

*Н. А. Мулюкіна, д-р. с.-г. наук,  
Н. М. Зеленянська, д-р. с.-г. наук,  
Л. В. Іванова-Ханіна, канд. с.-г. наук,  
О. М. Карастан, зав. сектором*

Національний науковий центр  
«Інститут виноградарства і виноробства ім. В.Є. Таїрова»,  
Україна

*Д. Ю. Лосєва, стажер*  
Gustav Roussy Center,  
Франція

## ОПТИМІЗАЦІЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ ВИНОГРАДУ, ВІЛЬНОГО ВІД ВІРУСУ СКРУЧУВАННЯ ЛИСТЯ ВИНОГРАДУ

*Оптимізовано ряд прийомів (використання провокаційних середовищ, культура меристеми із подальшою хемотерапією) для отримання вихідного матеріалу сортів та клонів винограду, вільного від третього серотипу вірусу скручування листя винограду. Для визначення відсутності негативного впливу прийомів оздоровлення на генетичну стабільність винограду сорту Каберне Совіньйон застосовано ідентифікацію за допомогою мікросателітних маркерів.*

**Ключові слова:** виноград, третій серотип вірусу скручування листя, культура меристеми, рібавірин, мікросателітні маркери.

Методи культури *in vitro* у відношенні до отримання садивного матеріалу винограду, вільного від вірусів, є досить різноманітними та включають як діагностичні прийоми попереднього скринінгу, так і оздоровлення за рахунок використання окремих методів або їх комплексу [1-5]. Попередніми роботами [6-8], в тому числі фахівців ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» було показано можливості хемотерапії у сполученні із культурою меристеми для оздоровлення винограду від вірусів. Проте комплексне використання методів культури *in vitro* не лише для оздоровлення, але й для одночасної оцінки санітарного статусу рослини із залученням методів молекулярної генетики для оцінки генетичної стабільності отриманого вільного від вірусів вихідного матеріалу в Україні поки не проводилося.

Оскільки серед вірусних хвороб, охоплених санітарним контролем в системі сертифікації садивного матеріалу винограду найбільш шкідливим на виноградниках України є третій серотип вірусу скручування листя винограду, **метою** нашої роботи була оптимізація біотехнологічних прийомів отримання вихідного матеріалу винограду, вільного від ВСЛВ 3 із наступною оцінкою санітарного статусу та генетичної стабільності матеріалу.

### **Матеріал та методи**

Поверхневу стерилізацію рослинного матеріалу проводили 70% етанолом (35 сек) та 50% брадофеном (12 хв.) та промивали триразово автоклавованою дистильованою водою. В якості експлантів використовували апікальні меристеми бруньок вічка розміром 0,5-1,0 мм. Культивування меристем здійснювали на модифікованому поживному середовищі Мурасіге та Скуга із додаванням бензиламінопурину (БАП) у концентрації 1,0 мг/л та гіберелової кислоти (ГК) – 0,5 мг/л в умовах: температура – 24-26 °С, відносна вологість повітря – 60-70%, фотоперіод – 16 годин, освітленість – 2-3 тис. люкс.

Хемотерапію проводили за допомогою рібавірину у концентрації 10-20 мкг/мл.

Мікросателітний аналіз з метою оцінки генетичної стабільності матеріалу після хемотерапії у сполученні із культурою меристем проводили за сімома локусами: VVS2, VVMD7, VVMD27, VRZAG62, VRZAG79, VVMD28, VVMD32.

Прискорений скринінг на симптоми ураження третім серотипом вірусу скручування листя проводили на провокаційних середовищах із сорбітолом у концентрації 30-40%.

### Результати та обговорення

#### Культура меристем та обробка рибавірином

Оптимальний розмір меристеми винограду був визначений у попередніх роботах Івановою-Ханіною Л. з огляду як на її приживлюваність, так і на ефективність оздоровлення (термотерапія) на рівні 0,5-1,0 мм. В даному дослідженні баланс між розміром меристеми та ефективністю хемотерапії було досягнуто за рахунок варіювання концентрації рибавірину (більші концентрації при використанні більшого розміру апікальних меристем відповідно).

При проведенні оздоровлення за допомогою культури меристем та рибавірину було показано, що біометричні параметри рослин різного санітарного статусу (здорові та уражені третім серотипом вірусу скручування листа) відрізнялися, особливо у відношенні до частоти регенерації та висоти основного пагону (зазначені параметри зменшувалися у хворих рослин на 13% та на 34% відповідно).

