



Генетика, селекція, біотехнологія

УДК 634.8:581.12
© 2010

*В.В. Власов,
Н.А. Мулюкіна,
доктори сільсько-
господарських наук
Л.В. Джабурія,
кандидат
технічних наук
ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова»
УАН*

ПЕРСПЕКТИВИ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ВИНОГРАДУ

Розглянуто результати світового та вітчизняного доробку в галузі біотехнології винограду. Визначено пріоритетні напрями біотехнологічних досліджень винограду в Україні.

Усебічна увага до культури винограду сприяла розвитку різних напрямів його біотехнології. У 70—80-х рр. минулого століття ці роботи були спрямовані, головним чином, на розробку методів культивування винограду *in vitro* для прискореного розмноження нових перспективних сортів та безвірусних клонів винограду. Тоді ж було розроблено методи для оздоровлення винограду від вірусів за допомогою культури меристеми, термо- та хіміотерапії [3, 5]. Трохи пізніше з метою поліпшення селекційного процесу почали застосовувати методи соматичного ембріогенезу. Нині біотехнологія винограду спирається переважно на ДНК-технології, що дає змогу прискорити і поліпшити традиційний селекційний процес.

Мета досліджень — аналіз результатів біотехнологічних досліджень винограду в ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» та визначення їх перспектив у загальносвітовому науковому доробку в цій галузі.

Перші роботи в галузі біотехнології винограду стосувалися розробки різноманітних методичних прийомів та середовищ для уведення у культуру *in vitro*, розмноження і адаптації до умов *in vivo*. Роботи вчених групи культури тканин Центру клонової та фітосанітарної селекції ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» у цей період сприяли розробці цілісної біотехнології розмноження винограду в культурі *in vitro* з використанням розроблених авторами універсальних поживних середовищ та іонообмінних субстратів. Було оптимізовано етапи клонального мікророзмноження для виробництва вихідного клонового садивного матеріалу винограду. Розроблені прийоми підвищення регенераційної здатності винограду *in vitro* стали основою високоефективної технологічної схеми прискореного розмноження та виробництва садивного матеріалу винограду, яка базується на

застосуванні змінних іонітних субстратів у поєднанні з оптимальними умовами культивування.

Розроблено склад уніфікованого безгормонального поживного середовища, який забезпечує активний розвиток мікроклонів винограду на всіх етапах мікроклонування. Розроблено та вперше застосовано для розмноження винограду *in vitro* штучний іонітний поживний субстрат багаторазового використання «Біона» та визначено його оптимальні фізико-хімічні параметри для розвитку мікроклонів винограду *in vitro*.

Розроблено спосіб адаптації мікроклонів винограду до умов *in vivo*, який полягає у поєднанні етапів мікрочубукування, вирощування та адаптації рослин на суміші іонітних субстратів та целюліти. Застосування цього способу скорочує період адаптації на 10—12 діб та підвищує приживлюваність рослин до 93—96% під час садіння на постійне місце.

У ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» було проведено дослідження з розробки й оптимізації методу термотерапії вегетуючих рослин винограду в поєднанні з культурою *in vitro* та хіміотерапії у культурі *in vitro* для отримання вихідних рослин, вільних від вірусної інфекції.

Паралельно з оптимізацією біотехнології розмноження винограду в Інституті з 80-х років минулого століття розробляли методи детекції та ідентифікації вірусної інфекції — від застосування провокаційних середовищ та мікрощеплення на сорти-індикатори до імуноферментного аналізу, молекулярної гібридизації та полімеразної ланцюгової реакції [2].

Результатом спільної роботи співробітників лабораторії вірусології та мікробіології ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» і спеціалістів лабораторії молекулярної генетики Селекційно-генетичного інсти-

Впровадження біотехнологічних розробок у систему виробництва сертифікованого садивного матеріалу винограду

Етап клонової селекції або розмноження	Впроваджені розробки
<p>Відбір кущів — родоначальників клонів</p> <p>Дослідження кандидатів у клони в 2-х вегетативних поколіннях</p> <p>Банк клонів у Центрі клонової селекції ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова»</p> <p>Базові та сертифіковані маточники в розсадниках</p>	<p>Методи тестування на латентне ураження коротковузлям, скручуванням листя та бактеріальним раком винограду</p> <p>Методи тестування на латентне ураження коротковузлям, вірусом мозаїки резухи, скручуванням листя, мармуровістю, вірусами А і В винограду, бактеріальним раком винограду. За необхідності — термотерапія або хімотерапія в культурі <i>in vitro</i>. Візуальний та молекулярно-генетичний контроль стабільності ознак після культури <i>in vitro</i></p> <p>Методи тестування на латентне ураження коротковузлям, вірусом мозаїки резухи, скручуванням листя, мармуровістю, вірусами А і В винограду, бактеріальним раком винограду, фітоплазмозною інфекцією</p> <p>Методи тестування на латентне ураження коротковузлям, вірусом мозаїки резухи, скручуванням листя, мармуровістю, вірусами А і В винограду, бактеріальним раком винограду, фітоплазмозною інфекцією</p>

туту на чолі з академіком Ю.М. Сиволапом став розроблений уперше в світі генно-інженерний метод специфічної діагностики збудника бактеріального раку винограду.

