

УДК 683.581.167

В. В. ВЛАСОВ, д. с.-г. н., ст. н. с., член-кор. НААН України, дир. ін-ту,  
Н. А. МУЛЮКІНА, д. с.-г. н., ст. н. с., заст. дир.,  
М. І. ТУЛАЄВА, к. б. н.  
І. А. КОВАЛЬОВА, к. с.-г. н., зав. від.,  
В. С. ЧІСНІКОВ, к. с.-г. н., зав. лаб.,  
Л. О. КОНУП, к.б.н., зав. лаб.,  
О. М. КАРАСТАН, н. с., зав. сект. мол. ген.,  
Д. Ю. ЛОСЕВА, асп.  
ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова»  
e-mail: tairmna2005@ukr.net

## **ДНК-ТЕХНОЛОГІЇ У ДОСЛІДЖЕННІ ВИНОГРАДУ (*Vitis vinifera* L.) В ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. ТАЇРОВА»: МЕТОДИЧНІ ТА ІСТОРИЧНІ АСПЕКТИ**

*Подається стислий опис основних етапів застосування ДНК-технологій у вивченні винограду (*Vitis vinifera* L.) різного спрямування в ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова». Охарактеризовано методичну базу та основні результати досліджень молекулярно-генетичного поліморфізму винограду та ДНК-ідентифікації збудників вірусних, бактеріальних та фітоплазмових його хвороб. Показано, що застосування ДНК-технологій в селекції та клоновій селекції винограду, а також у системі санітарного контролю у виробництві садивного матеріалу європейської категорії «сертифікований» є підґрунтям підвищення ефективності селекційного процесу цієї культури.*

Ключові слова: *виноград, молекулярно-генетичний поліморфізм, мікросателітні маркери, вірусні та фітоплазмові хвороби винограду, бактеріальний рак винограду, полімеразна ланцюгова реакція.*

**Вступ.** ДНК-технології широко використовуються в дослідженні різноманітних аспектів генетики, селекції та фітопатології винограду. Дев'яності роки минулого сторіччя були означені на цьому шляху розробкою та впровадженням кількох методичних підходів, зокрема використанням ПДРФ-аналізу для диференціації сортів винограду [1] та використанням аналізу дволанцюгової РНК для детекції та ідентифікації вірусів винограду [2].

Трохи пізніше головним інструментом на обраних нами напрямках досліджень сортів винограду та його патогенів стає полімеразна ланцюгова реакція, яка виявилась більш зручним та чутливішим інструментом.

ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» (на той час НВО з виноградарства та розсадництва) в зазначений вище період розпочинає широкомасштабну

програму з розробки наукового забезпечення сертифікованого виноградного розсадництва на базі нещодавно створеного Центру клонової та фітосанітарної селекції винограду. Оскільки програма в її європейському розумінні охоплює такі напрями, як клонова селекція, прискорене розмноження унікальних генотипів та отримання вихідного безвірусного садивного матеріалу, виникла потреба в залученні ДНК-технологій.

Можливості, які пропонували наведені вище методичні підходи, не залишилися непоміченими. Виконання блоку зазначених тут завдань було розпочато на першому етапі (1991–1995) за допомоги відділу молекулярної генетики Селекційно-генетичного інституту під керівництвом академіка НААН Ю. М. Сиволапа. У подальшому (2001–2015) переважна більшість завдань з розробки та використання ДНК-технологій у дослідженнях виконувалася в рамках ПНД (програм наукових досліджень) НААН «Сільськогосподарська біотехнологія», керівником якої був також Ю. М. Сиволап.

**Метою** нашої роботи є аналіз результатів застосування ДНК-технологій в ННЦ «ІВІВ ім. В. Є. Таїрова» на напрямках клонової та генеративної селекції, а також санітарного контролю фітопатогенів у системі сертифікованого виноградного розсадництва.

**Матеріал та методи досліджень.** Матеріалом для досліджень були сорти й клони винограду селекції ННЦ «ІВІВ ім. В. Є. Таїрова».

Оцінку молекулярно-генетичного поліморфізму клонів сортів винограду у 1991–1995 роках проводили методом ПДРФ-аналізу [3], з 2001 року ідентифікацію сортів та підтвердження відповідності клону вихідному сорту винограду здійснювали за мікросателітними маркерами [4].

Мікросателітний аналіз проводили переважно за 9-ма локусами (VVS2, ZAG62, ZAG79, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVMD28, VVMD25, VVMD32), рекомендованими у європейських виноградарських країнах для ідентифікації сортів культури [5].

