

УДК 634.8

**ПРИМЕНЕНИЕ ДНК-ТЕХНОЛОГИЙ В ННЦ «ИВиВ им. В.Е. ТАИРОВА»**

Светлой памяти академика НААН Украины Сиволапа Ю.М. посвящается

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

ННЦ «ИВиВ имени В. Е. Таирова»

**Аннотация.** Предоставлено краткое описание основных этапов разработки и применения ДНК-технологий в исследованиях винограда (*Vitis vinifera* L.) на направлениях клоновой, генеративной селекции и санитарного контроля в ННЦ «ИВиВ им. В. Е. Таирова».

**Ключевые слова:** виноград, микросателлитные маркеры, вирусные и фитоплазменные болезни винограда, бактериальный рак винограда, полимеразная цепная реакция.

**Введение.** ДНК – технологии широко используются в исследованиях на различных направлениях генетики, селекции и фитопатологии винограда. Девяностые годы прошлого столетия были отмечены на этом пути несколькими методическими подходами, в частности, использованием ПДРФ-анализа для дифференциации сортов винограда [1]. В тот же период для детекции и идентификации вирусов винограда начинают использовать анализ двуспиральной РНК – репликативной формы РНК-содержащих вирусов [2].

Однако несколько позже основным методом для проведения исследований на указанных выше направлениях (изучение молекулярно-генетического полиморфизма винограда, диагностика и идентификация возбудителей болезней винограда) становится полимеразная цепная реакция.

UDC 634.8

**DNA-TECHNOLOGIES FOR GRAPEVINE RESEARCHES IN NSC “TAIROV RESEARCH INSTITUTE OF VITICULTURE AND WINE-MAKING”**

Dedicated to the memory of academician Y. M. Sivolap

*V.V. Vlasov, N.A. Muljukina, M.I. Tulaeva, I.A. Kovaljova, V.S. Chisnikov, L.O. Konup, O.M. Karastan, D.Ju. Losjeva*

NSC “Tairov Research Institute of viticulture and wine-making”

**Summary.** A brief description of the main steps of DNA-technologies applying in grapevine researches (*Vitis vinifera* L.) for clonal selection, breeding and sanitary control at National Scientific Centre “Tairov Research Institute of Viticulture and Enology” has been presented.

**Keywords:** grapevine, microsatellite markers, grapevine virus and phytoplasma diseases, grapevine crown gall disease, polymerase chain reaction.

ННЦ «ИВиВ им. В. Е. Таирова (на момент начала исследований в области применения ДНК-технологий – НПО по виноградарству и питомниководству) в 90-х годах прошлого столетия приступает к реализации широкомасштабной программы по разработке научного обеспечения сертифицированного виноградного питомниководства на базе созданного с этой целью Центра клоновой и фитосанитарной селекции винограда. Поскольку подобные программы в их европейском понимании охватывают такие направления, как клоновая селекция винограда, ускоренное размножение уникальных генотипов и получение исходного безвирусного посадочного материала, возникла необходимость разработки и использования ДНК-технологий.

Выполнение блока указанных выше задач было начато на первом этапе (1991-1995 гг.) при помощи отдела молекулярной генетики Всесоюзного селекционно-генетического института (г. Одесса) под руководством академика НААН Украины Сиволапа Ю.М. В дальнейшем (2001-2015 гг.) преимущественное большинство заданий на направлениях разработки и использования ДНК-технологий в исследованиях винограда выполнялось в рамках Программы научных исследований НААН Украины «Сельскохозяйственная биотехнология», руководителем которой был академик НААН Сиволап Ю. М.

Целью данного обзора является анализ результатов разработки и применения ДНК-технологий в ННЦ «ИВиВ им. В. Е. Таирова на направлениях клоновой и генеративной селекции, а также санитарного контроля фитопатогенов в системе сертифицированного виноградного питомниководства.

**Материал и методы исследований.** Материалом для исследований служили сорта и клоны селекции ННЦ «ИВиВ им. В. Е. Таирова».

Оценку молекулярно-генетического полиморфизма клонов сортов винограда в 1991-1995 гг. проводили методом ПДРФ-анализа [3], с 2001 года идентификацию сортов и подтверждение соответствия клонов исходным сортам винограда осуществляли с использованием микросателлитных маркеров [4].

Микросателлитный анализ проводили преимущественно по 9-ти МС-локусам (VVS2, ZAG62, ZAG 79, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVMD28, VVMD25, VVMD32), рекомендованными в европейских виноградарских

странах для идентификации сортов винограда [5].

