

*Н. А. Мулюкіна, д-р с.-г. наук,
О. М. Карастан, наук. співр.,
О. С. Папіна, мол. наук. співр.,
Г. В. Плачинда, мол. наук. співр.*
Національний науковий центр
“Інститут виноградарства і виноробства ім. В.Є. Таїрова”,
Р. В. Герецький, аспірант,
Одеський державний аграрний університет
О. О. Бойчук, аспірант,
Одеська національна академія харчових технологій,
Україна

СУЧАСНИЙ СТАН ТА ПЕРСПЕКТИВА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ В ННЦ “ІВІВ ім. В. Є. ТАЇРОВА”

*В огляді надано стислу інформацію щодо напрямків та результатів молекулярно-генетичних досліджень в ННЦ “ІВІВ ім. В. Є. Таїрова”. Показано перспективність використання мікросателітних ДНК-маркерів для дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму сортів та видів роду *Vitis*, штамів винних дріжджів *S. cerevisiae* та комплексу збудників хвороби багаторічної деревини винограду – ески.*

Ключові слова: мікросателітні маркери, виноград, винні дріжджі, еска винограду.

Ідентифікація таксономічних груп рослин та мікроорганізмів та визначення взаємозв'язків між ними має велике значення для їх селекції на ознаки інтересу, що забезпечує на подальших етапах зростання ефективності сільськогосподарського виробництва і переробної промисловості та покращення якості продукції.

Мікросателітні маркери ДНК наразі забезпечують широкі можливості ідентифікації видового складу, сортів та штамів різноманітних біологічних об'єктів, а також оцінки взаємозв'язків між ними. В інституті Таїрова вони поки що застосовуються в дослідженні винограду (*Vitis vinifera* L.), проте в найближчій перспективі будуть застосовані і до пов'язаних з ним об'єктів – таких, як винні дріжджі та збудники хвороб багаторічної деревини винограду.

Серед усіх існуючих видів молекулярних маркерів, мікросателіти стали найбільш уживаними завдяки кодомінантній природі, успадкуванню за законами Г. Менделя, відтворюваності результатів, простоті і зручності у роботі та нечутливості до впливу умов навколишнього середовища [1, 2].

Мікросателіти (SSRs - simple sequence repeats – прості послідовності повторів) – це частина тандемно повторюваних послідовностей у геномі організму, де окремий коровий (тобто, базовий) мотив довжиною від 2 до 4 п.о., повторюється декілька разів.

Початок ери дослідження винограду за допомогою мікросателітних маркерів приходить на 1995 р, коли австралійські вчені М. Томас та Н. Скотт [3] вперше ідентифікували 26 сортів європейського винограду.

У 1996 р. був започаткований Міжнародний каталог сортів винограду (Vitis International Variety Catalogue, VIVC) [4], який містив основні елементи ампелографічного опису та мікросателітні характеристики шести ядерних локусів 200 сортів винограду.

В подальшому кількість виконаних робіт з використаннями мікросателітних маркерів для дискримінації зразків винограду наростало лавиноподібно, а їх пік прийшовся на 2008-2012 рр.

До 2013 р., частково за результатами двох європейських проектів GrapeGen06 та Genres081 і роботи різних дослідницьких груп була ідентифікована значна доля світових

генетичних ресурсів винограду [5, 6, 12, 7-10]. Завдяки цьому Каталог сортів VIVC був значно розширений та наразі містить 21128 сортів винограду, з яких приблизно для 1500 надано повний ампелографічний опис та мікросателітні профілі дев'яти локусів стандартного ряду.

Масив інформації щодо алельного складу мікросателітних локусів є базовою платформою для ревізії та оптимізації складу колекцій гермоплазми, аналізу генетичного споріднення та філогенії сортів винограду, картування важливих сільськогосподарських ознак, оцінки генетичної ерозії культури винограду, раннього скринінгу генотипів-носіїв ознак інтересу тощо.