Детекцію ураження вірусами винограду здійснювали виділенням та аналізом дволанцюгової РНК (длРНК), а також молекулярною гібридизацією з радіоактивно та нерадіоактивно міченими длРНК зондами [6]. З 2008 року ідентифікацію збудників вірусних та фітоплазмових хвороб проводили за допомогою ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції) [7].

Збудника бактеріального раку ідентифікували в період 1991–1999 років застосуванням уперше розробленого специфічного методу виявлення збудника хвороби *Agrobacterium tumefaciens (vitis)* шляхом гібридизації із радіоактивно міченим зондом — Т-ДНК Ті-плазмиди [8].

З 2008 року збудника бактеріального раку винограду ідентифікували методом ПЛР із специфічними праймерами *virD2* та *ipt* [7].

### **Результати та обговорення.**

#### **Дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму винограду.**

Пріоритетні дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму були виконані колективом авторів під керівництвом академіка Ю. М. Си-

волапа та завідуючої центром клонової і фітосанітарної селекції винограду Інституту виноградарства та виноробства ім. В. Є. Таїрова, к. б. н. М. І. Тулаєвої.

Аналізом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів ДНК було досліджено генетичні та еволюційні відношення деяких видів, сортів та клонів винограду, визначено генетичні дистанції між формами, які аналізувалися, і побудовано діаграми їх взаємовідносин за окремими генетичними локусами. Зокрема, порівнянням генетичних дистанцій між клонами сорту Каберне Совіньйон селекції інституту INRA (Франція) та клонами 10–7-6 і 14–7-3 селекції ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» було продемонстровано генетичну близькість досліджених клонів між собою та відносну віддаленість від вихідного сорту [3].

Оцінка внутрішньосортової мінливості підщепних сортів Ріпарія х Рупестріс 101–14 (*V. riparia* х *V. rupestris*) та Ріпарія Глуар де Монпельє (*V. riparia*) за допомогою ISSR-ПЛР показала наявність гетерогенності сортів та відповідність розподілу клонів сорту Ріпарія х Рупестріс 101–14 за морфологічними ознаками розподілу по ДНК-локусах.

Новий етап дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму винограду що передбачав використання полімеразної ланцюгової реакції, було розпочато М. І. Тулаєвою в 2007 році та продовжено під науковим керівництвом Н. А. Мулюкіної.

В. Р. Бочаровою було проведено роботу стосовно оцінки можливості диференціації клонів у межах сорту за мікросателітними маркерами [9].

Робота О. М. Карастан була сфокусована на дослідженні молекулярно-генетичного поліморфізму сортів селекції відділу селекції, генетики та ампелографії, аналізу їхнього походження та оцінці генетичного різноманіття ампелографічної колекції ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» [5, 10].

Результатом цього етапу вивчення актуальних проблем було створення бази алельного стану мікросателітних локусів майже 100 сортів селекції та сортів ампелографічної колекції нашого інституту.

На основі аналізу отриманих даних було виконано мікросателітний аналіз походження сортів та форм винограду селекції ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова», виявлені батьківські форми сортів, отриманих шляхом запилення сумішшю пилку, реконструйовано генотипи сортів та форм, які було втрачено, або тих, що відсутні в ампелографічних колекціях України.

Уперше в Україні було застосовано метод маркер-супутнього добору за ознакою безнасіненності у винограду. У рамках цього дослідження на довільній виборці зразків винограду (15 безнасіневих сортів, 25 насінневих сортів, 23 гібридних сіянці) було проаналізовано поліморфізм інтрагенного мікросателітного маркера r3\_VVAGL11, зчепленого із проявом ознаки безнасіненності, та проведений маркер-супутній добір серед сіянців гібридної комбінації схрещування Кобзар х Русалка 3.

**Детекція та ідентифікація збудників вірусних, бактеріальних та фітоплазмових хвороб винограду.**

Дослідження були виконані у 1991–2000 рр. під науковим керівництвом Ю. М. Сиволапа і доктора біологічних наук, завідуючого лабораторією вірусології та мікробіології Інституту виноградарства та виноробства ім. В. Є. Таїрова Б. Н. Мілкуса. Було розроблено пріоритетний метод специфічної діагностики збудника бактеріального раку винограду за допомогою молекулярної гібридизації з зондом — радіоактивно міченою Т-ДНК Ті-плазмиди збудника бактеріального раку винограду *Agrobacterium tumefaciens (vitis)*.