#### Генетичний контроль (МС-аналіз)

Для підтвердження генетичної стабільності матеріалу після процедур оздоровлення було проведено мікросателітний аналіз за сімома МС-локусами (табл.1).

Таблиця 1

Генотипи рослин сорту Каберне Совіньон за МС-локусами

Варіант	Кількість отриманих рослин	Мікросателітні локуси та генотипи за ними						
		VVS2	VVMD7	VVMD27	VRZAG62	VRZAG79	VVMD28	VVMD32
До обробки (контроль)	5	139	241	176	190	256	244	256
		151	241	188	196	256	246	256
Культури меристем	11	139	241	176	190	256	244	256
		151	241	188	196	256	246	256
Культура меристем та хемотерапія	8	139	241	176	190	256	244	256
		151	241	188	196	256	246	256

Як видно з табл.1, алельні характеристики рослин, що були піддані культивуванню меристем та культурі меристеми із хемотерапією рибавірином, є ідентичними, що свідчить про генетичну стабільність генотипів на рівні МС-локусів та їх ідентичність з вихідним сортом Каберне Совіньон. На рис.1 показано результати електрофорезу продуктів ампліфікації ДНК зразків сорту Каберне Совіньон за МС-локусом VRZAG62.

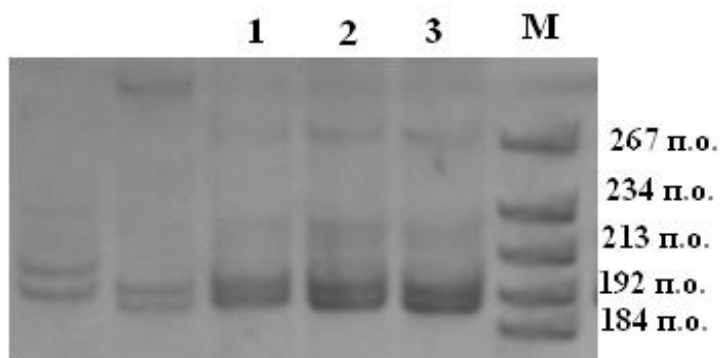


Рис. 1. Результати електрофорезу продуктів ампліфікації ДНК зразків сорту Каберне Совіньон за МС-локусом VRZAG62 (М – молекулярний маркер *pBR 322 DNA / Bsu RI*; 1, 2, 3 - зразки)

### *Санітарний контроль (облік симптомів на провокаційних середовищах)*

На першому етапі результативність проведених обробок було проконтрольовано на провокаційних середовищах із сорбітолом. Оскільки попередні дослідження, проведені на базі лабораторії культури тканин ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» показали можливість загибелі рослин на середовищах із концентрацією сорбітолу 40%, нами було оптимізовано склад середовища та використано концентрації 30 і 35%. Обидві концентрації не викликали загибелі рослин, а кількість хворих рослин, яка реагувала проявом симптомів, була майже однаковою.

Як видно з табл.2, здорові рослини не проявили жодного із симптомів скручування листя, в той час як практично усі уражені ВСЛВ 3 рослини на провокаційних середовищах реагували проявом трьох груп симптомів. Оскільки рослини двох дослідних груп в тій чи іншій мірі проявили симптоми скручування листя, імуноферментний аналіз було проведено у групах для безсимптомних рослин (6 та 7 рослин відповідно) та індивідуально для рослин, що проявили будь-який тип симптомів (6 рослин).

Таблиця 2

### **Симптоматологічна реакція рослин винограду на провокаційних середовищах із сорбітолом (35%)**

Вірусологічний статус	Кількість рослин та симптоматологічна реакція		
	Уповільнення росту	Почервоніння листків	Скручування листків
Контроль (здорові рослини)	0/5	0/5	0/5
Контроль (рослини, уражені ВСЛВ 3)	4/5	5/5	5/5
Дослід – рослини, уражені ВСЛВ, після культури меристеми	6/11	5/11	5/11
Дослід – рослини, уражені ВСЛВ, після культури меристеми із хемотерапією	2/8	2/8	1/8

Примітка: в чисельнику надана кількість рослин із симптомами, в знаменнику – загальна кількість рослин.

### **Висновки**

1. Оптимізований за співвідношенням «розмір меристеми/концентрація рибавірину» метод культури меристем у сполученні із хемотерапією показав високий рівень видалення ВСЛВ 3 (75% здорових рослин проти 63 порівняно із культурой меристем без хемотерапії).