На сьогоднішній день молекулярно-генетичні дослідження в ННЦ "ІВІВ ім. В. Є. Таїрова" охоплюють більшість зазначених напрямків дослідження винограду, а саме дискримінацію сортів та клонів [11, 12], дослідження родоводів сортів та форм винограду [13-15], оцінку різноманіття генетичних ресурсів винограду ампелографічної колекції інституту та маркер-супутнього добору за ознакою безнасінності.

Проте в світі зростає інтерес щодо оцінки генетичних ресурсів дикого винограду, який може бути використаний для запобігання генетичної ерозії винограду шляхом покращення різноманіття нових сортів винограду та інтрогресії деяких важливих ознак [16].

За даними авторів [17] в Україні *V. silvestris* існує у долині Дніпра, на південних і північних схилах Кримських гір та у Закарпатському регіоні. Популяція Закарпаття головним чином локалізована на кам'янистих осипах південно-східного схилу Чорної гори та по лінії підніжжя корінного берега р. Тиса. Поодинокі лози дикого винограду виявлені в околицях м. Ужгорода, у Концівському лісі, а також у районі сіл Великих Лаз і Циганівців Ужгородського району.

Інформація щодо зростання дикого винограду у заплавах ріки Дунай на території Болгарії [18] та Австрії [19] може вказувати на існування популяцій цього виду також і на півдні України.

Виноград, знайдений у природному середовищі, є сумішшю диких форм, здичавілих культурних форм та підщеп, а також гібридів від спонтанних схрещувань між видами *V. vinifera* L. та *V. silvestris* [20], тому були розроблені чіткі критерії відбору зразків дикого винограду, які регламентують віддаленість місць відбору не менш ніж на 10 км від промислових виноградних насаджень, старих та покинутих виноградників та місць культивування винограду у домогосподарствах.

З цієї точки зору, інтерес можуть представляти лише популяції дикого винограду локалізовані на гірських схилах Карпат та заплавах та островах дельти р. Дунай. Їх дослідження має значення не лише для України, але й для європейського наукового суспільства, тому зараз ННЦ "ІВІВ ім. В. Є. Таїрова" веде активний пошук міжнародних партнерів для спільного наукового проекту.

Другим важливим запланованим напрямком молекулярно-генетичних досліджень в інституті Таїрова стане вивчення популяцій та штамів дріжджів *S. cerevisiae* в світлі їх впливу на якісні показники винопродукції.

Дифференціювання штамів винних дріжджів за морфологічними ознаками є складним процесом через вплив умов їх культивування, проте, як відмічають автори, багато молекулярних методів здатні забезпечувати чітку дискримінацію на рівні штамів *S. cerevisiae* [21].

Одним з таких поширених методів та зручних методів є ідентифікація мікросателітними маркерами. Довжина мікросателітних локусів у дріжджів варіює від 200 до 3500 п. н., що дозволяє успішно використовувати відносно прості методи на кшталт електрофорезу в агарозних та поліакріламідних гелях.

Перші роботи з дослідження молекулярно-генетичних характеристик різних штамів дріжджів були сфокусовані на оцінці видового різноманіття *S. cerevisiae*, дискримінації популяцій та штамів.

Наразі зростає інтерес до розуміння функціонування геному та впливу окремих його ділянок на прояв важливих технологічних властивостей дріжджів. Так, авторами [22] був досліджений зв'язок індустріального штаму Eg8 та 24 кріофільних гібридів *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces kudriavzevii*, які використовуються в виноробстві у Франції, Німеччині, Угорщині та США та показана химерність геному Eg8 із рівнями плоідності ($2n$, $3n$, або $4n$).