Вищезазначені розробки знайшли своє практичне застосування у системі виробництва сертифікованого садивного матеріалу винограду (табл. 1), упроваджені у найбільших виноградних розсадниках України, що виробляють мільйони високоякісних щеплених саджанців винограду [1].

Основою системи є одержані в Центрі клонової селекції 50 клонів 32 столових, технічних та підщепних сортів винограду.

Особливістю цієї системи є постійне проведення генетичного та санітарного контролю на етапах розмноження безвірусних клонів винограду від банку клонів до сертифікованих маточників.

Застосування системи виробництва сертифікованого садивного матеріалу винограду в розсадниках дає можливість поліпшити приживлюваність саджанців при закладанні промислових виноградників, збільшити продуктивність насаджень на 30—40% та тривалість періоду експлуатації у середньому на 10 років.

З урахуванням того, що застосування методів культури *in vitro* сприяє прискоренню та підвищенню ефективності селекційного процесу і відкриває перспективу одержання цінного вихідного генетичного матеріалу для практичної селекції та його прискореного розмноження, з 90-х років минулого століття у ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» було розпочато роботи з оптимізації методів культивування пиляків та недозрілих насінневих зародків винограду в культуру *in vitro* і середовищ для прискореного розмноження винограду, вивчення культивування пиляків та недозрілих насінневих зародків, ембріогенезу і пророщування недозрілих зародків залежно від сорту та комбінації схрещування.

Для прискореного розмноження винограду в культурі *in vitro* розроблено оптимальний склад середовища для початкових етапів розмноження сортів та клонів винограду, підібрано середови-

ще для ефективної індукції множинних пагонів при регенерації рослин з меристемних тканин.

Для аналізу отриманих результатів дослідження, оцінки та вибору складу оптимальних поживних середовищ для прискореного розмноження винограду в культурі *in vitro*, крім традиційного математичного апарату статистики і дисперсійного аналізу, вперше у виноградарстві було застосовано апарат багатокритеріальної оптимізації. Доцільність застосування саме цього математичного апарату зумовлена тим, що за допомогою апарату статистики можна оцінити якість середовищ лише за окремими показниками — приживлюваністю ініціальних експлантів або проліферацією мікробруньок тощо. А багатокритеріальна оптимізація дає змогу оцінити якість поживних середовищ з урахуванням усіх досліджуваних показників у сукупності. На рис. 1 наведено результати вибору оптимального поживного середовища за сукупністю 3-х критеріїв — приживлюваності, проліферації пагонів та кількості пагонів. Застосування методу багатокритеріальної оптимізації дало змогу підвищити ефективність відбору оптимальних поживних середовищ для розмноження винограду.

Нині культуру тканин дедалі частіше розглядають як можливість розробки методів, що здійснюють прискорену оцінку пристосування нових генотипів винограду до стресових умов навколишнього середовища (соле- та посухостійкість та ін.) та патогени винограду.

У 90-х роках минулого століття у ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» почали проводити пріоритетні дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму винограду. Ці роботи було розпочато вперше серед країн СНД у нашому Інституті під керівництвом академіка Ю.М. Сиволапа за допомогою RAPD-аналізу. Нині для проведення цих робіт використовують SSR-маркери. У результаті проведених досліджень підібрано набір мікросателітних маркерів, який пропонують як ДНК-маркерну систему для диференціації та ідентифікації генотипів винограду. Нині за допомогою методу

