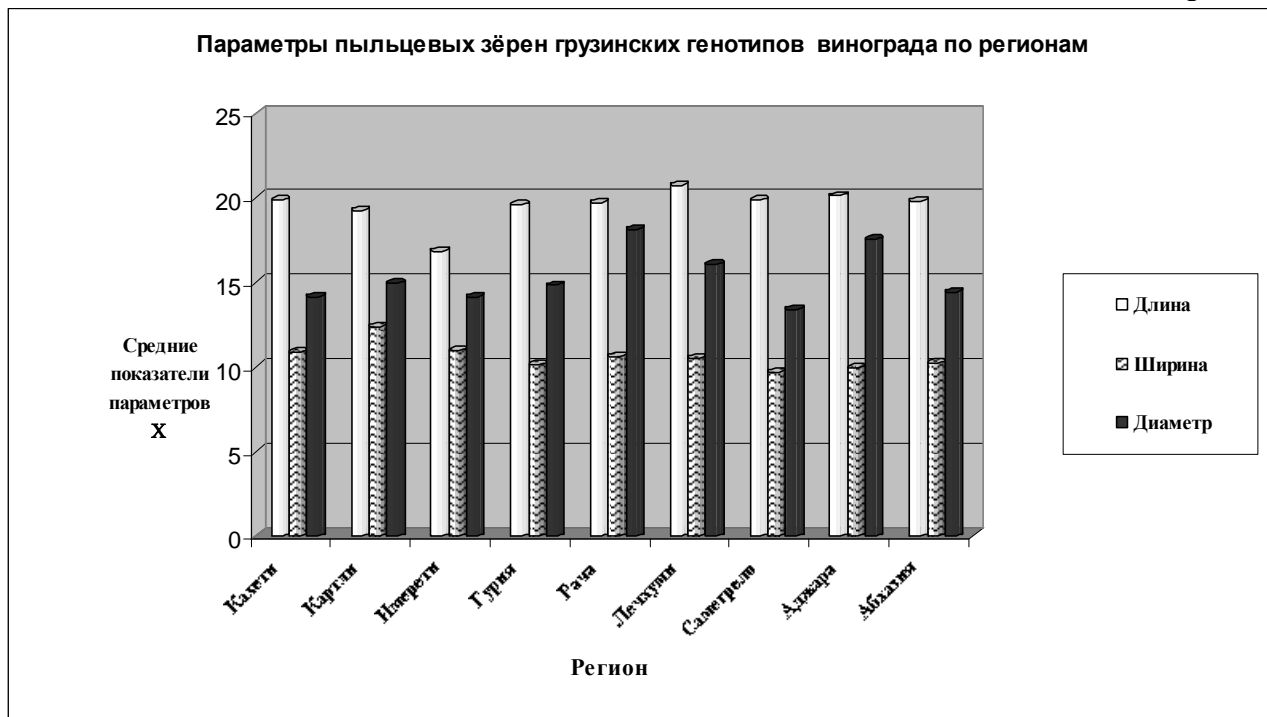
опыление-оплодотворение цветка и процессы плодообразования, получение богатого и качественного урожая.

Пыльцевое зерно культурного винограда (*Vitis vinifera* ssp. *sativa* D.C.) различается по сортам, характеризуется ампелографически ценными качественными и количественными признаками, играет значительную роль при идентификации сорта или формы.

Параметры пыльцевого зерна. Согласно моим экспериментальным исследованиям, длина пыльцевого зерна грузинских генотипов винограда в воздушносухом состоянии различна - находится в пределах 21.1 ± 0.9 - 38.8 ± 0.3 мкм. Максимальной длиной (38.8 ± 0.3 мкм) характеризуются пыльцевые зерна Саперави будешурисебури, а минимальной (21.0 ± 0.9 мкм) Цицка, остальные сорта занимают промежуточное положение. Ширина пыльцевого зерна колеблется в пределах 14.7 ± 0.2 - 27.9 ± 0.4 мкм. Максимальный показатель (27.9 ± 0.4 мкм) характерен для сорта Сацурави, а минимальный (18.1 ± 0.3 мкм) для пыльцевых зерен Саперави. Данные показатели свидетельствуют о ведущей роли генотипов в изменчивости параметров пыльцевых зерен.

Разница в показателях критериев пыльцевых зерен в исследуемых материалах наблюдается и по регионам. В частности: длина пыльцевого зерна находится в пределах 16.84-20.71 мкм, ширина – в пределах 9.71-10.95 мкм, а диаметр – 13.40-18.11 мкм (диаграмма 2).

Диаграмма 2



Известно, что количественные признаки культурных сортов винограда по степени фенотипической изменчивости делятся на признаки большого постоянства ($C_v < 10\%$), на мало изменчивые ($10\% < C_v < 20\%$) и сильно изменчивые ($C_v > 20\%$) признаки [Панарина, 1974].

Исходя из результатов исследований, проведенных нами в этом направлении, параметры пыльцевых зерен грузинских генотипов винограда, по показателям константности и изменчивости количественных признаков относятся к признакам большого постоянства

(стойким) и малоизменчивым, что подтверждает мнение исследователей о малой изменчивости количественных признаков генеративных органов, свидетельствует об их ампелографической ценности и возможности их использования для идентификации сорта.

Пористость пыльцевого зерна. Пыльцевые зерна винограда трехпористые, однако в виду того, что в процессе микроспорогенеза имеют место нарушения, встречаются и безпористые зерна, относительное содержание которых различается по сортам.

В грузинских генотипах винограда количество трехпористых пыльцевых зерен стремится к абсолютному значению и находится в пределах 67.6 ± 4.4 - $98.3 \pm 2.6\%$. Максимальным содержанием трехпористых ($98.3 \pm 2.6\%$) пыльцевых зерен характеризуется сорт Качичи, наименьшим ($67.6 \pm 4.4\%$) – сорт Александрюли; остальные сорта занимают промежуточное положение. В виде исключения в сорте Горула отмечается наличие четырехпористых пыльцевых зерен. Незначительное количество трехпористых пыльцевых зерен (0.4 ± 1.3 - $2.5 \pm 1.4\%$) наблюдается в функционально женских сортах винограда: Тавквери, Сапена, Асуретули шави и Базалетури.

Фертильность пыльцевого зерна – это способность пыльцы к оплодотворению, обеспечивающая прорастание пыльцевого зерна, рост пыльцевой трубки, нормальное протекание процесса деления генеративных клеток и образования спермиев. Она определяется внешними признаками (размер, форма, окраска) и внутренним строением пыльцы, прорастание пыльцевых зерен на рыльце и искусственной питательной среде; связана с формированием и развитием пыльцы, нарушение чего приводит к стерильности пыльцевых зерен [Roytchev, Tersky, Dimova, Karageorgiev, 1994].

Фертильная пыльца формируется в растениях с двуполыми и мужскими цветками. Зерна имеют удлиненную форму пшеничного зерна, содержат два ядра – вегетативное и генеративное, покрыты двойной оболочкой (интина, экзина), имеют три поры, расположенные на двух параллельных бороздах и обеспечивают нормальное оплодотворение, а организованная стерильная пыльца формируется в функционально женских цветках, зерна имеют форму стаченной чаши с заостренными, приподнятыми краями. Состоят из клеток с мертвыми ядрами и протоплазмой, беспоровой оболочки и борозды. Такая пыльца не обеспечивает нормальное оплодотворение, может оказать только стимулирующее влияние на образование безсеменных мелких ягод.

Сорта культурного винограда по фертильности пыльцевых зерен делятся на три: низко- (<30%), средне- (30-50%) и высокофертильных (>50%) класса.

В результате изучения фертильности пыльцевых зерен грузинских генотипов винограда оказалось, что двуполым сортам, как правило, присуща высокофертильная пыльца, с количественным варьированием от 69.2 ± 2.7 до $98.9 \pm 0.5\%$ и стремлением к абсолютному значению. Максимальным количеством ($98.9 \pm 0.5\%$) фертильной пыльцы характеризуется сорт Саперави, несколько более низким по сравнению с ним, но высоким содержанием ($69.2 \pm 2.7\%$) по классификации, характеризуется Александрюли (табл. 3).

Что касается функционально женских сортов: Тавкваери, Асуретули шави, Сапена и Базалетури, у них количество фертильной пыльцы незначительно ($0.6 \pm 0.4\%$), большая часть оставшейся пыльцы организованно-стерильная, не способная к нормальному оплодотворению, но может оказать стимулирующее влияние на развитие мелких, безсеменных ягод.

Таблица 3

Фертильность грузинских сортов винограда

Сорт	Количество просмотренный пыльцевых зёрен	Фертильного пыльцевого зерна	
		n	P±Sp (%)
Ркацители	609	539	87.7±1.3
Саперави	371	367	98.9±0.5
Кахури мцване	503	365	72.6±2.0
Будешури цители	527	506	96.0±0.9
Хихви	676	547	80.9±1.5
Тавквери	670	56	8.4±1.1
Горули мцване	402	337	83.8±1.8
Чинури	357	286	81.0±2.1
Горула	544	453	83.3±1.6
Цоликоури	340	322	94.7±1.2
Цицка	284	253	89.1±1.9
Крахуна	318	277	87.1±1.9
Оцханури сапере	492	452	92.0±1.2
Чхавери	653	568	87.0±1.3
Аладастури	622	583	93.7±1.0
Оджалеси	667	635	95.2±0.8
Чвитилури	591	531	89.8±1.2
Александроули	292	202	69.2±2.7
Муджуретули	291	207	71.1±2.7
Цулукидзис тетра	402	379	94.3±1.2
Сацурави	570	532	93.3±1.0
Асуретули шави	522	49	9.4±1.3
Сапена	457	3	0.6±0.4
Базалетури	556	69	12.4±1.4
Орбелури оджалеси	567	517	91.2±1.2
Усахелоури	609	546	89.7±1.2
Накашидзис джани	569	533	93.7±1.0
Саперави будешурисебури	584	523	89.6±1.3
Качичи	538	521	96.8±0.1

Проращение на искусственной питательной среде. По степени прорастания на искусственной питательной среде сорта винограда делятся на три группы: а) с высоким показателем прорастания (70-98%): Ркацители, Саперави, Хихви, Цицка, Крахуна; б) со средним показателем (40-70%): Саперави будешурисебури, Оцханури Сапере, Цулукидзис тетра, Усахелоури, Джани, Горула, Горули мцване, Будешури цители, Орбелури оджалеси, Качичи и г) с показателем прорастания ниже среднего (ниже 30%): Чхавери, Алдастури, Оджалеси, Александроули, Муджуретули, Чвитилури.

Сорта винограда по длине пыльцевой трубки делятся на три группы: а) сравнительно с короткой трубкой (115-120 мкм), к которым относятся сорта: Цоликоури, Хихви, Чхавери,

Сацурави; б) средней (200-300 мкм) – Чинури, Цицка, Оцханури сапере, Крахуна, Алдастури, Джани, Саперави будешурисебури, Качичи; г) длинной (300-435 мкм) – Ркацители, Саперави, Будешури цители, Горули мцване.

Что касается функционально женских сортов винограда, они не относятся ни к одной из групп, т.к. их пыльцевые зерна стерильны, и на питательной среде, как исключение, прорастает только их незначительная часть с характерными короткими, деформированными пыльцевыми трубками, что делает целесообразным поиск таких клонов, в соцветиях которых наряду с функционально женскими цветками, в большом количестве будут представлены и двуполые цветки.

Пыльцевые зерна в воздушносухом состоянии в лабораторных условиях сохраняет жизнеспособность до 10 дней, затем их жизнеспособность понижается.

3. Морфоструктура нижнего эпидермиса листовой пластинки грузинских генотипов винограда

Лист представляет собой значительный орган растения, «суть жизни растения» (К.А.Тимирязев), «соединительное звено органического и неорганического мира» (Н.Хомизурашвили), «в нем можно поймать жизненный ритм растений» (Н.Анели). Он, как многоклеточный организм имеет внутреннюю и наружную агрегатную систему клеток. Наружная сфера представлена в виде покровной ткани – эпидермиса, значительным образованием которого являются устьица, играющие существенную роль в обмене газов и между внутренними тканями и внешним миром и транскрипции.

Морфология устьиц, расположение на листовой пластинке, количество, качество и др. особенности у разных сортов растений разнообразны, в виду чего представляют надежный фенотипический признак, который с успехом может применяться на ранней стадии онтогенеза для идентификации пола, в плодовых культурах – для прогнозирования продуктивности сеянцев, для определения о устойчивости растений к засухе, заболеваниям, для идентификации полиплоидных растений [; Tompson, Olmo, 1956; Rivers, Pouget, 1957; Топалэ, 1983; Деревинский, 1999; Вашакидзе, 2000; Apakidze, 2004;].

Количество устьиц на единицу площади (1мм²). Как показали проведенные экспериментальные исследования в грузинских генотипах винограда на верхнем эпидермисе листовой пластинки не было зафиксировано наличие устьиц. Устьица расположены только на нижнем эпидермисе, их количество по сортам различается и колеблется от 135 до 227 на 1 мм² площади листовой пластинки. Максимальным количеством (227) устьиц характеризуется сорт Ркацители, минимальным (135) – Цоликоури, остальные сорта занимают промежуточное место среди них. Коэффициент изменчивости количества устьиц, расположенных на нижнем эпидермисе листовой пластинки находятся в пределах 10.7-19.4, и для абсолютного большинства сортов является малоизменчивым количественным признаком.

Параметры устьиц, форма. Для грузинских генотипов винограда параметры устьиц различаются по сортам. Их длина находится в пределах 19.1±0.3-29.5±0.6 мкм. Максимальная длина устьиц (29.5±0.6 мкм) характерна для Горула, а минимальная (19.1±0.7 мкм) для Горули мцване, остальные сорта занимают промежуточное место среди них.

Коэффициент изменчивости длины устьиц в пределах 7.2-18.3%. Минимальная изменчивость устьиц характерна для сорта Муджуретули, а максимальная (18.3%), для Усахелоури.

Резкая разница между сортами отмечается и по ширине устьиц. Показатель колеблется в пределах 16.3 ± 0.3 - 21.5 ± 0.4 мкм. Максимальной (21.5 ± 0.4 мкм) шириной характеризуется сорт Горула, а минимальной (16.3 ± 0.3 мкм) - Аладастури, остальные сорта занимают промежуточные места.