Оскільки в Україні дослідження з оцінки видового різноманіття *S. cerevisiae* та дискримінації їх популяцій та штамів практично не проводилися (за виключенням роботи інституту “Магарач” щодо визначення штамового складу популяцій на виноробному виробництві) [23], інститут Таїрова планує висвітлити цей фрагмент, використовуючи штами колекції інституту, виділені в польових умовах на різних сортах винограду та на вино виробництві. Ця робота буде мати також прикладний напрямок стосовно оцінки впливу штамів винних дріжджів на фізико-хімічні показники якості червоних вин із сортів нової селекції та буде виконуватися спільно із відділом селекції, генетики, ампелографії і відділом виноробства інституту ім. В. С. Таїрова.

Ще одним перспективним напрямком досліджень є ДНК-ідентифікація та оцінка взаємовідносин між штамми збудників хвороб багаторічної деревини винограду, насамперед, ески. Ця хвороба є важливою проблемою сучасного світового виноградарства в європейських виноградарських країнах басейну Середземного моря – особливо для молодих рослин [24].

Контроль збудників хвороб багаторічної деревини винограду, насамперед, збудників ески, стандартними методами (хімічна обробка, термотерапія та агротехнічні прийоми) дозволяє лише частково (30 – 50 % рослин) позбутися інфекції [25], тому еску включено як об'єкт контролю до схем сертифікації ряду виноградарських країн світу [26].

З огляду на те, що еска є хворобою, яку згідно із чинними нормативними документами України слід контролювати в системі виробництва європейської категорії садивного матеріалу винограду «сертифікований», дуже важливим є факт, виявлений європейськими та американськими дослідниками, а саме – що важливим джерелом розповсюдження інфекції є підщепні сорти винограду [27].

Ідентифікація основного збудника ески – *Phaemoniella chlamidospora* – на штучних живільних середовищах є проблематичною через низьку швидкість росту гриба (до 4-х тижнів від виділення до ідентифікації), який заростає іншими супутніми грибами, що веде до отримання ложнонегативних результатів. Тому ДНК-ідентифікація збудників грибкових хвороб багаторічної деревини винограду (ПЛР) є альтернативою визначенню їх на живільних середовищах за допомогою специфічних праймерів.

Наразі в Україні не виявляли жодного з представників комплексу збудників ески за допомогою ДНК-ідентифікації, цим методом також не оцінено основні джерела інфекції – маточні рослини підщепних сортів та садивний матеріал, не проведено оцінку стану молодих насаджень, особливо закладених імпортом садивним матеріалом, що походить з країн-джерел зазначених хвороб (Італія, Німеччина, Франція) та не визначено ризику поширення хвороб. Практично відсутній лабораторний контроль хвороби в системі виробництва садивного матеріалу винограду, агротехнічні методи обмеження поширення інфекції не застосовуються.

З теоретичної точки зору цікаво було б не лише ідентифікувати збудників ески в Україні, але й (за умов співпадіння видового складу із європейськими джерелами) визначити взаємовідносини між штамми *Phaemoniella chlamidospora*, виділеними в Європі та в Україні.

Отже, подальші кроки молекулярно-генетичних досліджень ННЦ “ІВіВ ім. В. С. Таїрова” дозволять отримати дані, цікаві як з точки зору теоретичної біології, так і корисні в їх застосуванні до селекції, виноробства та виноградного розсадництва.