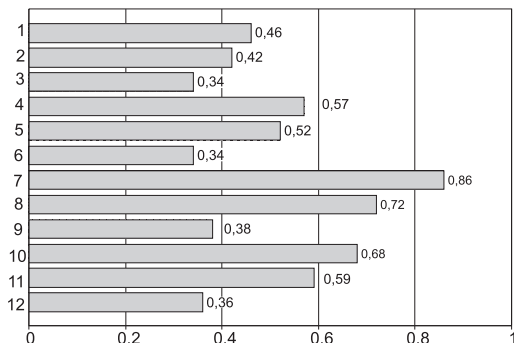


Рис. 1. Застосування методу багатокритеріальної оптимізації у дослідженні поживних середовищ: 1 — Гамборга напіврідке; 2 — Гамборга рідке; 3 — Гамборга тверде; 4 — Ніча і Ніч напіврідке; 5 — Ніча і Ніч рідке; 6 — Ніча і Ніч тверде; 7 — МС модифіковане напіврідке; 8 — МС модифіковане рідке; 9 — МС модифіковане тверде; 10 — МС напіврідке; 11 — МС рідке; 12 — МС тверде

мікросателітного аналізу вивчено молекулярно-генетичний поліморфізм понад 50-ти сортів винограду переважно селекції ННЦ «ІВІВ ім. В.Є. Таїрова». На основі одержаних аallelних характеристик мікросателітних локусів отримано ДНК-паспорти цих сортів і клонів, які можуть бути використані для захисту авторських прав селекціонерів та створення єдиної бази генетичних ресурсів винограду України.

Нині ННЦ «ІВІВ ім. В.Є. Таїрова» продовжує біотехнологічні дослідження за всіма вищенаведеними напрямками, зосереджуючись одночасно на проведенні фундаментальних досліджень і практичному застосуванні одержаних інноваційних розробок у виноградарстві.

Щодо перспективи біотехнологічних досліджень винограду в світі, то слід зупинитися, передує, на проблемі використання ГМО в цілому та одержанні трансгенного винограду зокрема.

Останнім часом спостерігається позитивне ставлення до споживання продуктів, що містять ГМО, таких організацій, як ВОЗ (Всесвітня організація охорони здоров'я) та ФАО (продовольча та сільськогосподарська організація Об'єднаних націй), що пояснюється відсутністю однозначних даних про шкідливість ГМО. Екологічні організації ставляться до споживання продуктів на основі ГМО досить насторожено. У будь-якому випадку наявність на продуктах харчування маркування про вміст ГМО дає людині право вибору, які саме продукти споживати, тому контроль трансгенної продукції є необхідним.

Донедавна ситуація з ГМО в Україні була однією з найнеконтрольованіших у світі. Вона почала змінюватися з 1 липня 2009 р. після уведення у дію Постанови Кабінету Міністрів України № 468 від 13.05.2009 «Про порядок маркування про-

дуктів, що містять генетично модифіковані організми», яка регулює правила маркування продуктів, що містять ГМО. У зв'язку з цим для здійснення контролю якості рослинної сировини та продуктів її переробки на наявність ГМО 8 липня 2009 р. у ННЦ «ІВІВ ім. В.Є. Таїрова» НААН України було створено й атестовано лабораторію, що має офіційне право проведення якісного та кількісного аналізу продукції на наявність ГМО. Цей підрозділ було створено на базі існуючої в Інституті з 1986 р. лабораторії вірусології та мікробіології, яка має великий досвід аналітичної роботи, у тому числі ПЦР-аналізу, що застосовується, зокрема, для виявлення трансгенів. Лабораторія оснащена сучасним обладнанням, яке дає змогу з високою точністю проводити до 50-и аналізів на добу. Нині в лабораторії перевіряють свою продукцію багаточисленні підприємства харчової промисловості південних регіонів України, у тому числі виноробні.

Слід відзначити, що нині в світі вже існує певна кількість трансгенних сортів винограду, хоча жоден з них не є комерціалізованим. Однак вимоги до перевірки вин в Україні на ГМО обґрунтовані й зумовлені необхідністю виявлення на даному етапі не трансгенного винограду, а інших організмів, зокрема трансгенних штамів дріжджів.

У майбутньому обов'язково перед виноградарями виникне проблема використання генетично модифікованих сортів, які вже існують у великій кількості. Лише в США з 1999 по 2005 рр. було проведено 25 польових випробувань таких сортів, і в будь-який час можна очікувати їх комерціалізацію.

Генетичну модифікацію сортів винограду здійснюють у напрямі набуття стійкості до збудників оїдіуму, гнилі грон, бактеріального раку, хвороби Пірса, непо- та кластеровірусів [4]. Одна з модифікацій була здійснена для поліпшення якості ягід, однак, використана трансгенна конструкція поки що є комерційною таємницею.

Велика робота з одержання та випробування трансгенного винограду в США проводиться Корнелльським, Каліфорнійським та Нью-Йоркським університетами. Деякі дослідження здійснюються також окремими виноградарськими або виноробними дослідницькими компаніями.