2. Мікросателітний аналіз рослин після проходження культури меристеми та культури меристеми із хемотерапією рибавірином показав ідентичність характеристик за сімома МС-локусами, що свідчить про генетичну стабільність генотипів після процедур оздоровлення та їх ідентичність з вихідним сортом Каберне Совіньйон.

3. Показано можливість використання скринінгу в культурі *in vitro* на оптимізованих провокаційних середовищах із 35% сорбітолом на наявність/відсутність симптомів скручування листя винограду на сорті Каберне Совіньйон як методу попередньої оцінки для зменшення вибірки тестування методом ІФА.

### **Використані джерела**

1. Elimination of viruses from different varieties of grapevine (*Vitis vinifera* L.) using thermotherapy and chemotherapy / H. Malk, R. Davies, N. Habili, T. Herval, J. Randles // 17<sup>th</sup> Meet. ICVG, Davis, California, 7 - 14 October, 2012; extended abstracts. – Davis, 2012. – P. 266 -267.

2. Golino D. A. The use of shoot tip culture in foundation plant materials service programs / D. A. Golino, S.T. Sim, J. Berezcky, A. Rowhani // Proc. Int. Plant Propagation Soc. – 2000. – 50. – P. 568-573.
3. Virus elimination from grape selections using tissue culture at foundation plant services, University of California, Davis / S. Sim, M. Al Rwahnih, A. Rowhani, D. Golino // 17<sup>th</sup> Meet. ICVG, Davis, California, 7-14 October, 2012; extended abstracts. – Davis, 2012. – P. 262-263.
4. Tanne E. Rapidly diagnosing grapevine corky bark by in vitro micrografting / E.Tanne, N. Shlamovitz, P. Spiegel-Roy // Hort Science. – 1993. – 28 (6). – P. 667-668.
5. Tanne E. Rapid in vitro indexing of grapevine viral diseases; the effect of stress-inducing agent on the diagnosis of leafroll / E. Tanne, P. Spiegel-Roy, N.Shlamovitz // Plant Disease. – 1996. – Vol. 80, N 9 . – P. 972 -974.
6. Мулюкіна Н. А. Прижилкова мозаїка та борознистість деревини винограду (етіологія, діагностика, заходи боротьби) : дис. ... канд. біол. наук / Ніна Анатоліївна Мулюкіна. – К., 1993. – 155 с.
7. Отримання садивного матеріалу винограду, вільного від вірусів, за допомогою термотерапії і культури тканин / Б. Н. Мілкус, Дж. Ейворі, В. Н. Пинська, С. А. Стицько, А. В. Щербина // Захист рослин. – 2002. - № 7. – С. 19.
8. Бугаєнко Л. А. Использование биотехнологических методов для получения оздоровленного посадочного материала винограда / Л. А. Бугаенко, Н. А. Мулюкина, Л. В. Иванова-Ханина // Наукові праці ПФ НУБіП України «КАТУ» Сільськогосподарські науки. – Сімферополь, 2009 . – Вип. 127. – С. 174-76.

**Мулюкіна Н. А., Зеленянская Н. Н., Иванова-Ханина Л. В.,  
Карастан О. М., Лосева Д. Ю.**

#### **Оптимизация биотехнологии получения исходного материала винограда, свободного от вируса скручивания листьев**

*Оптимизирован ряд приемов (использование провокационных сред, культура меристемы с последующей хемотерапией) для получения исходного материала сортов и клонов винограда, свободных от третьего серотипа вируса скручивания листьев. Для подтверждения отсутствия отрицательного воздействия приёмов оздоровления на генетическую стабильность винограда сорта Каберне Совиньон использована идентификация при помощи микросателлитных маркеров.*

**Ключевые слова:** виноград, третий серотип вируса скручивания листьев винограда, культура меристем, рибавирин, микросателлитные маркеры.

**N. A. Muljukina, N. M. Zelenjanskaya, L.V. Ivanova-Khanina, O. M. Karastan,  
D. Ju. Losjeva**

#### **Optimization of GLRaV-3 virus free initial material obtaining biotechnology**

*The complex of in vitro methods for GLRaV-3 free grapevine material producing (stress-inductive media, meristeme culture with the next chemotherapy) has been optimized. For the identification of grapevine cultivar Cabernet Sauvignon identity after treatments the SSR analysis has been done.*

**Keywords:** grapevine, grapevine leafroll virus III, meristem culture, ribavirin, microsatellite markers.