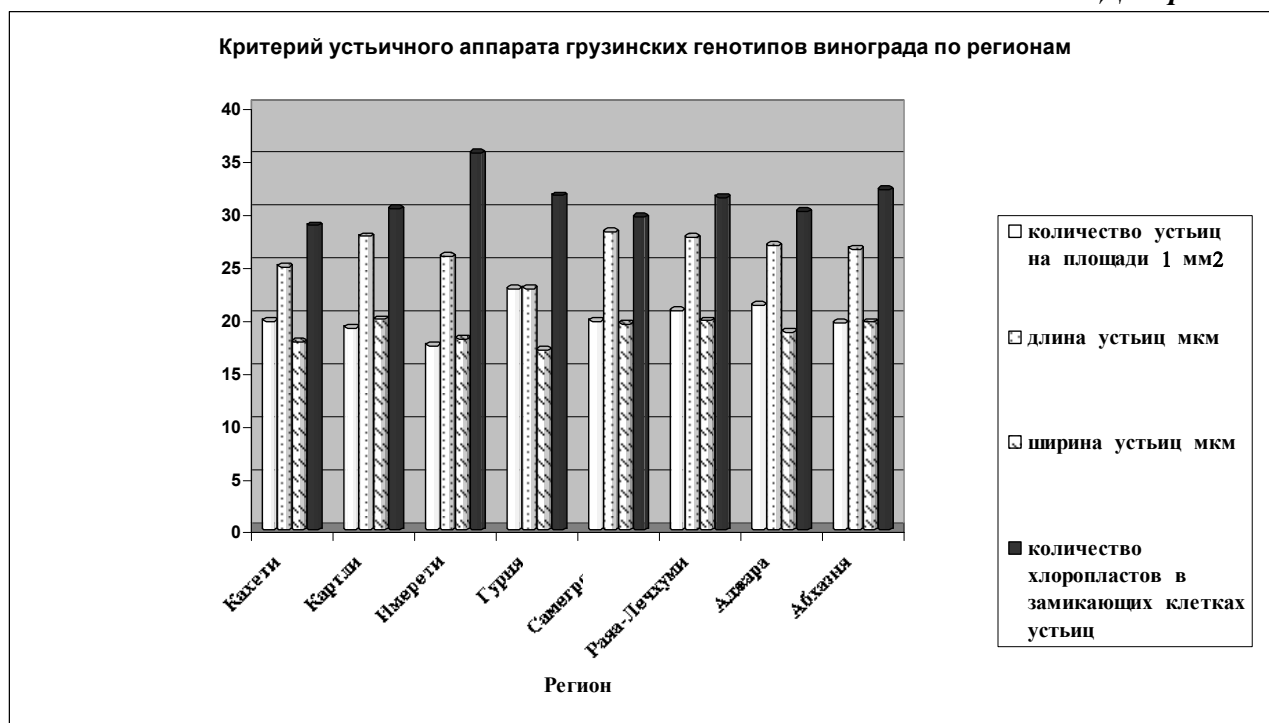
Оба критерия устьиц: длина и ширина, по коэффициенту вариации – признаки большого постоянства и малоизменчивы, имеют ампелографическую и селекционную ценность и представляют собой надежный фенотипический признак для идентификации сорта.

Количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц. Количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц по сортам различается, колеблется в пределах от 27.8 ± 0.5 до 38.12 ± 0.7 . Максимальное (38.12 ± 0.7) характерно для Цоликоури, и сравнительно низкое (27.8 ± 0.5) для Тавквери и Амлаху. Остальные сорта занимают промежуточные места среди них. Коэффициент изменчивости их количества находится в пределах 8.4-15.4%, представляет собой признак большого постоянства и малоизменчив.

Итак, в изменчивости приведенных выше критериев устричного аппарата (количество устьиц на единицу площади (1мм^2), длина и ширина устьиц, количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц) ведущая роль, исходя из наших экспериментальных материалов, принадлежит генотипу.

Влияние местопроисхождения сорта на изменчивость критериев устричного аппарата, в отношении имеющегося на единицу площади листовой пластинки количества устьиц составляет 43.7%, для длины устьиц - 43.7%, для ширины – 26,84%, для количества хлоропластов в замыкающих клетках устьиц - 51.19%.

В экспериментальных материалах по критериям устричного аппарата разница проявляется и по регионам. В частности: Количество устьиц на единицу площади (1мм^2) меняется в пределах 160-211. Длина устьиц 24.86-28.10 мкм, ширина – 16.97-19.87 мкм, а количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц в пределах 28.72-35.58 (диаграмма 3).



количество устьиц на единицу площади –цена одного деления диаграммы соответствует 10 устьицам.

Все четыре критерия грузинских сортов винограда ампелографически ценные признаки, и при сопоставлении с фенотипическими признаками, существующими на организменном уровне, с успехом могут быть применены для идентификации сорта, как анатомические маркеры.

Глава II.

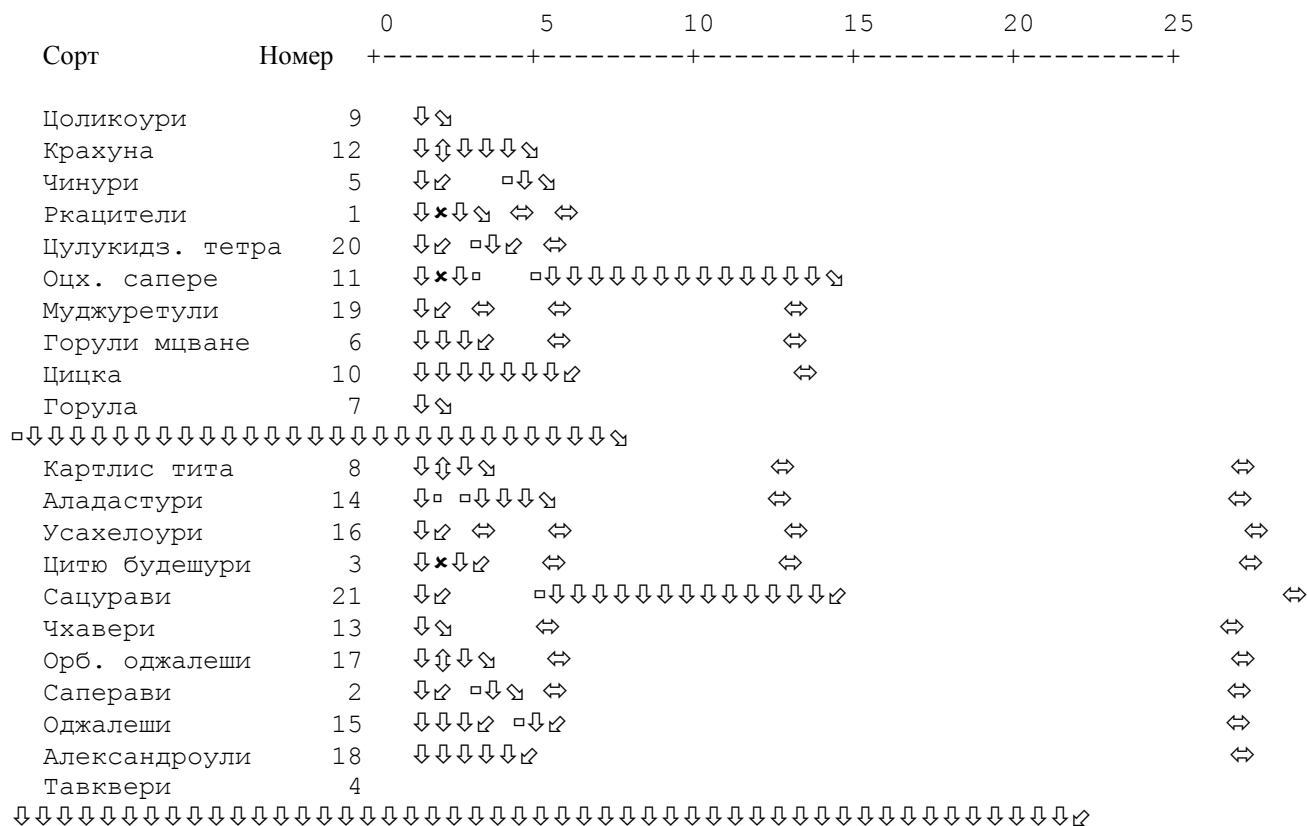
Кластерный анализ критериев клеток грузинских генотипов винограда

Для определения схожести критериев меристематических клеток грузинских генотипов винограда был проведен статистический кластерный анализ их показателей

По средним расстояниям между группами была построена дендрограмма. Установлены масштабированные расстояния межкластерных объединений.

В грузинских генотипах винограда по близости показателей клеток на дендрограмме выявились три группы с четырьмя подгруппами (Дендрограмма 1).

Иэрархний кластерного анализа
(Длина, ширина, диаметр меристематической клеток)
Дендограмма, построенная между группами



Во II подгруппе I группы рядом с Ркацители расположился Цулукидзис тетра, что опровергает существующее мнение о его Испанском («Албино кастелано», «Педро хименес», «Хименес зенбони») или украинском («Албино Крымское») происхождении и подтверждает справедливость его отнесения Н.Церцвадзе к группе Ркацители, а также мнение Д.Табидзе (1960) о его Грузинском происхождении и распространении в Европу из Грузии.

Глава III.
Практическая реализация разработанных тест-систем
для идентификации грузинских генотипов винограда
1. Исследование выделенных из грузинского генофонда винограда
высокоурожайных клонов и целесообразность их размножения

Исходя из существующих литературных источников [Голодрига, Коробец, 1972 и др.] клон, в виноградарстве, является вегетативным поколением почковой мутации, который от сорта, в основном, отличается одним, или несколькими признаками, имеет наследственную

природу, передается из поколения в поколение без изменений. Если вегетативное поколение не удовлетворяет отмеченные условия, оно не считается клоном.

Для установления того, являются ли клонами высокоурожайные вегетативные потомства сортов Цицка, Цоликоури, Крахуна, Оцханури сапере и Горула, выделенные из грузинского генофонда винограда селекционерами Ц. Эсакия и Е. Катамадзе, были проведены исследования на клеточном уровне. Для идентификации клонов были использованы разработанные нами тест-системы.

Функциональные характеристики клеток:

Активность деления клеток – в исследуемых сортах винограда Цицка, Крахуна, Оцханури сапере, Горула и в их клонах процесс деления клеток, в основном, протекает нормально. В сортах активность деления клеток $4.8 \pm 0.2 - 6.2 \pm 0.3\%$, а в их клонах этот показатель возрастает статистически высокой точностью ($p < 0.001$) и составляет $5.8 \pm 0.3 - 12.6 \pm 0.3\%$. В частности: для Цицка-клонов он дважды возрастает по сравнению с сортом, и соответственно, составляет 10.6 ± 0.4 и $11.5 \pm 0.5\%$; для клонов Крахуна и Оцханури сапере этот показатель возрастает в равной степени – в 2.5 раза ($12.6 \pm 0.9\%$); для клона Цоликоури увеличивается почти в 2 раза ($11.4 \pm 0.4\%$); для диплоидно-тетраплоидного клона Горула возрастает незначительно ($5.6 \pm 0.3\%$), что можно объяснить геномными мутациями, происшедшими в клетках последнего.

Явное преимущество митотической активности в генотипах клонов по сравнению с сортами, фенотипически, на организменном уровне, выражается в силе их роста. Все пять клонов, по существующим материалам (Г. Гаприндашвили, Е. Катамадзе, В. Гурасашвили) обладают более сильным ростом, по сравнению с сортом, при этом Цицка-грдзелмтевана характеризуется гроздьями значительно больших размеров.

Частота и спектр анафазных aberrаций. Как показали цитогенетические исследования, в клонах имеретинских сортов винограда геномные изменения не индуцируются, клетки диплоидные $2n=38$, а что касается клона Горула, здесь, наряду с диплоидными клетками, встречаются и тетраплоидные ($2n=4x=76$) клетки, количество которых составляет $12.0 \pm 2.5\%$, что свидетельствует о том, что клон является диплоидно-тетраплоидной химерой. В результате изучения частоты aberrантных клеток и спектра структурных изменений хромосом основных сортов и их клонов выявилось, что в сортах: Цицка, Цоликоури, Крахуна, Оцханури сапере и в Горула количество измененных анафазных клеток составляет $0.7 \pm 0.4 - 1.4 \pm 1.1\%$. Незначительно отличаются от них показатели их клонов, в которых частота aberrантных анафаз составляет $1.0 \pm 0.9 - 1.4 \pm 0.6\%$, это позволяет заключить, что в меристематических клетках как основных сортов, так и их клонов, количество aberrантных клеток находится в пределах нормы.

Структурные изменения хромосом индуцируются, в основном, в пресинтетическом (G_1) периоде клеточного цикла, хотя нарушения отмечаются и в периоде G_2 , а спектр нарушений представлен в виде одинарных и двойных хромосомных мостов, фрагментов, отстающих хромосом, трехполюсных и асимметричных анафаз.

Особенности пыльцевых зерен:

Палиноморфология:

Параметры. В грузинских генотипах винограда: Цицка, Цоликоури, Крахуна, Оцханури сапере, длина пыльцевого зерна в воздушносухом состоянии колеблется в пределах $25.1 \pm 0.9 - 30.4 \pm 0.4$ мкм, ширина – $16.6 \pm 0.4 - 19.5 \pm 0.4$ мкм и диаметр – $20.8 \pm 0.4 - 24.8 \pm 0.3$ мкм, а аналогичные показатели клонов отличаются от них со статистически высокой достоверностью ($p < 0.001$), в частности:

Длина достигает до 32.0 ± 0.4 - 33.9 ± 0.4 мкм и значительно превышает показатели основного сорта.

Ширина зерна в клонах Оцханури сапере и Цоликоури увеличена, в клоне Горула находится в пределах сорта, а в клонах Цицка и Крахуна - несколько уменьшена.

Диаметр пыльцевого зерна для всех клонов значительно выше по сравнению с сортом и колеблется от 23.2 ± 0.3 до 31.0 ± 0.3 мкм, исключение составляет клон Цицка, для которого этот показатель только на 5 мкм выше показателя основного сорта.

Что касается коэффициента изменчивости параметров клонов, он различается по сортам, указанные параметры являются признаками большого постоянства и малоизменчивы.

Пористость. Как выше было отмечено, пыльцевое зерно винограда трехпористое, но из-за существующих в процессе микросорогенеза нарушений, встречаются и безпористые пыльцевые зерна, относительное содержание которых различается по сортам.

По сравнению с сортом в клонах Крахуна и Оцханури сапере количество трехпористых пыльцевых зерен возрастает со статистически высокой точностью ($p=0.001$), что указывает на высокое качество созревания пыльцевых зерен обоих клонов; в клонах Цицка, Цолткоури и Горула эти показатели, по сравнению с сортом, несколько понижены, но количество трехпористых зерен все-таки высокое и превышает 65%.

При сравнении пористости пыльцевых зерен сорта и клона с применением критерия χ^2 выявляется наличие большого количества трехпористых пыльцевых зерен, что указывает на высокое качество их созревания.