Використані джерела

1. Microsatellite markers for grapevine: A state of the art / K. M. Sefc, F. Lefort, S. Grando / K. A. Roubelakis-Angelakis editor // Amsterdam: Kluwer Publishers. – 2001. – P. 433-463.
2. Use of genetic markers to assess pedigrees of grape cultivars and breeding program selections / J. Bautista, G. S. Dangl, J. Yang [et al.] // Am. J. Enol. Vitic. – 2008. – Vol. 59. – № 3. – P. 248-254.
3. Thomas M. R. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphism when analyzed as sequence-tagged sites (STSs) / M. R. Thomas, N. S. Scott // Theoretical and Applied Genetics. – 1993. – Vol. 86. – P. 985-990.
4. Vitis International Variety Catalogue [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.vivc.de/>
5. The SSR-based molecular profile of 1005 grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions uncovers new synonymy and parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origin / G. Cipriani, A. Spadotto, I. Jurman, [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2010. – Vol. 121. – № 8. – P. 1569-1585.
6. Genetic structure, origins, and relationships of grapevine cultivars application of microsatellite markers in grapevine and olives from the Castilian Plateau of Spain. / J. C. Santana, M. Heuertz, C. Arranz [et al.] // American Journal of Enology and Viticulture. – 2010. – Vol. 61. – № 2. – P. 214-241.
7. High throughput analysis of grape genetic diversity as a tool for germplasm collection management / V. Laucou, T. Lacombe, F. Dechesne [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 2011. – Vol. 122. – № 6. – P. 1233-1245.
8. Genotyping of Bulgarian *Vitis vinifera* L. cultivars by microsatellite analysis / T. Hvarleva, K. Rusanov, F. Lefort [et al.] // Vitis. – 2004. – Vol. 43. – № 1. – P. 27-34.
9. Characterization of Iranian grapevine cultivars using microsatellite markers / R. Fatahi, A. Ebadi, N. Bassil [et al.] // Vitis. – 2003. – Vol. 42. – № 4. – P. 185-192.
10. Riaz S. Identification of mildew resistance in wild and cultivated Central Asian grape germplasm / S. Riaz, J. M. Boursiquot, G. S. Dangl [et al.] // BMC Plant Biol. – 2013. – Vol. 13. – P. 149.
11. Мікросателітний аналіз походження сортів та форм винограду селекції ННЦ “ІВіВ ім. В. Є. Таїрова” / О. М. Карастан, Н.А. Мулюкіна, Г.В. Плачинда [та ін.] // Виноградарство і виноробство: міжв. тем. наук. зб. – Одеса: ННЦ “ІВіВ ім. В. Є. Таїрова”, 2014. – Вип. 51. – С. 139-144.
12. Карастан О. М. Происхождение некоторых форм винограда селекции ННЦ «ИВиВ им. В. Е. Таирова» / О. М. Карастан, Н. А. Мулюкіна, Е. С. Папіна [и др.] // Агротехнологии XXI века: концепции устойчивого развития: материалы международной конференции, посвященной 100-летию кафедры ботаники, защиты растений, биохимии и микробиологии (Воронеж, 17-18 апреля 2014 г.): тез. докл. – Воронеж, 2014. – С. 341-346.
13. Ідентифікація та походження безнасінневих сортів винограду колекції ННЦ “Інститут виноградарства і виноробства ім. В. Є. Таїрова” / О. М. Карастан, Н. А. Мулюкіна, Г. В. Плачинда, Папіна О. С. // Зб. наук. праць СГІ. – 2014. – Вип. 24, № 64. – С. 76-84.
14. Microsatellite characteristics of grapevine cultivars included to ukrainian state Register of plant varieties / O. Karastan, N. Mulukina, O. Papina [та ін.] // Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. – 2015. – №3. – Режим доступу: http://nd.nubip.edu.ua/2015_3/15.pdf
15. Бочарова В. Р. Молекулярно-генетический анализ генотипов клонов столовых сортов винограда с помощью SSR-анализа / В. Р. Бочаров О. М. Карастан // Біологія: від молекули до біосфери: тез. доп. III Міжнар. наук. конференції молодих науковців (Харків, 18 – 21 листопада 2008 р.) - Харків. – 2008. – С. 177–178.
16. Arnold C. Situation de la vigne sauvage (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*) en Europe / C. Arnold, F. Gillet, J. M Cobat // Vitis. – 1998. – Vol. 37. – P. 159-170.