Таким чином було протестовано тисячі рослин клонів сортів винограду, які стали основою розмноження здорового садивного матеріалу у розсадниках України [8]. Це дозволило визначити санітарний стан біологічних категорій садивного матеріалу (вихідний, базовий та сертифікований) як такий, що контролюється на ураження збудником бактеріального раку.

З 2008 року діагностика збудника бактеріального раку винограду в лабораторії вірусології та мікробіології виконується методом полімеразної ланцюгової реакції [7]. Це дозволило оцінити ситуацію щодо санітарного стану стосовно ураження бактеріальним раком садивного матеріалу закордонного походження та виготовленого в Україні. Була показана необхідність ретельного санітарного контролю за обігом закордонного садивного матеріалу через високий рівень його ураження даною хворобою, оцінено ризики поширення інфекції в межах ділянок, на яких було виявлено початкові вогнища ураження цим небезпечним патогеном.

Щодо стану ураження садивного матеріалу вірусними хворобами колективом науковців Селекційно-генетичного інституту та Інституту виноградарства і виноробства ім. В. Є. Таїрова було запропоновано на перших етапах відбору матеріалу застосувати власний метод неспецифічного скринінгу на ураження вірусами. Спочатку такий скринінг виконувався на базі виділення та аналізу дволанцюгової РНК (роботу проведено спільно із співробітником відділу фітопатогенних вірусів Інституту мікробіології та вірусології НАН України, д. б. н. Д. П. Грамою).

На наступному етапі у відділі молекулярної генетики СГІ було розроблено метод молекулярної гібридизації із радіоактивно та нерадіоактивно міченими длРНК-зондами [6]. Обидва методи використано для попереднього тестування клонів сортів на латентне ураження вірусами, в разі виявлення вірусної інфекції для подальшої ідентифікації вірусів застосовували метод імуноферментного аналізу.

З 2008 року в лабораторії вірусології та мікробіології ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» для ідентифікації збудників вірусних та фітоплазмових хвороб винограду використовують ПЛР [7].

Ще одним напрямом застосування ДНК-технологій у дослідженнях став генетичний та санітарний контроль на етапах добору та отримання

безвірусного вихідного садивного матеріалу. Так, аналіз длРНК та молекулярна гібридизація були використані для оцінки санітарного стану матеріалу після хемо- та термотерапії, — а саме для підтвердження статусу «безвірусний» [11].

Аналіз мікросателітними маркерами використовували для оцінки генетичної однорідності матеріалу після проведення хемотерапії *in vitro* [12]. Виконані дослідження показали, що оздоровчі процедури, застосовані до сорту Каберне Совіньйон, не призвели до суттєвих генетичних змін матеріалу.

### **Висновки.**

1. Застосування ДНК-технологій в селекції винограду зумовило розробку методичних підходів до диференціації клонів у межах підщепних та прищепних сортів, виявлення походження ряду сортів селекції ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» та використати елементи маркерної селекції у створенні безнасінневих сортів.

2. ДНК-технології як складова системи санітарного контролю у виробництві садивного матеріалу винограду європейської категорії «сертифікований» дали можливість провести широкомасштабний скринінг вихідного матеріалу на клоновій та генеративній основі на ураження вірусними, бактеріальними та фітоплазмовими хворобами, дослідити особливості поширення зазначених хвороб на виноградниках України і оцінити ризики їхнього природного розповсюдження.

### **СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ**

1. Blaich R. The analysis of restriction fragment length polymorphism as a tool for the differentiation of grapevine cultivars / R. Blaich // Riv. viticult. e enol. — 1989. — 42, № 1. — P. 33–35.
2. Mossop D. W. Association of closterovirus-like particles and high molecular weight double-stranded RNA with grapevine affected by leaf-roll disease / D. W. Mossop, D. R. Elliott, K. D. Richards // New Zealand J. Agric. Res. — 1985. — 28. — P. 419–426.
3. Сиволап Ю. М. Анализ генетических дистанций ПДРФ у винограда / Ю. М. Сиволап, Т. Г. Вербицкая, М. И. Тулаева, И. А. Барышева // Цитология и генетика. — 1993. — № 6. — С. 24–29.
4. Барышева И. А. Исследование внутрисортной изменчивости ДНК винограда ПДРФ и ПЦР методами / И. А. Барышева, М. И. Тулаева, В. С. Чисников // Цитология и генетика. — 2003. — 37, № 6. — С. 31–38.
5. Карастан О. М. Мікросателітний аналіз походження сортів та форм винограду селекції ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» / О. М. Карастан, Н. А. Мулюкіна, Г. В. Плачинда, Ю. М. Сиволап, Л. Ф. Дьяченко, Б. Н. Милкус [та ін.] // Виноградарство і виноробство : міжв. тем. наук. зб. — Одеса : ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова», 2014. — Вип. 51. — С. 139–144.
6. Сиволап Ю. М. Применение меченой двуспиральной РНК для выявления вирусных заболеваний винограда / Ю. М. Сиволап, В. П. Петрашевич, Б. Н. Милкус, Н. А. Мулюкина, А. А. Русин // Биотехнология. — 1992. — № 6. — С. 55–58.