Фертильность. Согласно нашим исследованиям диплоидные сорта грузинских генотипов винограда характеризуются высокофертильной пылью, количество которой, в зависимости от генотипа сорта колеблется в пределах 69.2 ± 2.7 - $98.9 \pm 0.5\%$. В клонах (за исключением Горула) эта значительная особенность моногенного признака сохранена, и его показатели не только не уменьшаются, но в клонах Крахуна и Оцханури сапере, по сравнению с основными сортами, значительно выше, и соответственно, составляют 98.4 ± 0.4 и $97.0 \pm 0.7\%$; для клонов Цицка и Цоликоури показатель составляет более 80%; сравнительно низкая ($70.2 \pm 1.4\%$) фертильность клона Горула, думаю вызвана химерной природой генотипа.

Проращение на искусственной питательной среде. В результате изучения особенностей пыльцевых зерен грузинских генотипов винограда [Вашакидзе, 2000; 2003] установлено, что грузинские сорта винограда, исходя из их генотипов, обладают различной реакцией по отношению к составу искусственных питательных сред и их концентрации.

Высокой способностью к проращению на искусственной питательной среде характеризуются пыльцевые зерна сортов винограда Цицка, Оцханури сапере, Цоликоури, Крахуна и Горула (65.7 ± 3.9 - $89.4 \pm 1.8\%$). Низкой, по сравнению с основными сортами, но хорошей, по общим показателям, способностью к проращению характеризуются и их клоны (63.2 ± 2.1 - $77.9 \pm 2.1\%$).

Для сортов Горула, Оцханури сапере, Крахуна и их клонов оптимальна 20%-ная питательная среда сахарозы, а для сортов и клонов Цоликоури и Цицка – 15%-ная питательная среда сахарозы.

Особенности, выявленные в пыльцевых зернах грузинских сортов и клонов винограда, указывают на их различную генетическую природу.

Морфоструктура нижнего эпидермиса листа грузинских генотипов и их клонов:

Количество устьиц на единицу площади (1мм^2) листовой пластинки. Количество устьиц в клонах со статистически высокой достоверностью ($p<0.001$) отличается от показателя их сортов. В частности: количество устьиц, расположенных на 1мм^2 площади нижнего

эпидермиса листовой пластинки Цицка-клона и Цицка-грдзелмтевана, по сравнению с сортом увеличено и соответственно составляет 173 167 устьиц, а в клонах Цоликоури, Крахуна, Оцханури сапере и Горула, наоборот, уменьшено, и составляет 135, 160, 110 и 163 устьиц, соответственно.

Коэффициент изменчивости количества устьиц, расположенных на единицу площади (1мм^2) листовой пластинки клонов ($10\% < C_v < 20\%$) низкое, что относит его к группе малоизменчивых количественных фенотипических признаков.

Параметры – по сравнению с сортами, для всех клонов, со статистически высокой достоверностью ($P < 0.001$; 0.01; 0.05) различны. В Цицка-клоне №1298, Цицка-грдзелмтевана и Горула №21 повышены как длина, так и ширина, а в клоне Цоликоури №1093, в клоне Крахуна №1170 и в клоне Оцханури сапере №1200, по сравнению с сортами уменьшена длина и соответственно составляет 23.1 ± 0.7 мкм, 25.2 ± 0.4 мкм, 19.8 ± 0.4 мкм, а ширина равняется 15.0 ± 0.4 мкм, 16.6 ± 0.4 мкм, 14.0 ± 0.4 мкм, при этом, коэффициент изменчивости устьиц (длина, ширина) и здесь понижен $10\% < C_v < 20\%$, что и эти параметры относит к группе малоизменчивых признаков.

Количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц. Со статистически высокой достоверностью ($p < 0.001$; 0.01; 0.05) фиксируется разница между сортами и клонами и по количеству пластид в замыкающих клетках устьиц. В частности, их количество в клонах имеретинских сортов винограда - Цицка, Цоликоури, Крахуна и Оцханури сапере уменьшается, а в клоне Горула, как и ожидалось из-за его диплоидно-тетраплоидной природы, имеет место увеличение, при этом, во всех клонах количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц является малоизменчивым ($10\% > C_v < 20\%$), а в Цицка-клоне – признаком большого постоянства ($C_v < 10\%$).

Таким образом, показатели, полученные в результате изучения морфоструктуры нижнего эпидермиса клонов грузинских генотипов винограда: Цицка, Цоликоури, Крахуна, Оцханури сапере и Горула свидетельствуют о том, что их генотипы отличаются от генотипов основных сортов.

В клонах Цицка-грдзелмтевана, Цоликоури, Крахуна и Оцханури сапере пониженные параметры устьиц, и соответственно, пониженные размеры щели устьиц, свидетельствуют в пользу их повышенной устойчивости к грибковым заболеваниям, т.к. поражение листьев грибковыми заболеваниями происходит через щели устьиц.

Укоренение грузинских генотипов винограда и их клонов. Как показали проводимые в лабораторных условиях наблюдения за процессом образования корней на побегах, каллусогенез и образование корня у клонов, исходя из их генотипа, отличаются от основного сорта. Процесс образования корней в случае клонов протекает, в основном, на день или на два раньше, или же одновременно, за исключением клона Цицка, у которого корни развиваются на четыре дня раньше, чем в контроле.

Таким образом, в результате проведенных на клеточном уровне исследований клонов грузинских генотипов винограда: Цицка, Цоликоури, Крахуна, Оцханури сапере и Горула выявлены различия в: функциональных характеристиках клеток (значительное возрастание индекса клеточного деления; структурные изменения хромосом - незначительно, но все-таки увеличенное количество аберрантных клеток, нарушения веретена деления в клоне Горула и наличие наряду с диплоидными и тетраплоидных клеток), в биопотенциале (интенсивность образования корней), в палиноморфологии (увеличенные параметры пыльцевых зерен; пористость; высокая фертильность и жизнеспособность) в морфоструктуре нижнего эпидермиса листовой пластинки (возросшее количество устьиц и их уменьшенные размеры, увеличенное

количество хлоропластов в клонах Горула и Цицка), которые, с учетом результатов многолетних исследований, проводимых селекционерами на организменном уровне, дают право заключить, что клоны имеретинских сортов винограда Цицка №1298, Цицка-грдзелмтевана, Цоликоури №1093, Крахуна №1170, Оцханури сапере №1200, Горула №21 - являются мутантами. Все зафиксированные положительные признаки имеют наследственный характер.

На сегодняшний день, для оценки виноградных сортов используются дескрипторы, дающие возможность исследования всех ценных с хозяйственной научной точки зрения признаков по кодам, создания единой унифицированной системы мирового масштаба, электронной обработки данных и создания единой базы данных.

В диссертации, в виде модели, дано описание, кодирование и оценка по IPGRI и OIV исследованного традиционными методами [Чахнашвили, 1946; Вашакидзе, 1957; Рамишвили, 1960; Церцвадзе, 1983; Гурасашвили, 2002] и разработанными нами тест-системами виноградного сорта Горула и его клон №21. Представлены различия между ними.

Что касается изученных на клеточном и организменном уровнях 143 качественных и количественных признаков клон №21 сорта Горула, их подавляющее большинство по показателям константности и изменчивости, находится в пределах материнского растения.

Разница зафиксировалась:

I. в качественных признаках:

Окраске молодых побегов (характерны полосы с интенсивной окраской); характере рассеченности листьев (характерны как трехлопастные, так и пятилопастные листья); в строении цветка (характерно повышенное число пыльников – 6,7); в явлении полиэмбрионии (у сорта не отмечается); разветвлении пыльцевой трубки на искусственной питательной среде; в повышенной, по сравнению с сортом устойчивости к биотическим и абиотическим факторам; размере бутона цветка, более интенсивной окраске кожицы ягод.

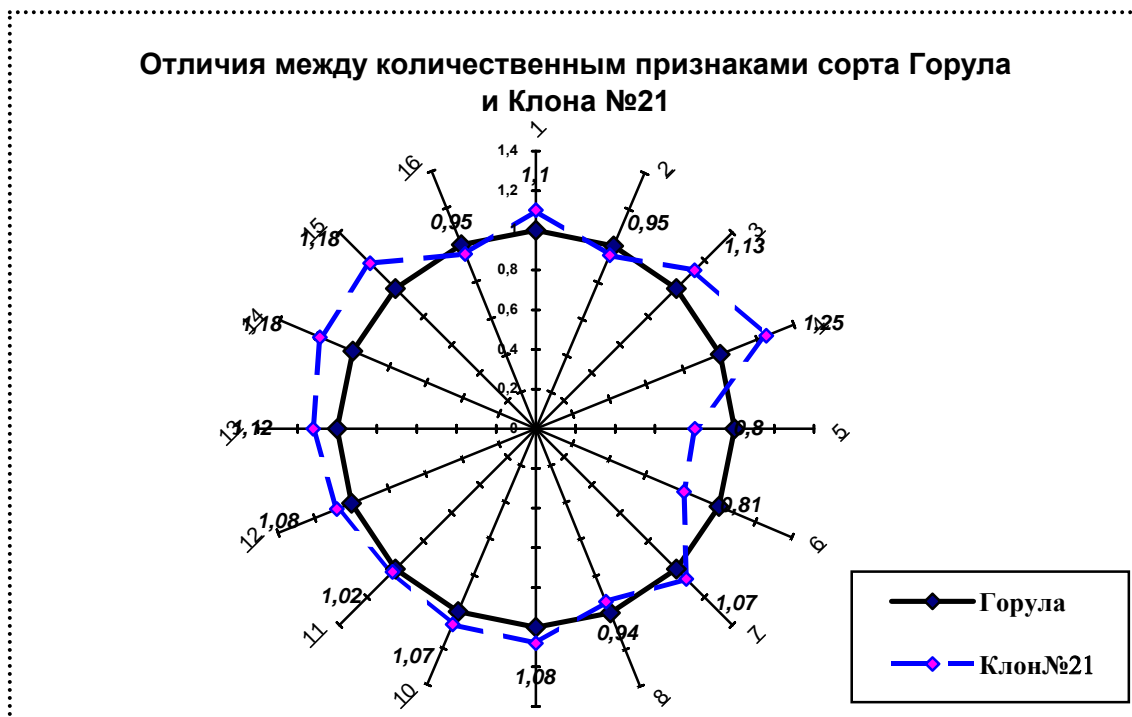
II. в количественных признаках:

1. длина вырезки черенка, в клоне больше на 10%-ов, чем в сорте (Диаграмма 4).
2. длина черенка, меньше на 5%.
3. длина пыльцевого зерна, больше на 13%.
4. диаметр пыльцевого зерна, больше на 25%.
5. доля трёхпористых пыльцевых зёрен, меньше на 20%.
6. фертильность, меньше на 19%.
7. восприимчивость рыльца, больше на 7%.
8. количество устьиц на нижнем эпидермисе листовой пластинки меньше на 6%
9. длина устьиц больше на 8%.
10. количество хлоропластов в замыкающих клетках устьица, больше на 7%.
11. урожайность больше на 2%.
12. сахаристость виноградного сока больше на 8%.
13. диаметр ядра меристематич. клетки больше на 12%.
14. коэффициент ядерно-плазматического соотношения больше на 18%.
15. индекс митоза больше на 18%.
16. длина семени меньше на 5%.

В клетке отмечаются геномные и хромосомные изменения. Наряду с диплоидными, встречаются и тетраплоидные клетки ($2n=4x=76$), доля которых составляет $12.0\pm 2.5\%$. Что касается структурных изменений хромосом в процессе митоза, частота абберрантных анафаз находится приблизительно в пределах сорта и составляет $1.0\pm 0.4\%$, а в 1 и 11 анафазах

мейотического деления микроспорогенеза значительно повышена, и соответственно, составляет $12.4 \pm 1.2\%$ и $20.5 \pm 3.3\%$. В процессе мейоза имеют место и другие виды нарушений (микронуклеусные диады, триады, пентады, гексады, цитомиксис ит др.), по причине чего в некоторых микроспорангиях количество стерильных зерен по сравнению с сортом повышено, а фертильность, соответственно понижена (70.2 ± 1.0).

Диаграмма 4



* в диаграмме для сорта Горула показателем количественного признака принята 1 (100%) и с ней сравнен аналогичный показатель клона 21

Морфологические, биохимические, анатомические и цитологические различия, зафиксированные в сорте Горула и клоне №21 указывают на то, что воздействию мутагенного фактора подверглись второй (L2) и третий (L3) гистогенные слоя конуса роста, из которых развивается спорогенная ткань, устьица листьев и корни. Клон №21 представляет собой стабильную цитохимеру типа 2-4-4, и соответственно новый генотип, выделенный из грузинского генофонда винограда и характерные для него признаки высокой урожайности, сахаристости, устойчивости к мильдю и сильный рост – наследственны.

2. Устойчивость грузинских генотипов винограда к антропогенным факторам

Тяжелые металлы занимают одно из первых мест среди отрицательных факторов, воздействующих на биосферу. Включаясь в биогенную миграцию, они своей токсичностью и генетической активностью создают опасность для всего живого.

Растения легко доступны тяжелым металлам. Их воздействие осуществляется, в основном, в G₁ фазе клеточного цикла. Они обуславливают продление периода пресинтеза и повреждение ДНК, что впоследствии реализуется в виде хромосомных мутаций.

Для растений основной механизм токсичности тяжелых металлов связан с их способностью инактивировать белки и другие макромолекулы при высоких концентрациях, вызывать нарушения в различных звеньях и системах метаболизма [Дубинин, Панин, 1978].

Исходя из вышеизложенного, с целью изучения устойчивости грузинских генотипов винограда к антропогенным факторам, в частности, к тяжелым металлам в различных экологических условиях – в виноградниках Вашлиджварской экспериментальной базы (контроль) и в виноградниках, рассаженных на почвах села Хатисопели Болнисского района, орошаемых загрязненной тяжелыми металлами рекой Машавера, были проведены исследования фенотипических признаков на клеточном уровне сортов винограда: Ркацители, Саперави, Тавквери и Кртлис тита; проведено изучение токсической и генетической активности тяжелых металлов; с целью обеспечения населения экологически чистой продукцией был проведен атомно-абсорбционный анализ виноградного сока и вина.

Согласно экспериментальным данным, в материале, полученном из виноградниках, заложенных на почвах, орошаемых загрязненной тяжелыми металлами водой, статистически высокодостоверно ($p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$) имеет место незначительная изменчивость – $C_v < 20\%$ клеточных параметров, это свидетельствует в пользу того, что исследуемые сорта, в особенности – Ркацители, относительно устойчивы к воздействию находящихся в почве тяжелых металлов.

Активность деления клеток в контроле составляет $6.1 \pm 0.1 - 8.6 \pm 0.3\%$, а в Болнисском районе варьирует в пределах $4.1 \pm 0.3 - 4.3 \pm 0.3\%$, что на организменном уровне отражается в силе роста растений. Сила роста растений в Болнисских условиях значительно понижается, что по нашему мнению, является результатом токсического воздействия высоких концентраций находящихся в почве тяжелых металлов.