17. Фодор С. С. Голінка П.І. Дикий виноград на Закарпатті / С. С. Фодор, П. І. Голінка // Про охорону природи Карпат. Ужгород: Карпати, 1973 - 177 с.
18. Genetic diversity in native Bulgarian grapevine germplasm (*Vitis vinifera* L.) based on nuclear and chloroplast microsatellite polymorphisms / T. Dzhambazova, I. Tsvetkov, I. Atanassov [et al.] // *Vitis*. – 2009. – Vol. 48. № 3. – P. 115-121.
19. Genetic variability and incidence of systemic diseases in wild vines (*Vitis vinifera* ssp. *silvestris*) along the Danube / F. Regner, R. Hack, H. Gangl [et al.] // *Vitis*. – 2004. – Vol. 43. № 2. – P. 123–130.
20. This P. Historical origins and genetic diversity of wine grapes / P. This, T. Lacombe, M. R. Thomas // *Trends in Genetics*. – 2006. Vol. 22. – P. 511-519.
21. Effect of grape indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains on Montepulciano d'Abruzzo red wine quality / G. Suzzi, G. Arfelli, M. Schirone [et al.] // *Food Res. Int.* – 2012. – Vol. 46. – P. 22–29.
22. Ecological success of a group of *Saccharomyces cerevisiae*/*Saccharomyces kudriavzevii* hybrids in the northern european wine-making environment / C. Erny, P. Raoult, A. [Alais](#) [et al.] // [Appl Environ Microbiol.](#) – 2012. – Vol. 78. № 9. – P. 3256-65.
23. Серпова Е.В. Молекулярно-генетическая идентификация винных дрожжей Крыма / Е. В. Серпова, С. А. Кишковская, Н. Н. Мартыненко, Е. С. Наумова // *Биотехнология*. – 2011. - № 6. – С. 47 – 54.
24. Surico G. Older and more recent observations on esca: A critical overview / G. Surico, L. Mugnai, G. Marchi // *Phytopathol. Mediterr.* . – 2006. – 45. – P. 68–86.
25. Fourie P.H. Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens / P. H. Fourie, F. Halleen // *Eur. J. Plant Pathol.* – 2006. – 116. – P. 255-265.
26. Constable F. Review of vine health parameters, implementation priorities and capabilities for vine improvement groups and accredited nurseries / F. Constable, C. Drew. – Scholefield Robinson Horticultural Services Pty Ltd.: Australia, 2004. – 49 p.
27. Gonzalo A. D. Effects of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on grapevine rootstocks / A. D. Gonzalo, M. Esterio, J. Auger // *Cien. Inv. Agr.* – 2009, - 36(3). – P. 381-390.

Мулюкина Н. А., Карастан О. М., Папина Е. С., Г. В. Герецкий, Бойчук Е. А.

Современное состояние и перспектива молекулярно-генетических исследований в НИЦ «ИВиВ им. В. Е. Таирова»

*В обзоре представлена краткая информация относительно направлений и результатов молекулярно-генетических исследований в НИЦ «ИВиВ им. В. Е. Таирова». Показана перспективность использования микросателлитных ДНК-маркеров в изучении молекулярно-генетического полиморфизма сортов и видов рода *Vitis*, штаммов винных дрожжей *S. cerevisiae* и комплекса болезни многолетней древесины винограда – эска.*

Ключевые слова: микросателлитные маркеры, виноград, винные дрожжи, эска винограда.

N. A. Mulyukina, O. M. Karastan, O. S. Papina, G. V. Geretskiy, O. A. Boychuk

Current status and prospects of molecular genetic studies in NSC "IViV named after V. Ye. Tairova"

The summary of directions and results of molecular genetic investigations in the NSC "IViV named after V. Ye. Tairov. " is presented. The prospects of using microsatellite DNA markers in the study of molecular genetic polymorphism of varieties and species belonging to genus *Vitis*, wine yeast strains *S. cerevisiae* and perennial grape wood disease complex esca are shown.

Keywords: microsatellite markers, grapes, wine yeast, esca of the grapevine.