7. Сиволап Ю. М. Бактериальный рак и фитоплазменная инфекция винограда: диагностика, идентификация, меры борьбы / Ю. М. Сиволап, Б. Н. Милкус, В. В. Власов, И. В. Шевченко. — Одесса, 2008. — 22 с.
8. Сиволап Ю. М. Биотехнологический метод диагностики бактериального рака / Ю. М. Сиволап, Л. Ф. Дьяченко, Б. Н. Милкус [и др.] // Биотехнология. — 1991. — № 5. — С.82–85.
9. Мулюкіна Н. А. Ідентифікація та паспортизація генотипів винограду за допомогою ДНК-маркерів / Н. А. Мулюкіна, В. Р. Бочарова, М. І. Тулаєва, І. А. Ковалева // Вісник Одеського національного університету. — Одеса, 2008. — С. 127–134.
10. Мулюкіна Н. А. Фенотипическая и генотипическая характеристика межвидовых сортов винограда Опаловый и Бурмунк для получения перспективных гибридных форм / Н. А. Мулюкина, И. А. Ковалева, Л. В. Герус [и др.] // Биологический журнал Армении. — 2014. — № 1 (66). — С. 103–106.
11. Мулюкіна Н. А. Прижилкова мозаїка та борознистіть деревини винограду: етіологія, діагностика та заходи боротьби : автореф. дис. ...к. б. н. / Н. А. Мулюкіна. — К., 2006. — 18 с.
12. Мулюкіна Н. А. Методи оздоровлення від вірусів винограду із застосуванням культури *in vitro* / Н. А. Мулюкіна, Н. М. Зеленянська, Д. Ю. Лосєва [та ін.] // Виноградарство і виноробство : міжв. наук. тем. зб. — Одеса : ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова», 2013. — Вип. 50. — С. 198–204.

Надійшла 19.06.2015.

UDC 683.581.167

**Vlasov V. V., Muljukina N. A., Tulaeva M. I., Kovaljova I. A., Chisnikov V. S., Konup L. O., Karastan O. M., Losjeva D. Ju.** NSC «Tairov Research Institute of Viticulture and Wine-Making»

#### **DNA-TECHNOLOGIES FOR GRAPEVINE (*Vitis vinifera* L.) RESEARCHES IN NSC «TAIROV RESEARCH INSTITUTE OF VITICULTURE AND WINE-MAKING»: METHODOLOGICAL AND HISTORICAL ASPECTS**

A brief description of the main directions of DNA-technologies applying to grapevine (*Vitis vinifera* L.) researches at National Scientific Center «Tairov Research Institute of Viticulture and Enology» have been presented. The methodic basis and main results of grapevine molecular polymorphism investigation and grapevine virus, bacterial and phytoplasma diseases DNA-identification have been characterized.

УДК 683.581.167

**Власов В. В., Мулюкина Н. А., Тулаева М. И., Ковалева И. А.,  
Чисников В. С., Конуп Л. А., Карастан О. М., Лосева Д. Ю.**

**ДНК-ТЕХНОЛОГИИ В ИЗУЧЕНИИ ВИНОГРАДА (*Vitis vinifera* L.)  
В ННЦ «ИВИВ им. В. Е. ТАИРОВА»: МЕТОДИЧЕСКИЕ  
И ИСТОРИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ**

Представлено краткое описание основных этапов применения ДНК-технологий в изучении сортов винограда (*Vitis vinifera* L.) различного назначения в ННЦ «ИВиВ им. В. Е. Таирова». Охарактеризована методическая база и основные полученные результаты на направлениях изучения молекулярно-генетического полиморфизма винограда и ДНК-идентификации вирусных, бактериальных и фитоплазменных болезней.