Как показали цитогенетические исследования, в экологических условиях Вашлиджвари и Болнисине не отмечается отрицательное воздействие антропогенных, стрессорных факторов, в том числе и тяжелых металлов, на функцию веретена деления клеток исследуемых сортов стрессорных факторов, клетки диплоидны, $2n=38$.

Что касается структурных изменений хромосом, в экологических условиях Болниси частота аберратных клеток в сортах: Ркацители и Тавквери несколько возрастает и, соответственно составляет $2.9 \pm 0.9\%$ и $1.8 \pm 0.8\%$, а в Саперави, наоборот, понижается до $0.6 \pm 0.3\%$.

Параметры пыльцевых зерен. Микроскопические исследования параметров (длина, ширина, диаметр) Пыльцевых зерен исследуемых сортов: Ркацители, Саперави и Тавквери показали, что длина и ширина всех трех сортов в условиях Болниси статистически с очень высокой достоверностью ($p < 0.001$) меньше параметров пыльцевых зерен цветков тех же сортов, заложенных в условиях Вашлиджвари (диагр. 5).

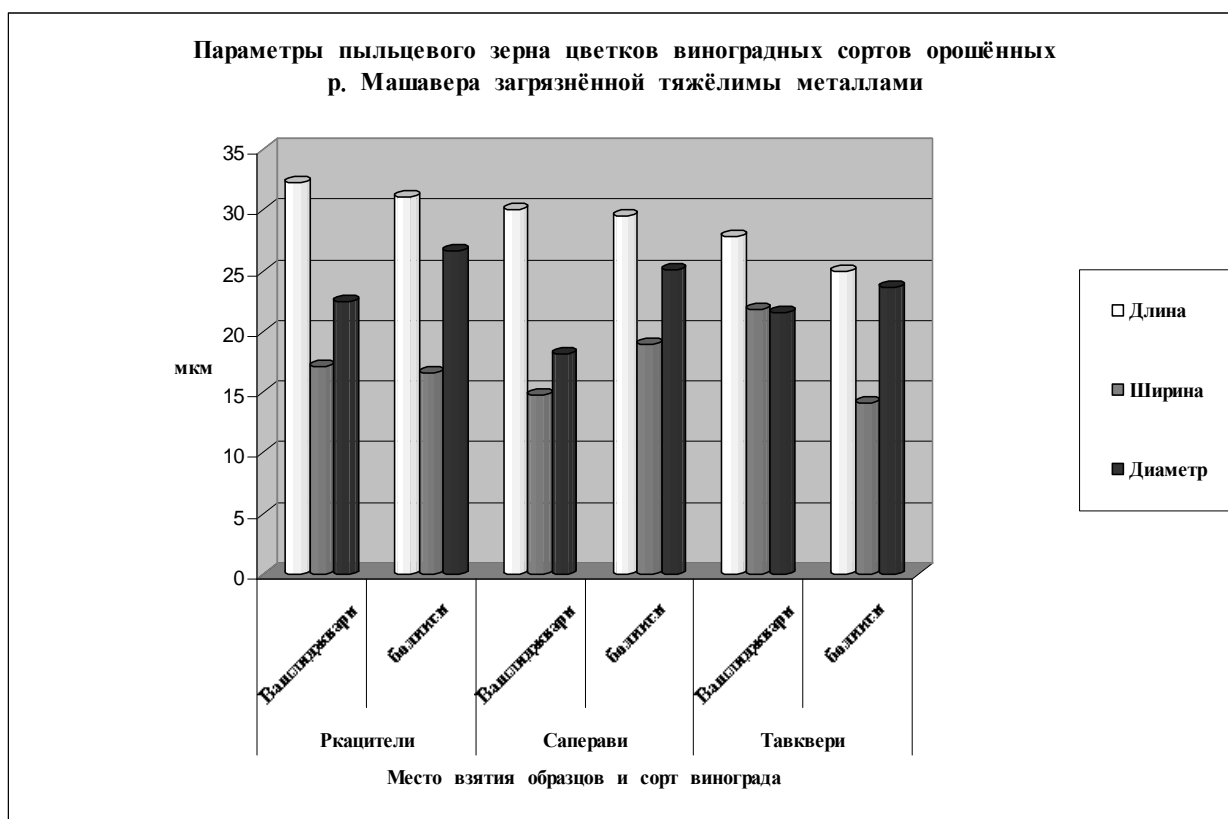
Параметры пыльцевых зерен всех трех сортов являются признаками большого постоянства и малой изменчивости.

Фертильность пыльцевых зерен. Способность оплодотворения пыльцевых зерен в обеих экологических условиях у всех трех сортов высокая, но с той разницей, что в экологических условиях Болниси статистически с высокой достоверностью ($p < 0.001$) все-таки проявляется влияние тяжелых металлов на их фертильность.

В результате изучения параметров пыльцевых зерен (длина, ширина, диаметр) и способности оплодотворения, обнаружилось явное влияние тяжелых металлов на параметры сортов Ркацители, Саперави и Тавквери (длина и ширина уменьшается, диаметр, наоборот – увеличивается), способность оплодотворения понижается, но не в такой степени, чтобы не обеспечить максимально процесс опыления-оплодотворения.

Содержание тяжелых металлов в виноградном сусле и вине. По существующим литературным данным [Алексеев, 1987; Одиум, 1966], толерантность разных органов растения к тяжелым металлом разнообразна. Попавшее в растение из атмосферы и почвы повышенное количество тяжелых металлов аккумулируется, в основном, в вегетативных органах, и сравнительно низкое количество – в плодах и клубнях.

Диаграмма 5



В результате исследований, проведенных с целью изучения устойчивости грузинских генотипов винограда к антропогенным факторам, в частности, к тяжелым металлам, в меристематических клетках и пыльцевых зернах виноградных сортов Ркацители, Саперави, Тавквери и Картлис тита, посаженных на орошаемых загрязненной тяжелыми металлами рекой Машавера почвах болнисского района, обнаружился токсический и генетический эффект тяжелых металлов. А именно: увеличены параметры меристематических клеток (длина, ширина, диаметр); резко снижена активность клеточного деления; увеличена частота аберрантных

клеток; уменьшены параметры пыльцевых зерен (длина, ширина) и способность оплодотворения, однако в винограде, сусле и вине, как это зафиксировано другими исследователями на других культурах, содержание тяжелых металлов находится в пределах нормы, и их использование в качестве пищевых продуктов допустимо.

3. Стимулирующий эффект некоторых биологически активных веществ на укоренение саженцев и цитогенетическая стабильность

Согласно экспериментальным материалам [Гамбург, 2000; Rizzu P., Chemi, 2000] биологически активные вещества могут стимулировать, или же, наоборот, ингибировать те или иные жизненно важные процессы в растениях.

При их воздействии, даже в самых низких количествах, на растительную клетку, меняются жизненные функции клеток, возрастает жизнеспособность протоплазмы, обеспечивается интенсивный рост растения.

Стимулирующее влияние ЛКП-1 и ЛКП-2, синтезируемых в результате переработки отходов винограда и гроздей, на укоренение винограда и на цитогенетическую стабильность полученных саженцев. С целью индицирования процесса ризогенеза и получения в сжатые сроки саженцев с мощной корневой системой, в виде биостимуляторов были испытаны препараты: лигнин-кремниевый комплекс ЛКП-1 и ЛКП-2 (авт. М.Бежуашвили), приготовленные из сырья, полученного в результате переработки отходов винограда.

В результате экспериментальных исследований выявилось их стимулирующее влияние на укоренение побегов, в частности: на побегах, обработанных препаратами ЛКП-1 и ЛКП-2 корни развиваются на 2-3 недели раньше, чем в контроле. как для культурных (Ркацители, Голрули мцване, Чинури, Белый мускат), так и для одичавших сортов (Хетура) рабочие растворы ЛКП-1: 2-3г/л; а ЛКП-2 - для культурных сортов, – 2-3 г/л, и для одичавшего сорта – 1-2 г/л. Вместе с тем на обработанных побегах развитие корней начинается при температуре ниже 20° С, а в контроле – только после того, как комнатная температура становится выше 20°С (25-26°С). Материал, обработанный в водных растворах исходного сырья (без кремния) из-за загрязнения раствора разнообразными микроорганизмами, был исключен из эксперимента в самом начале.

Результаты, полученные на организменном уровне, нашли свое отражение на клеточном уровне:

При концентрациях ЛКП-1 и ЛКП-2 - 2-3г/л (экспозиция 48 часов, активность деления $(5.6 \pm 0.4 - 7.5 \pm 0.4)$ меристематических клеток в корнях, обработанных побегов по сравнению с контролем значительно повышена, что указывает на стимулирующую природу данных веществ.

В меристематических клетках корней геномные изменения не индуцируются, $2n=38$, частота аберратных клеток в пределах контроля $(0.9 \pm 0.05 - 1.5 \pm 0.4\%)$ и находится в соответствии с допустимым для винограда показателем, что свидетельствует о цитогенетической стабильности саженцев и ставит вопрос о целесообразности использования тестируемых веществ для получения высококачественных саженцев.

Результаты испытания лигно-полисахаридного препарата, приготовленного из отходов виноделия. При испытании препарата лигнин-полисахаридного комплекса №1, изготовленного из сырья, полученного переработкой отходов виноделия (авторы: Л.Муджири,

Е.Калатозившили) выявилась его биостимулирующая природа – на обработанных экстрактом побегах, образование каллуса и корня начинается на 3-4 дня раньше, по сравнению с контролем. и в дальнейшем наблюдается интенсивный рост и развитие. Оптимальная концентрация препарата в отношении образования корней – 1/40, экспозиция – 72 часа и его испытание для получения высококачественного привитого саженца, для укоренения трудноукореняющихся растений целесообразно.

Генетическая идентичность саженцев, полученных с использованием биоактиватора биорага. Для выявления цитогенетического эффекта влияния биоактиватора биорага на виноград, опыты проводились в цитогенетической лаборатории в 1998-1999 гг.

Исследованию подвергались меристематические клетки индуцированных корней виноградного сорта Горули мцване, обработанные 0.002%-ным раствором биоактиватора биорага (экспозиция – 48 часов).

Как показали микроскопические исследования течения процесса деления меристематических клеток сорта Горули мцване, процесс деления протекает нормально как в обработанных раствором биорага, так и в контрольных вариантах, а что касается митотического индекса меристематических клеток корней, образованных на побегах, обработанных биорагом, он по сравнению с контролем ($6.6 \pm 0.4\%$) относительно высокий и составляет $8.9 \pm 0.4\%$.

Геномные изменения в клетках не индуцируются, хромосомный комплекс диплоидный – $2n=38$, а структурные изменения хромосом представлены одиночными хромосомными мостами, фрагментами и асимметричными анафазами; образование aberrantных клеток происходит на стадии S_1 клеточного цикла. Частота таких клеток в меристематической ткани побегов, обработанных биорагом составляет $21 \pm 0.6\%$ (в контроле – $2.3 \pm 0.3\%$) и находится в пределах нормы, допустимой для винограда.

Индукцированная биоактиватором биорагом высокая активность деления меристематических клеток и низкая частота aberrantных клеток, указывают на возможность его применения для получения высококачественного, цитогенетически идентичного привитого саженца.

Глава IV.

Тип опыления и плодообразование у грузинских генотипов винограда

1. Перекрестное и самоопыление двуполых сортов винограда, апомиксис и партенокарпия

О типе опыления двуполых сортов культурного винограда в литературе существует множество мнений. Часть ученых [Якимов, Литвак, Балан, Малтабар, 1977; Rombouch, 2002] считает их самоопыляющимися растениями, вторая часть [Kimura, Okomoto, Hirono, 1998; Sartorius, 1926] указывает на одновременное воздействие само- и перекрестного опыления, а третья [Чолокашвили, Чахнашвили, 1929; Вашакидзе, Гогиава, 1982] указывает на аддитивное влияние обоих типов опыления, но ведущую роль предоставляют генотипу сорта.

В результате изучения типов опыления и процессов плодообразования у грузинских генотипов винограда выявилось, что отдельные сорта по разному реагируют на само- и перекрестное опыление. Так, например, в сортах: Ркацители, Александроули, и Цулукидзис тетра показатель завязываемости в условиях свободного опыления выше, чем при самоопылении, а в сортах: Саперави, Горула, в клоне Горула и Муджуретули, наоборот – ниже. На сорт Орбелури оджалеши тип опыления не оказывает влияния вообще, и завязываемость в условиях обоих типов опыления почти одинакова (диаграмма 6).

Изменчивость показателя завязываемости по типу опыления обусловлена генотипом. В частности, при свободном опылении завязываемость по сравнению с самоопылением сравнительно высокая для Ркацители, Цулукидзис тетра и Александроули, и низкая в сортах: Саперави, Горула, клоне Горула и Муджуретули. Влияние типа опыления на сорт Оджалеши не отмечается.

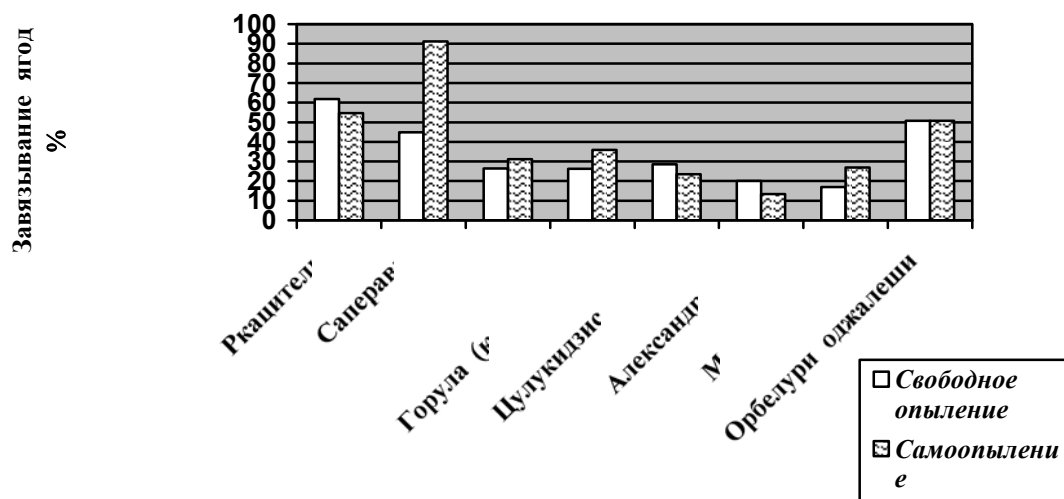
Отмеченное указывает на то, что в сортах Ркацители, Цулукидзи тетра и Александроули, наряду с самоопылением протекает и перекрестное опыление, аддитивное воздействие которых обуславливает высокие показатели завязываемости.