Значну кількість досліджень з трансгенозу проводять у європейських виноградарських країнах. Так, в Італії випробовують виноград, модифікований геном, що регулює кількість гормону росту рослин — ауксину, у Франції — виноград, стійкий до неповірусів.

Австралійські учені здійснюють польові випробування сортів, модифікованих за кольором та якістю ягід (рис. 2).

Попри твердження, що в процесі бродіння ДНК винограду практично елімінується, було доведено, що ДНК генетично модифікованого винограду виявляється у вині після завершення бродіння ще понад рік.

Отже, існує реальна можливість того, що спо-



Рис. 2. Основні напрями генетичної модифікації винограду в світі

живачі винограду і вина, особливо імпортного, найближчим часом зможуть вибрати, якому типу продукції надати перевагу. Їхнє право на вибір повинно бути надійно захищено мережею лабораторій, що визначають ГМО в рослинному матеріалі та продукції харчової промисловості.

Основними напрямками сучасної біотехнології винограду в світі є: одержання безнасінневих

сортів з використанням ембріокультури, традиційної селекції та MAS-селекції; використання SSR-аналізу та «комп'ютерної» ампелографії для коректної ідентифікації сортів винограду як методології, прийнятої UPOV та Європейським союзом; ідентифікація послідовностей ДНК у геномі ряду видів *Vitis* як основи для MAS-селекції; молекулярна ідентифікація клонів винограду методом AFLP; одержання генетично модифікованого винограду, стійкого до мілдью та оїдіуму, вірусів групи коротковузля, бактеріального раку та хвороби Пірса.

За аналізом стану біотехнологічних досліджень винограду в Україні та ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» зокрема можна припустити, що найближчими роками їх будуть активно проводити в напрямі використання різних типів маркерів для вивчення молекулярно-генетичного поліморфізму винограду з поступовим переходом до селекції, оснований на використанні молекулярних маркерів. Традиційний напрям біотехнології винограду, пов'язаний з використанням методів культури *in vitro*, використовуватимуть для прискореного розмноження цінного селекційного матеріалу, селекції безнасінневих сортів та скринінгу нових генотипів.

Майбутнє світового виноградарства тісно пов'язане з досягненнями сучасної біотехнології, і Україна як виноградарська країна може і повинна внести свій вклад у розвиток цього напрямку.

Висновки

Основні біотехнологічні дослідження винограду в ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» було виконано з використанням передових напрямів біотехнологічних досліджень у світі. Пріоритетними розробками Інституту є окремі елементи біотехнології розмноження винограду (розробка та застосування іонообмінних субстратів), генно-інженерний метод діагностики бактеріального раку та вивчення молекулярно-генетичного поліморфізму сортів і клонів. Основними напрям-

мами впровадження біотехнологічних інноваційних розробок є селекція, клонова селекція та система сертифікованого розсадництва. Найбільш перспективними напрямками досліджень у галузі біотехнології винограду в ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» є селекція безнасінневих сортів, аналіз молекулярно-генетичного поліморфізму сортів та клонів винограду, розробка методів прискореного скринінгу генотипів у культурі *in vitro*.

Бібліографія

1. Власов В.В. Система производства сертифицированного посадочного материала винограда в Украине/В.В. Власов, М.И. Тулаева, Н.А. Мулюкина//Питомниководство винограда в Украине: темат. сб. материалов секции виноградарства Отделения растениеводства РАСХН. — Краснодар, 2004. — С. 34—43.
2. Мулюкина Н.А. Вирусные болезни и бактериальный рак винограда/Н.А. Мулюкина. — Одеса: ННЦ «ІВіВ ім. В. Е. Таїрова», 2005. — 147 с.
3. EPPO Standards. Certification schemes. Pathogen-tested material of grapevine varieties and rootstocks//European and Mediterranean Plant Protection

- Organization. — France: Paris, 2003. — P. 1—13.
4. Hinrichsen P. Genetic transformation of grapevines with *Trichoderma harzianum* and antimicrobial peptide genes for improvement of fungal tolerance/P. Hinrichsen, M.A. Reyes, A. Castro, S. Araya/VII Int. Symp. on Grapevine Physiology and Biotechnology: USA, California: Davis, 31 August, 2005. — P. 63.
5. Rumbos I. Sanitary improvement of grapevine in Greece: creation of a genetic bank of greek varieties *in vitro*/I. Rumbos, A. Sourri, A. Rumbou, A. Chatzaki//14th Meet. ICVG, Locorotondo (Bari), Italy, 12—17 September, 2003: extended abstracts. — Bari, 2003. — P. 159.