В ягодах Ркацители, Саперави, Цулукидзис тетра, Горула и клоне горула, полученных самоопылением, количество семян по критерию χ^2 не меняется в зависимости от типа опыления в случае Ркацители, а в сортах: Саперави, Цулукидзис тетра, Горула и в клоне Горула, в условиях самоопыления показатель не меняется (по сравнению с самоопылением) или же возрастает количество бессемянных партенокарпических ягод. Та же картина наблюдается в отношении удельной доли односемянных ягод, однако доля двух-, трех- и четырехсемянных ягод снижается. В этих генотипах показатель завязываемости при самоопылении выше, чем при свободном опылении, а количество семян в ягодах – ниже, что дает основание полагать, что в процессе опыления аддитивное воздействие перекрестного опыления является необходимым для испытываемых генотипов.

Таким образом, в процессе опыления-оплодотворения испытываемых сортов винограда основную роль играет самоопыление, хотя для полноценного осуществления процесса, наряду с ним, необходимо также аддитивное воздействие перекрестного опыления. Отмеченное дает основание из всех существующих относительно типов опыления версий отдать предпочтение второй, согласно которой в двуполох сортах винограда имеет место одновременное воздействие само- и перекрестного опыления, и ведущая роль отводится самоопылению.

Диаграмма 6

Показатель завязывания ягод в условиях само и перекрёстного опыления



Явление полиэмбрионии в винограде. Явление полиэмбрионии в генетико-селекционных исследованиях растений имеет весьма важное теоретическое и практическое значение; оно является одним из путей получения новых форм (гаплоидных, полиплоидных), и вместе с тем, дают возможность получения дополнительной информации о происхождении и развитии тех или иных видов.

Нами, в клоне Горула №21, было зафиксировано развитие из одного семени двух растений, различающихся по морфологическим признакам и по росту и развитию. Думаем, что одно из них имеет апомиксическое происхождение, а второе – апомиксическое. Основу для такого предположения дает выявленные цитозембриологом Л.Харитонашвили (1990) яйцеклеткообразные синергиды, а также случай удвоения ядер синергидов в автополиплоидной форме Саперави.

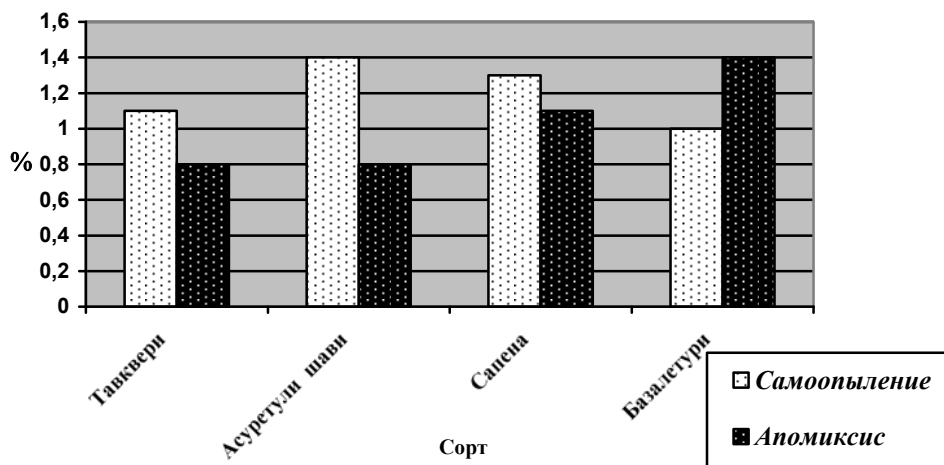
Самоопыление и апомиксис у функционально женских сортов винограда. Согласно существующей литературе [Иванова,Поройская, 1930; Якимов, Литвак, Балан, Малтабар, 1977], в функционально женских сортах винограда, в случае изолирования цветков, на грозди, рядом с партенокарпическими ягодами формируются и ягоды с нормально развитыми семенами. Это явление ученые объясняют по-разному. Часть из них [Принц, 1925; Мельник, 1925; Рамишвили, 1960] считает что оно должно быть обусловлено существованием двуполых цветков в соцветиях, а другие [Негруль, 1934; Харитонашвили, 1971 и др.] приписывают его апомиксическому развитию семян.

Наши экспериментальные материалы не опровергают ни одну из версий, наоборот, указывают на правомочность их сосуществования, т.к по нашим наблюдениям, проводимых в течение ряда лет, $1.1 \pm 0.1 - 1.4 \pm 0.1\%$ ягод на гроздьях, образованных из самоопыленных соцветий функционально женских сортов винограда: Тавквери, Асуретули шави, Сапена и Базалетури, содержали семена нормального развития (диаграмма 7).

Что касается их склонности к апомиксису, по проведенным нами экспериментальным исследованиям, на более чем 5600-х кастрированных цветках ягоды с полноценными (нормального развития) семенами образовало $0.8 \pm 0.2\%$ цветков сорта Тавквери; $0.6 \pm 0.2\%$ - сорта Асуретули шави, $1.1 \pm 0.3\%$ - сорта Сапена, и $1.4 \pm 0.6\%$ - сорта Базалетури.

Диаграмма 7

Развитие ягод на самоопыленных и кастрированных цветах на функционально женских сортах винограда



Согласно добытым экспериментальным материалам, в функционально женских сортах, в случае изолирования цветков, на грозди, рядом с партенокарпическими ягодами возможно получение также ягод с нормально развитыми семенами, как путем самоопыления, так и апомиксисом.

Глава V.

Цитологические основы подбора наилучших сортов-опылителей для функционально женских сортов винограда

Согласно существующей научной литературе [Ткаченко, 1961; Принц, 1925; Дарова, 1958] и нашим экспериментальным данным [Вашакидзе, 1965; Чхартишвили, Вашакидзе, Мдинарадзе, 2005], для нормального протекания процесса оплодотворения функционально женских сортов винограда, и соответственно, для получения высокого и качественного урожая, одним из основных условий является правильный подбор наилучшего сорта-опылителя. Подбор сорта должен происходить с соблюдением принципов систем несовместимости, в особенности принципов, предусмотренных гаметофитной системой, которые проявляются при прорастании пыльцевой трубки в столбик пестика и зависят от аллелей S локусов, контролирующих эти процессы. В частности, прорастание пыльцевого зерна на рыльце, прорастание в трубку столбика, в семяпочки и оплодотворение протекают нормально, если S локусы столбика пестика и пыльцевой трубки состоят из разных аллелей ($S_1S_2 \times S_3S_4$). В случае наличия одинаковых аллелей ($S_1S_2 \times S_1S_2$), рост пыльцевой трубки, и, соответственно, процесс оплодотворения приостановлены, а при частичной схожести аллелей ($S_1S_2 \times S_1S_3$), прорастание в столбик пыльцевой трубки и процесс оплодотворения тоже осуществляются частично (50%).

Исходя из вышеизложенного, при исследованиях, проводимых с целью подбора наилучшего опылителя для функционально женского сорта винограда, одним из основных вопросов является вопрос восприимчивости пыльцевого зерна рыльцем, что, по мнению эмбриологов [Якимов, Литвак, Базан, Малтабар, 1977] находится в прямой корреляционной связи со временем и климатическими условиями.

С учетом отмеченного, с целью подбора научно-обоснованного сорта-опылителя для функционально женского сорта винограда Тавквери, и для выяснения возможности применения полученных результатов в отношении других стерильных сортов, были исследованы: степень оплодотворения и длительность жизнеспособности пыльцевых зерен сортов – Ркацители, Чинури, Горули мцване; восприимчивость рылец цветков функционально женских сортов к пыльцевым зернам различных сортов в условиях свободного и искусственного опыления; влияние годов, сорта и дней, прошедших после опыления на показатель прорастания пыльцевого зерна, на процессы внедрения пыльцевой трубки в столбик пестика и оплодотворения.

Как показали результаты микроскопического анализа, сорта винограда: Ркацители, Чинури и Горули мцване – высокофертильные сорта; их показатели находятся в пределах $81.0 \pm 2.1 - 87.7 \pm 1.3\%$; Пыльца сохраняет жизнеспособность в течение 5-9 дней.

Анализ материалов, полученных в результате изучения восприимчивости рылец цветков Тавквери (в условиях свободного и самоопыления) к пыльцевым зернам разных сортов показал, что со статистически высокой точностью ($p < 0.01$) самым значительным фактором являются дни, прошедшие после опыления – 79,8%, затем сорта-опылители – 11,5%, и наименее значимым является фактор годов – 3,4%; показатель прорастания пыльцы, попавшей на рыльце, как в случае свободного, так и искусственного опыления возрастает от первого до четвертого дня;

при этом, наиболее высокий показатель прорастания наблюдается при опылении пыльцой Ркацители ($70.8 \pm 1.4\%$), а затем Чинури ($65.1 \pm 1.4\%$), что касается Горули мцване - показатель ($54.9 \pm 2.0\%$) статистически достоверно не отличается от контроля; влияние фактора годов бывает значительным на первый и второй день после опыления, на четвертый день его влияние уменьшается.

Цитологическими исследованиями установлено, что пыльцевое зерно после попадания на рыльце начинает быстро прорастать. Пыльцевые трубки хорошо видны в столбике пестика спустя два часа после опыления, через шесть часов они достигают до середины завязи, а через 12 часов находятся у микропиле; через 24 часа после опыления в зародышевом мешке заметно разрушение синергидов, что является следствием прохождения пыльцевой трубки. Через 48 часов после опыления в центральном ядре, наряду с основным ядрышком, замечается слабоокрашенное маленькое ядрышко.

Период покоя зиготы ограничивается 4-5 днями, после чего она вступает в митотическое деление. Спустя 10-12 дней после цветения, в зародышевом мешке замечается четырехклеточный проэмбрион. Наличие многоклеточного зародыша фиксируется на 15-20 день после цветения.

Для выяснения того, как отражаются результаты исследований, проведенных на клеточном уровне на процессы плодообразования, протекающие на организменном уровне [Мдинарадзе, 2004], были изучены показатели завязываемости ягод, критерии ягод и гроздей. В результате исследований обнаружилось, что при искусственном опылении тремя испытываемыми сортами, процессы плодообразования протекают более интенсивно, чем в контроле ($28.7 \pm 0.4\%$), причем показатели различаются по отдельным сортам; в случае оплодотворения пыльцой Ркацители - показатель максимальный и в среднем составляет $54.8 \pm 0.4\%$, для Чинури - несколько понижается ($48.0 \pm 0.4\%$), а в случае Горули мцване - еще ниже и составляет $45.3 \pm 0.8\%$.

Показатель завязываемости ягод со статистически высокой точностью ($p < 0.01$) находится в прямой корреляционной $r = +0.87$ зависимости со средней массой грозди, которая в случае опыления пыльцой Ркацители достигает 315.0 г, Чинури - 263.0 г, а Горули мцване - 261.0 г. Причем, масса грозди, полученной при опылении испытываемыми сортами, резко превосходит контрольный показатель (189 г), что, наверняка, должно быть объяснено развитием партенокарпических ягод в некоторых гроздьях.

Что касается массы ягод, их параметров и количества развитых в них семян, здесь имеет место возрастание показателей по сравнению со свободным опылением, что отражается на урожае. Урожай на один куст в условиях свободного опыления составляет 4 кг, при опылении пыльцой Ркацители - 6.3 кг, а при опылении пыльцой Чинури и Горули мцване несколько понижается и, соответственно, составляет 5.2; 5.3 кг, но, все-таки значительно превосходит контроль; урожай в пересчете на 1 га составляет: при опылении Ркацители - 17 т, Чинури - 14 т и Горули мцване - 13.9 т.

В условиях искусственного опыления по сравнению со свободным опылением увеличивается стоимость винограда на га, которая для контроля составляет 6060 лари, в случае опыления Ркацители - 10078, Чинури - 8398 и Горули мцване - 8341 лари. Рентабельность при опылении Ркацители - 166.3%, Чинури - 139%, а Горули мцване - 138% (табл. 4). Отмеченное свидетельствует о том, что у функционально женского сорта Тавквери и у двуполых сортов винограда: Ркацители, Чинури и Горули мцване S локусы, контролирующие развитие пыльцевой трубки и столбика пестика состоят из различных аллелей и S_1S_2 и S_3S_4 , т. е. гаметофитно совместимы и все три сорта могут быть использованы опылителями; а по

показателю плодообразования преимущество придается Ркацители, затем Чинури и Горули мцване.

Выявленная на примере Тавквери модель подбора наилучшего сорта-опылителя: совпадение фаз цветения → палиноморфология → восприимчивость рылец цветков → вращивание пыльцевой трубки в пестик → оплодотворение → плодообразование- механический анализ гроздей и ягод, должна быть применена ко всем функционально женским сортам винограда при подборе научно-обоснованного сорта опылителя, практический исход чего – составление рациональной схемы закладки виноградника, получение высокого и качественного урожая.

Глава VI.

Научные основы индуцирования селекционного материала в сжатые сроки

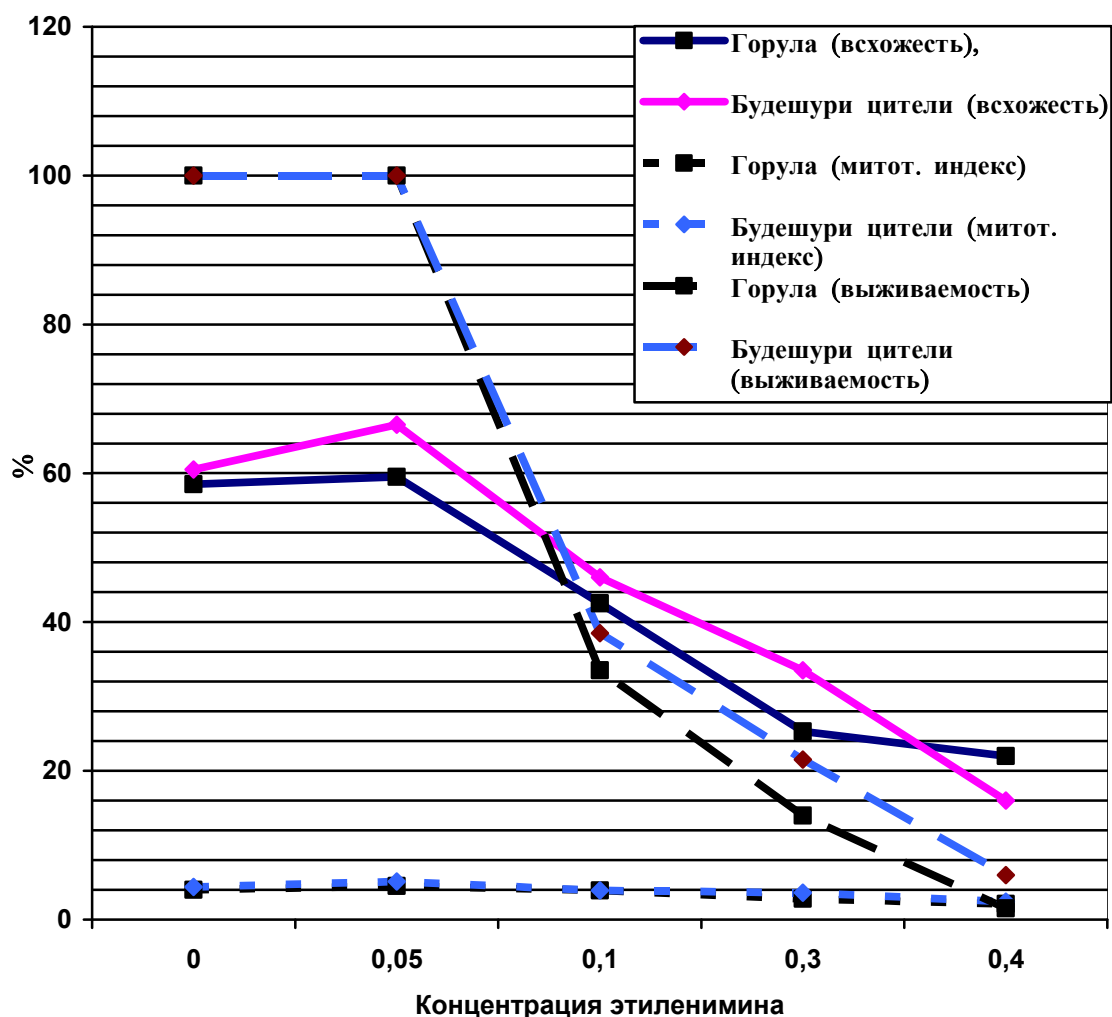
1. Индуцированный мутагенез

Для сельско-хозяйственных культур с высокогетерозисной природой, в том числе и для винограда, все еще проблематична разработка теории и практики индуцирования в сжатые сроки широкого спектра селекционного материала; путем определения и использования эффективных доз мутагенов и их экспозиции выделение из основных производственных сортов винограда большого генофонда растений и оперирование им, размножение и закрепление в вегетативном потомстве полученных изменений.

Для получения в сжатые сроки нового селекционного материала винограда методом индуцированного мутагенеза, воздействию разных доз и концентраций гамма- лучей Cs-137 и синтетического соединения – этиленимина подверглись инцухтированные, стратифицированные семена столовых сортов винограда – Горула и Цители будешури. Была изучена чувствительность к указанным мутагенам по всхожести семян и жизнеспособности полученных сеянцев, по активности клеточного деления и частоте аберрантных клеток.

Обнаружилось стимулирующее влияние 0.005%-ного раствора этиленимина на всхожесть и жизнеспособность семян обеих сортов; увеличилась активность клеточного деления; незначительно возросло число аберрантных клеток (диаграмма 8).

Эффект воздействия этиленимина на всхожесть семян, выживаемость растения и митотический индекс



Повышение концентрации мутагена сопровождалось уменьшением числа всхожих и выживших растений, активности клеточного деления и значительным возрастанием доли aberrantных клеток.

Для обоих сортов критической оказалась концентрация этиленимина – 0.3%; увеличение концентрации до 0.4% вызывает сильное угнетение всхожести и выживания растений, возрастание количества мутаций.

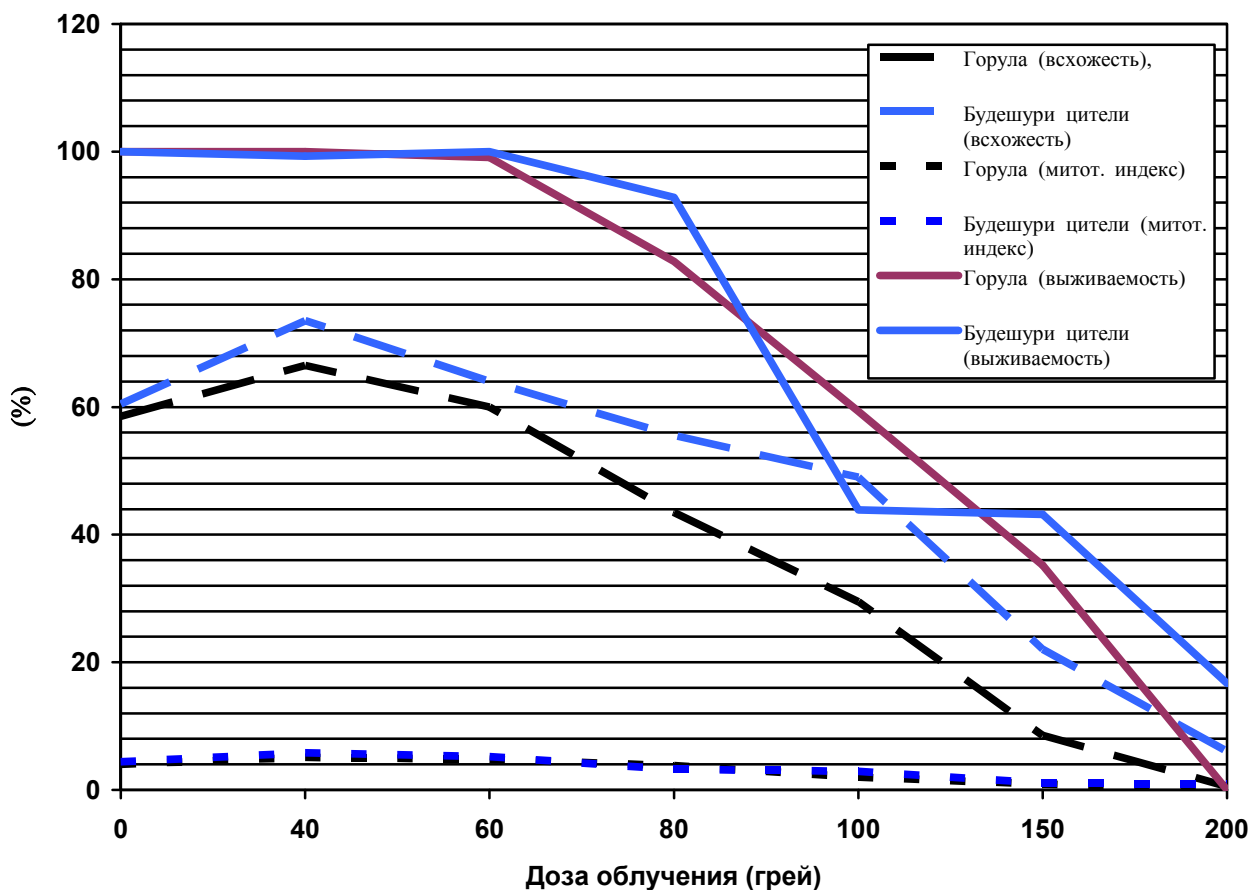
Что касается эффекта воздействия на семена Горула и Будешури Цители Cs-137, облучение низкими дозами (40-60 гр) значительно увеличивает в обоих сортах количество всходших и выживших растений, активность клеточного деления (диаграмма 9).

Увеличение дозы вызывает уменьшение, по сравнению с контролем, количества всхожих и выживших растений. Для Горула критической оказалась доза – 100 гр, для Будешури цители– 150 гр.

Облучение семян в дозах, превосходящих указанные, вызывает сильное угнетение всхожести, однако их значительная часть выживает и дает возможность индуцирования большого количества мутаций и, соответственно, возможность получения широкого спектра нового селекционного материала.

Диаграмма 9

Всхожесть семян обработанных Cs-137, выживаемость растения и митотический индекс



2. Культивация и морфогенез грузинских генотипов винограда In vitro

В последнее время в ряде отраслей растениеводства, при решении теоретических и практических вопросов все шире применяется метод изолированных тканей и органов.

Свойственная культивируемым *In vitro* клеткам и тканям способность морфогенеза растения, является лучшим средством для генетического улучшения сельско-хозяйственных культур, получения и быстрого размножения безвирусного посадочного материала. Из одного изолированного эксплантата можно получить тысячи, свободных от микроорганизмов саженцев, соответственно становится возможным: высвобождение площадей, отведенных под маточные культуры; избежание ущерба, наносимого вредителями и заболеваниями; предотвращение загрязнения среды пестицидами; экономия рабочей силы и средств; быстрое размножение хозяйственно-ценных генотипов и редкого селекционного материала без потерь, которые нередко имеют место при обычном размножении.

Исходя из вышеизложенного, для культивации на искусственной питательной среде изолированного эксплантата сорта Ркацители и изучения морфогенеза растения, первый этап проведенных нами исследований учитывал оптимизацию всех основных факторов, действующих на процессы микроклонарного размножения.

Для морфогенеза растений из изолированной ткани винограда было составлено и испытано 24 модифицированных питательных сред М&S в 10 вариантах и 14 подвариантах.

Как показали результаты исследований по морфогенезу растений из эксплантатов, культивируемых на питательных средах, оптимальной, для получения культуры ткани является модифицированная среда М&S следующего состава: макро- и микросоли по М&S соответственно - 100 мл/л, 1 мл/л, комплекс витаминов Уайта – 1 мл/л, мезоинозит – 100 мг/л, сахара – 20 г/л, агар – 8 г/л и кинетин – 1 мл/л. рН питательной среды – 5.6-5.8.

На указанной питательной среде при температуре $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, влажности – 70-75%, фотопериоде – 16 ч, освещении 6000-8000 люкс и 8 часов темноты в условиях $20-22^{\circ}\text{C}$ температуры, на 4-5-ый день после посева, у более 80% эксплантатов индуцируются почки, а на 9-10 день вокруг зоны колена начинают развиваться корни, количество которых иногда составляет 3-6, и более.

Из листьев, развитых на побеге, нижние часто отстают в размерах от верхних; из почек, расположенных в пазухе листа, вторичные побеги не развиваются.

Спустя 7-8 недель из изолированных эксплантатов получается первичная культура винограда нормального развития, длина побега которого составляет 10-12, а корней – 4.0-4.5 см; культура готова для следующего размножения.

3. Мутагенный эффект биологически активных веществ, входящих в состав питательной среды при культивации изолированных тканей винограда *In vitro*

Учеными [Cauthret, 1959; Mitra, Stward, 1970] установлено, что в процессе культивации тканей *In vitro* часто имеют место аномалии, проявляющиеся в виде многоядерных клеток, гаплоидных и полиплоидных ядер и хромосомных aberrаций.

Возникшая в культуре ткани генетическая нестабильность выражается изменением структуры и числа хромосом, нарушением процесса митоза, причиной чего ученые [Steward, 1958; Torry, 1962; Blakely, 1962; Shamina, 1970; Вашакидзе, 1971; Melchers, 1978; Фролова, 1981] считают некоторые вещества, входящие в состав питательной среды: кинетин, 2.4D, АНУ и до., длительное время культивации, гетерогенность материала, нарушение корреляционных взаимоотношений между клеточными органеллами во время изоляции.

Отмеченные особенности культивированной *In vitro* ткани указывают на возможность применения метода для получения генетически измененных растений и обязательный, при микроклонарном размножении, генетический контроль поколений.

Исходя из отмеченного, на культивированных *In vitro* клетках были изучены генетическая активность воздействия входящих в питательную среду биологически активных веществ: кинетина, феруловой к-ты, индолилуксусной к-ты, 2.4D, вещества №4 и генетическая стабильность полученного растения.

Как показывают результаты микроскопического анализа, наличие в питательной среде 1 мг кинетина, 1 мг феруловой к-ты, 0.2 мг индолилуксусной к-ты (по отдельности) вызывает стимуляцию деления культивированных клеток, индекс которого составляет $6.18 \pm 0.58 - 6.52 \pm 0.39$, и намного превышает контроль (5.75 ± 0.31).

Максимальным показателем клеточного деления (6.52 ± 0.39) характеризуются меристематические клетки растений-регенерантов, культивированных на модифицированной питательной среде M&S, содержащей 1 мг/л кинетина; при внесении в питательную среду 1 мг/л феруловой к-ты и 0.2 мг/л ИУК этот показатель снижается, и соответственно, составляет 6.33 ± 0.38 , но все-таки превышает контроль. При наличии в питательной среде 100 мг/л вещества №4 не происходит стимуляция деления клеток меристематической ткани корней культивированного растения-регенеранта, оно остается в пределах нормы.

В клетках растений-регенерантов, культивированных на питательной среде с 0.2 мг/л α -нафтилуксусной к-ты, 1 мг/л 2.4D и 1 мг/л картолина (по отдельности), процесс деления несколько замедлен ($4.18 \pm 0.32 - 1.55 \pm 0.20\%$). Минимальным индексом деления характеризуются растения-регенеранты, индуцированные на питательных средах, содержащих 1 мг/л 2.4D и 1 мг/л картолин, их митотическая активность, соответственно – 1.55 ± 0.20 и $1.97 \pm 0.22\%$. Несколько высокой активностью ($4.18 \pm 0.32\%$), но значительно низкой, по сравнению с контролем, характеризуются клетки, культивированные на питательной среде с 0.2 мг/л АНУ. Высокая достоверность разницы в полученных результатах между средними величинами ($p < 0.001\%$) явно указывает о цитогенетическом эффекте воздействия на делящиеся клетки внесенных в питательную среду 1 мг/л 2.4D, 1 мг/л картолина и 0.2 мг/л АНУ и о стимулирующей роли 1 мг/л кинетина, 1 мг/л феруловой к-ты и 0.2 мг/л ИУК.

Что касается геномных и хромосомных изменений под влиянием биологически активных веществ, входящих в состав питательной среды в культивированных *In vitro* растениях-регенерантов, они не индуцируются при наличии в питательной среде 1 мг/л кинетина, 1 мг/л феруловой к-ты, 0.2 мг/л индолилуксусной к-ты и 100 мг/л вещества №4, кариотип нормальный.

ВЫВОДЫ

В результате анализа материалов исследования стабильности и изменчивости фенотипических признаков грузинских генотипов винограда, проведенных на клеточном и организменном уровнях, сделаны следующие выводы:

1. Критерии меристематической клетки: длина 16.3-19.7 мкм, ширина 10.0-14.1 мкм, диаметр ядра 4.2-6.0 мкм, ядерно-плазменный коэффициент 0.065-0.133. Доля места происхождения сорта (с точностью $p < 0.01$), на изменчивость длины 16.5%, ширины – 17.43% и диаметра ядра – 38.87%.

– число хромосом, как для диких и одичавших, так и культурных, а также полученных научной селекцией сортов и форм, в основном диплоидно – $2n=38$, хотя среди

них выделяются клоны Цоликоури, Саперави, Ркацители и Горули с тетра- и триплоидным, диплоидно-тетраплоидным строением.

– активность деления клеток $4.8 \pm 0.2 - 8.6 \pm 0.3\%$; количество aberrантных клеток в пределах нормы; различается по сортам в пределах $0.3 \pm 0.02\% - 2.3 \pm 0.9\%$ и представлено как в пресинтетический, так и постсинтетической стадии.

2. Пыльцевым зернам двуполых сортов в воздушносухом состоянии присуща форма пшеничных зёрен, длина которых $21.1 \pm 0.9 - 38.8 \pm 0.3$ мкм, ширина $14.7 \pm 0.2 - 23.0 \pm 0.9$ и диаметр $18.1 \pm 0.3 - 27.9 \pm 0.4$ мкм-ов.

Место происхождения сорта винограда с точностью $p < 0.01$, ответственно за 43.44%, изменчивости длины пыльцевых зёрен, 46.0% - ширины и 51.19% – диаметра.

Двуполые сорта винограда трёхпористые, их число находится в пределах $67.62 \pm 4.4 - 98.3 \pm 2.6\%$, а остальные, из-за нарушения процесса микроспорогенеза беспоровые. Пыльцевые зёрна функционально женских сортов винограда, в основном, беспоровые, хотя на протяжении нескольких лет зафиксированы единичные случаи существования трёхпоровых зёрен ($0.4 \pm 1.3 - 2.5 \pm 1.4\%$).

– двуполые сорта винограда высокофертильные ($69.2 \pm 2.7 - 98.9 \pm 0.5\%$), а абсолютное большинство функционально женских сортов, кроме $0.6 \pm 0.4\%$, организованно стерильны, которые не могут нормально оплодотворяться, но они способны стимулировать развитие мелких бессемянных ягод;

– по показателям прорастания пыльцевых зёрен на искусственных питательных средах сорта делятся на три группы: а) высоко- ($70-90\%$), б) средне- ($38-70\%$), г) низкопрорастающие ($>30\%$). Жизнеспособность пыльцевых зёрен 7-10 дней.

Наличие фертильных пыльцевых зёрен в функционально женских сортах винограда и случаи прорастания на искусственных питательных средах делает реальным поиск таких клонов, в соцветиях которых рядом с функционально женскими цветками, в большом количестве будут представлены двуполые цветки.

3. В грузинских генотипах винограда на нижнем эпидермисе листовой пластинки на единицу площади (1мм^2) расположены в среднем 182 устьиц, критерии которых в зависимости от сорта и места произрастания различны: длина 23-28 мкм, ширина 18-20 мкм, количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц 29-36; место происхождения сорта с точностью $p < 0.01$, ответственно за изменчивость существующих на единицу площади количества устьиц на 43.7%, длины – 43.68%, ширины – 26.84%, количества хлоропластов в замыкающих клетках устьиц – 51.19%.

4. Критерии меристематических клеток, пыльцевых зёрен и аппарата устьиц нижнего эпидермиса листовой пластинки, согласно коэффициенту изменчивости, почти для всех сортов являются признаками высокого постоянства и незначительной изменчивости ($10\% < C_v < 20\%$). Опираясь на данные показатели можно успешно моделировать тест-систему для идентификации сортов как с теоретической, так и практической точки зрения.

5. В результате кластерного анализа показателей критериев клетки установлена справедливость идеи Д. Табидзе о грузинском происхождении Цулукидзис тетра и его распространении из Грузии в Европу.

6. При исследовании с использованием тест-системы установлен характер наследования хозяйственно-ценных признаков высокоурожайных клонов, выделенных из грузинского генофонда винограда: Цицка №1298, Крахуна №1170, Оцханури сапере №1260, Цоликоури №1093 и Горула №21 и, соответственно, целесообразность их размножения. На примере клона Горула №21 создана модель для идентификации клона в сжатые сроки.

7. Установлено влияние повышенной концентрации тяжёлых металлов, существующих в почвах села Хатисопели Болнисского р-на, степень их токсичности и цитогенетическая активность на клетки сортов винограда: Ркацители, Саперави, Тавквери и Картлис тита. Показана целесообразность использования производимой здесь продукции.

8. Полученные из отходов винограда лигнин-кремниевые комплексные препараты (автор М. Бежуашвили) ЛКП-1 и ЛКП-2 представляют собой экологически чистые стимуляторы (митотическое деление меристематических клеток $5,6 \pm 0,4 - 7,5 \pm 0,4\%$), при использовании которых, по сравнению с контролем, на 2-3 недели ускоряется укоренение побегов. В меристематических клетках полученного саженца геномные изменения не индуцируются. Структурные изменения хромосом находятся в пределах нормы ($0,9 \pm 0,05 - 1,5 \pm 0,4\%$), саженец цитогенетически стабилен.

Оптимальная концентрация стимуляторов 2 г/л (экспозиция обработки 48 часов).

9. Лигнин-полисахаридный комплексный препарат, полученный из гребней винограда (авторы: Л. Муджири, Е. Калатозишвили) представляет собой экологически чистый биостимулятор, использование которого, по сравнению с контролем, на 3-4 дня ускоряет процесс развития корней. Оптимальная концентрация 1/40, а экспозиция – 72 часа.

10. Применение биоактиватора Биорага (концентрация 0.002%) даёт возможность получить цитогенетически стабильный высококачественный привитый саженец. Число хромосом $2n=38$, а частота анафазных aberrаций в пределах контроля ($2.1 \pm 6.6\%$).

11. В процессе изучения типа опыления и плодообразования генотипов грузинского винограда выяснилось аддитивное воздействие самоопыления и перекрёстного опыления, характерное для грузинского генотипа, среди которых ведущая роль принадлежит самоопылению. Изменчивость показателя завязи по типу опыления определено генотипом.

В клоне Горула №21 зафиксировано не совсем характерное для винограда явление полиэмбрионии – развитие из одного семени двух растений.

В функционально женских сортах исключена абсолютная стерильность пыльцевых зёрен, установлена возможность частичного оплодотворения собственной пыльцой и реальность поиска таких клонов, соцветия которых содержат в большом количестве двуполые цветы, что обеспечит закладку чистых насаждений и отвод тех сложностей и расходов, что имеет место при искусственном опылении или смешанной закладки виноградников.

Подтверждено существование регулярного апомиксиса; показана возможность получения ягод с нормально развитыми семенами путём самоопыления и апомиксиса.

12. На примере сорта Тавквери, разработана научно обоснованная схема подбора наилучших сортов-опылителей для всех функционально женских сортов винограда: совпадение фаз цветения → степень оплодотворения → восприимчивость рылец цветков → прорастание пыльцевой трубки в столбик пестика → оплодотворение → плодообразование → механический состав гроздей и ягод и перспектива его использования для всех функционально женских сортов винограда с целью подбора научно-обоснованных сортов-опылителей, а практический выход - составление рациональной схемы закладки виноградников, дающих обильный и качественный урожай.

13. Установлено отличие аллелей $S_1S_2 \times S_3S_4$ S локусов, контролирующих развитие пыльцевых трубок и столбиков пестика сортов Тавквери, Ркацители, Чинури и Горули Мцване, и соответственно их гаметофитная совместимость и перспектива использования всех трёх, как наилучших сортов-опылителей.

14. Методом *In vitro* для микроразмножения растений, а также для получения широкого спектра новых селекционных материалов, из изолированных эксплантантов возможен морфогенез растений, если будут соблюдены строгие асептические условия, материал пройдёт соответствующую стерилизацию, для культивирования будет использована модифицированная питательная среда M&S: макро и микросоли, соответственно, 100 мг/л и 1 мг/л, комплекс витаминов Уайта – 1 мг/л, мезоинозит – 100 мг/л, сахароза – 20 г/л, агар 8 г/л и кинетин – 1 мг/л, рН питательной среды – 5.6-5.8. Культивирование изолированных эксплантантов пройдёт при $t 27 \pm 1^\circ\text{C}$, относительной влажности 70-75%, фотопериода 16 часов, освещения 6000-8000 люкс и 8 часов в темноте при $t 20-22^\circ\text{C}$.

При соблюдении данных условий, через 7-8 недель после посева, из изолированных тканей (на 80%) формируется нормально развитое растение с длиной побега 10-12 см, 4-4.5 см корней и хорошо развитыми 8-10 междоузлиями, готовое для последующего размножения.

16. *In vitro*, полученные на подобранных для морфогенеза растения питательных средах (при наличии кинетина (1 мг/л), индолуксусной к-ты (0.2 мг/л) и ферулевой к-ты (1 мг/л)) растения-регенеранты цитогенетически стабильны и питательные среды возможно использовать для микроразмножения грузинских генотипов винограда, а наличие в питательной среде картолина и альфанафтилуксусной к-ты (0.2 мг/л) и 2,4-дихлорфеноксиуксусной к-ты (1 мг/л) геномные и хромосомные изменения индуцируются и возможно получение генетически неидентичных растений регенерантов..

РЕКОМЕНДАЦИИ

На основе экспериментальных материалов, полученных при исследовании, стабильности и изменчивости фенотипических признаков грузинского винограда традиционными методами и по требованиям дескрипторов винограда, рекомендовано:

I. Для науки:

- цитологические и анатомические маркеры грузинских сортов допущенных к распространению по закону о винограде и вине;
- тест-система для идентификации в сжатые сроки сорта и клона;
- Модель определения клона: комплексное исследование внешних и внутренних фенотипических признаков по традиционно-ампелографическим методам, современным дескрипторам винограда и разработанной нами тест-системе (морфобиологические параметры меристематических клеток, пыльцевых зерен, критерии устьичного аппарата листового эпидермиса- ядерно-плазменный коэффициент, активность клеточного деления – плоидность- цитогенетика; фертильность пыльцевых зерен – жизнеспособность; количество устьиц на единицу площади листа – количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц и др.).
- новый, простейший метод для исследования эпидермиса листовой пластинки; фиксация 0.5 см-вых вырезок листьев 8-12 яруса (фиксатор Корнуа 3:1; время – 24 ч), окраска (краситель – модифицированный р-р иодистого калия, длительность окраски – 15 мин при 50°C t, в водяной бане), приготовление временных недавленных препаратов.

II. Для практической селекции винограда: применением методов индуцированного мутагенеза и *In vitro* установлены закономерности получения широкого спектра селекционного материала;

1. а) оптимальные дозы обработки мутагенами инкутированных семян винограда и экспозиция: в случае применения Cs-137 80-100 грей (экспозиция 5.50 грей/мин), а для этиленимина - 0.1-0.2%-ый раствор (экспозиция 24 часов);

б) культивация изолированных в *In vitro* на M&S модифицированной питательной среде, к которой вместо кинетина добавляется 0.2 мг/л картоли, или 1 мг/л 2.4D.

2. в виноградниках, заложенными функционально женскими сортами, поиск и размножение таких клонов, соцветия которых в большом количестве содержат двуполые цветы, что обусловит сохранение сортовой чистоты и позволит исключить сложности и расходы, связанные с закладкой виноградников и проведения сбора урожая.

III. Для производства:

1. Для размножения винограда – для получения цитогенетически идентичного посадочного материала и привитого саженца экологически чистые биостимуляторы:

а) препараты лигнин-кремниевого комплекса: ЛКП-1, ЛКП-2 (оптимальная концентрация 2 г/л, экспозиция 48 часов)

ბ) препарат №1 лигнин-полисахаридного комплекса (оптимальная концентрация 1/40, экспозиция 72 часов), а также

в) биоактиватор биораг (концентрация 0.02%, экспозиция 24 часов);

г) Для микроклонарного размножения винограда In vitro, для получения цитогенетически идентичного микроклона модифицирована питательная среда M&S (макро и микросоли по M&S, соответственно, 100 мл/л и 1 мл/л, комплекс витаминов уайта 1 мл/л, мезоинозит 100 мл/л, сахараза 20 г/л, кинетин 1 мл/л; рН питательной среды 5.6-5.8) и режим культивирования (в условиях температуры $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, влажности 70-75%, 16 часового фотопериода, освещения 6000-8000 люкс и 8 часов темноты, $20-22^{\circ}\text{C}$ t).

2. Для получения высокого и качественного урожая из функционально женских сортов винограда, на примере Тавквери разработана модель подбора научно-обоснованного сорта опылителя (совпадение фаз цветения → установление степени оплодотворяемости опылителей → восприимчивость рыльцев цветка → плодообразование → механический анализ полученных гроздей и ягод).

გამოქვეყნებული შრომების სია

საერთო რაოდენობა-125, მათ შორის დისერტაციის თემაზე:

Список опубликованных трудов

Общее число-125, среди них по теме диссертации:

1. ემბრიონალურ სტადიაში მყოფი ვაზის ჩანასახებისა და ქსოვილების ხელოვნურ საკვებ არეებზე აღზრდის (In vitro) საკითხებისათვის. მმსკი-ის შრომები. ტ. 19-20. თბილისი, 1971. გვ. 394-401.
2. ზოგიერთი ბოტანიკური და სამეურნეო ნიშნების მემკვიდრულობის ხასიათი ვაზის ჯიშთაშორის შეჯვარებებში. მმსკი-ის ახალგაზრდა მეცნიერ მუშაკთა სამეცნ. შრომათა კრებული. ტ. 2. თბილისი, 1972. გვ. 307-317.
3. ვაზის კალუსისა და ფესვის წარმოქმნის საკითხისათვის. მმსკი-ის შრომათა კრებული. ტ.22. თბილისი, 1973. გვ. 22-27. (მოსაშვილი ვ. ა.).
4. ხელოვნურ საკვებ არეზე ვაზის იზოლირებული ჩანასახებისა და ქსოვილების აღზრდის პირობების შესწავლა. სოფ. მეურნეობის საკითხებზე რესპუბ. სამეცნიერო-ტექნიკური კონფერენციის მასალები. თბილისი, 1973. გვ. 19-20.
5. Культура изолированных зародышей и тканей, как метод селекции винограда. Мат-лы Межд. стмпозиума, посвящ. 75-летию открытия акад. С. Г. Навашиним двойного оплодотворения у покрытосеменных растений. Москва, 1973. стр. 34-35.
6. Вопросы наследования морфологических признаков в при межрасовых скрещиваниях сортов винограда. Тезисы Закавказской конференции научн. сотр. по виногр., винод. и субтроп. культур. Ереван, 1973. стр. 4-5.

7. Разработка методов выращивания зародышей и тканей винограда на искусственной среде /In vitro/. В сб. «Садоводство и виноградарство – на промышленную основу – НИИСВиВ Молдавии, Кишинев, 1974. стр. 153.
8. ვაზის ოზოლირებული ქსოვილების კულტურა (In vitro). მმსკი-ის სამეცნ. შრომები. ტ. 24. თბილისი, 1976. გვ. 98-102.
9. სელექციურ-გენეტიკური სამუშაოებისათვის მეთოდების შემუშავება. დამთ. თემა. უაკ 581,167:631,52. სახ. რეგ. №680449895. № 6542592. მმსკი. თბილისი, 1975
10. ვაზის კალუსის ქსოვილის ციტოლოგიური კვლევის შედეგები. V რესპ. სამეცნ.-ტექნ. კონფერენციის მოხსენ. თეზისები. თბილისი, 1975. გვ. 528-530.
11. ვაზის ქსოვილებისა და უჯრედების (In vitro) ციტომორფოლოგიური ცვლილებების შესწავლა. მეცნიერ-ბიოლოგების II სამეცნ. კონფერენციის მასალები. თბილისი, 1976.
12. Цитологические изменения клеток каллуса /In vitro/. Материалы III съезда Груз. общества генетиков и селекционеров АН ГССР. Тбилиси, 1977. стр. 31-32.
13. О цитогенетическом эффекте кинетина и 2.4 Д в культуре ткани винограда /In vitro/. Материалы III съезда ВОГ и С им. Н. И. Вавилова. Ленинград, 1977.
14. ვაზის კულტურის მისაღებად ოპტიმალური საკვები არის დადგენა. მმსკი-ის შრომები. ტ. 25. თბილისი, 1978. გვ. 307-312. (ბ. ა. ბეჟუაშვილი).
15. Изучение влияния гамма-лучей Co^{60} на виноградную лозу. Тр-ды ВНИИЧиСК, Субтропические культуры. Махарадзе-Анасеули, 1979. стр. 72-73. (გიგიავა Э., Бежуашвили Н.).
16. ვაზის ქსოვილის კულტურის (In vitro) ციტოგენეტიკური დახასიათება. მმსკი-ის შრომები. ტ. 26. თბილისი, 1979. გვ. 199-202. (ბ. ბეჟუაშვილი).
17. Опыты по подбору оптимальной питательной среды культуры тканей винограда /In vitro/. Тезысы докл. конференции посв. 70 лет юбилею Молд. НИИСВиВ. Кишинёв. 1980. стр. 83-85.
18. Мутационная изменчивость в клетках каллусной меристемы винограда. Тезысы докл. межд. совещ. «Генетика развития растений», Ташкент, 1980. стр. 105.
19. გენეტიკური ცვლილებები ვაზის ქსოვილის კულტურაში (In vitro). მმსკი-ის შრომები. ტ. 28. თბილისი, 1981. გვ. 175-180.
20. Особенности действия некоторых химических веществ на культуре тканей виноградной лозы. Мат-лы IV съезда ГОГиС. Тбилиси, 1981. стр. 42-44. (Наскидашвили Н.).
21. Изучение эффективности химических веществ на развитие каллусной ткани винограда в изолированной культуре. Тез-сы докл. совещ. химический мутагенез в повышении урожайности с/х культур. Москва, 1981. стр. 15. (Мосашвили В.).
22. Индуцированный мутагенез у винограда. Мат-лы IV съезда ГОГиС. Тбилиси, 1981. стр. 47-48. (Гогиава Э., Мосашвили В.).
23. Хромосомные и геномные изменения в клетках каллусной меристемы /In vitro/. Мат-лы IV съезда ВОГиС, Н.И. Вавилова. Кишинев 1981. стр. 44-45.
24. Биологические особенности грузинских сортов винограда при скрещивании. Сборник мат-ов межд.совещ. «Продуктивность субтр. культур». Махарадзе – Анасеули, 1982. стр. 71-72. (Гогиава Э.).

25. Некоторые особенности грузинских сортов винограда при спонтанном опылении и самоопылении. Тез-сы Всесоюз. совещ. по проблеме повышения эффектив. Винограда и виноделия. Грозно, 1982. стр. 73.
26. Изучение эффективности действия некоторых химических веществ на клетки каллусной меристемы винограда. Тез-сы Всесоюз. совещ. Одесса, 1982. стр. 5.
27. Результаты опыления некоторых грузинских сортов винограда. Тез-сы Всесоюз. совещ. по опылению растений, посв. 85 лет. открытия двойного оплодотворения покрытосеменных растений. Ленинград. 1985, стр. 33.
28. Специфичность действия картолина в культуре ткани винограда. Мат-лы V съезда ГОГиС. Тбилиси. 1986. стр. 48-49. (Каландадзе М. А.).
29. Культура меристемы винограда. Мат-лы V съезда ГОГиС. Тбилиси. 1986. 47-48.
30. Радиационный эффект гамма-лучей на винограда. Мат-лы V съезда ГОГиС Тбилиси. 1986. стр. 49-50. (Квалиашвили В. Р.).
31. К вопросу применения гамма излучения в селекции винограда. Материалы межд. конференции по селекции винограда. Кишинёв, 1987. стр. 17-18. (Квалиашвили В. Р.).
32. Генетическая стабильность потомства при клональном размножении винограда в культуре ткани /In vitro/. Мат-лы V съезда ВОГиС. т. IV, ч3. Москва, 1987. стр. 353.
33. Некоторые вопросы морфогенеза растений в культуре ткани винограда /In vitro/. Материалы межд. научной конференции, посв. 100 л. со дня рожд. акад. Н. Н. Вавилова. Тбилиси, 1987. стр. 106-107.
34. Действия химических веществ на цитогенетику клетки винограда /In vitro/. Материалы межд. научной конференции, посв. 100 л. со дня рожд. акад. Н. Н. Вавилова. Тбилиси, 1987. стр. 117. (Наскидашвили И. П., Каландадзе М. А.).
35. Генетическая идентичность потомства при клональном размножении виноградной лозы. Тез-сы докл. международ. конференции «Биология культивирования клеток и биотехнология. Новосибирск, 1988. стр. 161-162.
36. ვაზში პოლიემბრიონიის მოვლენის შესწავლისათვის. სიმპოზიუმის მასალები მცენარეთა მორფოლოგიის საკითხებზე. თბილისი-ვეჯიზი, 1990. გვ. 10.
37. Предварительные данные по изучению мутагенного эффекта в культуре тканей винограда. Тез-сы докл. совещания повышению качества сортов с.х. культур методом химического мутагенеза. Москва, 1979. стр. 15. (Гогиава Э. Ш.).
38. Перспективность использования мутагенов в культуре тканей винограда. Тез-сы докл. совещания по созданию качества сортов с/х культур методом химического мутагенеза. Москва, 1980. стр. 16. (Каландадзе М. А.).
39. Мутации клеток в культуре ткани винограда под действием химических мутагенов. Тез-сы докл. совещ. химический мутагенез в повышении продуктивности с/х культур. Москва, 1982. стр. 14. (Каландадзе М. А., Наскидашвили И. П.).
40. Изучение влияния химических мутагенов на развитие каллусной ткани в изолированной культуре. Тез-сы докл. совещ. “химический мутагенез в повышении продуктивности с/х культур”. Москва, 1983. стр. 17. (Каландадзе М. А., Наскидашвили И. П.).

41. Вариация морфогенеза у винограда. Тез-сы докл. совещ. «Хеномутанты в селекций культурных растений. Москва, 1984. стр. 17. (Каландадзе М. А., Наскидашвили И. П.).
42. The study of polyembryony in vine. International symposium on ANGIOSPERM POLLEN AND OVULES BASIC AND APPLIED ASPECTS. Villa, Olmo, Como, 1990. p. 71. (L. Kharitonashvili, V. Kvaliashvili).
43. ვაზის იზოლირებული ქსოვილების ხელოვნურ საკვებზე აღზრდისას (In vitro) მუტაგენური ეფექტის შესწავლა. დამთ. თემა. უკ 575.1:581.143.6:634.8. მმსკი. თბილისი, 1991. გვ. 1-85.
44. In vitro და ვაზის მიკროკლონალური გამრავლება. საქ. სოფლ. მეურნ. მეცნიერებათა აკადემიის გენოცენტრის სამეც.-პრაქტ. კონფერენციის მასალები. თბილისი, 1994. გვ. 114-115. (ი. ნასყიდაშვილი).
45. In vitro-ში კულტივირებული მცენარეების ციტოგენეტიკური ჰეტეროგენურობა. საქ. სოფლ. მეურნ. მეცნიერებათა აკადემიის გენოცენტრის სამეც.-პრაქტ. კონფერენციის მასალები. თბილისი, 1994. გვ. 111-112.
46. In vitro-ში კულტივირებული მცენარე-რეგენერანტზე საკვებ არეში შემავალი ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების ციტოგენეტიკური ეფექტი. მმსკი-ის შრომათა კრებული. თბილისი, 1993-1994. გვ. 311-320.
47. In vitro-ში კულტივირებული ვაზის იზოლირებული ჩანასახებიდან მცენარეთა მორფოგენეზი. ლ. დეკაპრელევიჩის დაბად. 110 წლისთავისადმი მიძღვნილი საერთაშორისო სამეცნ. კონფერენციის მოხსენებათა კრებული. ნაწ. I, თბილისი, 1997. გვ. 253-254. (ი. ნასყიდაშვილი).
48. ვაზის იმერული ჯიშებისა და მათი კლონების ფოთლის ეპიდერმისის აგებულება. მმსკი-ის სამეცნ. შრომათა კრებული, მიძღ. აკად. ნ. ხომიზურაშვილის 100 წლისთავისადმი. თბილისი, 2000. გვ. 123-128.
49. ვაზის ჯიშ სუფრის გორულას და მისი კლონის ციტოგენეტიკური თავისებურებანი. მმსკი-ის სამეცნ. შრომათა კრებული, მიძღ. აკად. ნ. ხომიზურაშვილის 100 წლისთავისადმი. თბილისი, 2000. გვ. 139-145. (ვ. გურასაშვილი).
50. სუფრის გორულას და მისი კლონის მიკროსპოროგენეზი. ჟურნალი “ვაზი და ღვინო”, 3 (27). თბილისი, 2000. გვ. 74-80. (ვ. გურასაშვილი).
51. ვაზის ქართული გენოტიპების – გორულას და მისი კლონის ამპლომეტრიული პარამეტრები. აგრარული მეცნიერების პრობლემები, ტ. XV, თბილისი, 2001. გვ. 51-54. (ვ. გურასაშვილი).
52. ვაზის ქართული სასუფრე ჯიშის გორულას და მისი კლონის მტვრის მარცვლის თავისებურებანი. აგრარული მეცნიერების პრობლემები, ტ. XV, თბილისი, 2001. გვ. 55-59. (ვ. გურასაშვილი).
53. ვაზის ჯიშ გორულას და კლონი №21-ის ზოგიერთი ხარისხობრივი ნიშანი, მათი ცვალებადობა და შედარებითი ანალიზი. აგრარული მეცნიერების პრობლემები, ტ. 19, თბილისი, 2002. გვ. 107-114. (ვ. გურასაშვილი).

54. ავტოპოლიპლოიდია ვაზის ქართულ გენოტიპებში და In vitro-ში მისი ინდუცირების შესაძლებლობანი. მებ., მევ. და მეღ. ს-კ ინსტიტუტის სამეცნიერო შრომების კრებული (საიუბილეო ტომი). თბილისი, 2002-03. გვ. 33-43.
55. ვაზის ქართული გენოტიპების გორულას და მისი კლონი 121-ის ზოგიერთი ხარისხობრივი ნიშანი და მათი ცვალებადობა. მებ., მევ. და მეღ. ს/კ ინსტიტუტის სამეცნიერო შრომების კრებული (საიუბილეო ტომი). თბილისი, 2002-03. გვ. 53-59. (გურასაშვილი ვ., ცერცვაძე ნ.).
56. თავკვერისა და მისი დამამტვერიანებელი ვაზის ჯიშების პალინომორფოლოგიური გამოკვლევა. აგრარული მეცნიერების პრობლემები, ტ. XXV, თბილისი, 2003. გვ. 68-71. (ჩხარტიშვილი ნ., მდინარაძე ი.).
57. ვაზის ჯიშ გორულას დამტვერვის ტიპი და გამონასკვის მაჩვენებელი. აგრარული მეცნიერების პრობლემები, ტ. XXVI, თბილისი, 2004. გვ. 72-75. (გურასაშვილი ვ.).
58. Образование мужского гаметофита и особенности пыльцевых зерен сорта винограда Горула. Виноградство и виноделие». Ялта, 2003. стр. 15-16. (Гурасашвили В. Т., Мдинарадзе И. Б.).
59. დამამტვერიანებლის გავლენა ვაზის ჯიშ თავკვერის ნაყოფწარმოქმნის პროცესზე. აგრარული მეცნიერების პრობლემები, ტ. XXVI, თბილისი, 2004. გვ. 75-78. (ჩხარტიშვილი ნ., მდინარაძე ი.).
60. თავკვერის ყურძნის წვენის ბიოქიმიური მაჩვენებლები. ჟურნალი "მეცნიერება და ტექნოლოგიები", № 1-3, თბილისი, 2004. გვ. 101-104. (ჩხარტიშვილი ნ., კალატოზიშვილი ე., მდინარაძე ი.).
61. წითელყურძნიანი ვაზის ჯიშების თამარის ვაზისა და საწურავის მტვრის მარცვლის თავისებურებანი. აგრარული მეცნიერების პრობლემები, ტ. XXVII, თბილისი, 2004. გვ. 70-72. (მამასახლისაშვილი ლ.).
62. Some Chemical-Technological Indices of Red Vine Sorts Spread in Meskheta Region. Bulletin of the Georgian Academy of Sciences. Vol.170. №1, Tbilisi, 2004. p. 158-160. (Mamasaklisashvili L., Kalatozishvili D., Saralidze A.).
63. Лучшие опылители для сорта винограда Тавквери. Ж. Виноделие и виноградарство, №1, Москва, 2005. стр. 42-43. (Чхартишвили Н.С., Мдинарадзе И. Б., Гурасашвили В. Т.).
64. თავკვერის დინგის მიმღებიაზობა. საქ.ს/მ მევ. აკადემიის ჟურნალი "მოამბე", ტ. 13, თბილისი, 2005 წლის მაისი. გვ. 30-32. (ჩხარტიშვილი ნ., მდინარაძე ი.).
65. ანთროპოგენური ფაქტორების გავლენა ვაზის ზოგიერთი გენოტიპების მერისტემული უჯრედების პარამეტრებზე. აგრარული მეცნიერების პრობლემები, ტ. XXX, თბილისი, 2005. გვ. 65-68. (ნასყიდაშვილი ი., გურასაშვილი ვ.).
66. Type of pollination indices of fruit sets of some Georgian grapevine varieties.// VITIS, 45, issue, (4), 2006, p. 153-156 (N.Chartishvili, V. Gurasashvili, D. Maghradze).