Неспецифическое определение поражения вирусами винограда осуществляли с помощью выделения и анализа двуспиральной вирусной РНК (дсРНК), а также методом молекулярной гибридизации с радиоактивно мечеными и биотинилированными дсРНК зондами [6]. С 2008 года идентификацию возбудителей вирусных и фитоплазменных болезней винограда проводили с помощью ПЦР [7].

Идентификацию возбудителя бактериального рака винограда в период 1991-1995 гг. выполняли с помощью впервые разработанного специфического метода выявления возбудителя этой болезни *Agrobacterium tumefaciens* (vitis) путем гибридизации с радиоактивно меченым зондом, который представлял собой T-ДНК Ti-плазмиды [8].

С 2008 года идентификацию возбудителя бактериального рака винограда в ННЦ «ИВиВ им. В. Е. Таирова» проводили при помощи ПЦР со специфическими праймерами *virD2* и *ipt* [7].

#### **Результаты и обсуждение.**

**Исследование молекулярно-генетического полиморфизма винограда.** Приоритетные исследования молекулярно-генетического полиморфизма винограда были выполнены коллективом авторов под руководством академика Сиволапа Ю. М., заведующего отделом молекулярной генетики СГИ, и заведующей центром клоновой и фитосанитарной селекции винограда Института виноградарства и виноделия им. В. Е. Таирова, Тулаевой М. И.

С помощью метода анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов ДНК были исследованы генетические и эволюционные отношения у некоторых видов, сортов и клонов винограда, определены генетические дистанции между анализируемыми формами и построены дендрограммы, иллюстрирующие степень генетического сходства.

В частности, путем сравнения генетических дистанций между клонами сорта Каберне Совиньон селекции института ИНРА (Франция) и клонами этого же сорта 10-7-6 и 14-7-3 селекции ННЦ «ИВиВ им. В. Е. Таирова» было продемонстрировано генетическое сходство исследованных клонов между собой и относительная отдаленность от исходного сорта [3].

Оценка внутрисортной изменчивости подвойных сортов Рипариа × Рупестрис 101-14 (*V. riparia* × *V. rupestris*) и Рипариа Глуар де Монпелье (*V.*

riparia) с помощью ISSR-ПЦР продемонстрировала наличие определенного уровня гетерогенности сортов и соответствие распределения по морфологическим признакам, распределению по ДНК-локусам для клонов сорта Рипариа × Рупестрис 101-14.

Следующий этап изучения молекулярно-генетического полиморфизма винограда, который предусматривал использование полимеразной цепной реакции, был начат Тулаевой М. И. в 2007 году и продолжен под научным руководством Мулюкиной Н. А.

Так, Бочаровой В. Р. была проведена работа по оценке возможности дифференциации клонов в пределах сорта с помощью микросателлитных маркеров [9].

Работа Карастан О.М. была сфокусирована на исследовании молекулярно-генетического полиморфизма сортов отдела селекции, генетики и ампелографии, анализа их происхождения и оценке генетического разнообразия ампелографической коллекции сортов винограда ННЦ «ИВиВ им. В. Е. Таирова» [5, 10].

Результатом этого этапа исследований стало создание базы аллельного состояния микросателлитных локусов около 100 сортов селекции института Таирова и сортов ампелографической коллекции института.

На основе анализа полученных данных был выполнен микросателлитный анализ происхождения сортов и форм винограда селекции ННЦ «ИВиВ им. В. Е. Таирова», установлены родительские формы для сортов, полученных путем опыления смесью пыльцы, реконструированы генотипы некоторых сортов и форм, утраченных либо отсутствующих в ампелографических коллекциях Украины.

Впервые в Украине был применен метод маркер-сопутствующей селекции по признаку бессемянности винограда. В рамках этого исследования на широком генетическом фоне (15 бессемянных сортов, 25 семенных сортов, 23 гибридных сеянца) был проанализирован полиморфизм инtragenного микросателлитного маркера p3\_VVAGL11, сцепленного с проявлением признака бессемянности и проведен маркер-сопутствующий отбор среди сеянцев гибридной комбинации скрещивания Кобзарь × Русалка 3.

**Детекция и идентификация возбудителей вирусных, бактериальных и фитоплазменных болезней винограда.** Исследования

были выполнены в период в 1991-2000 гг. под научным руководством академика Сиволапа Ю.М. и доктора биологических наук, заведующего лабораторией вирусологии и микробиологии института виноградарства и виноделия им. В. Е. Таирова Милкуса Б. Н.

В частности, авторским коллективом сотрудников двух институтов была создана приоритетная разработка метода специфической диагностики возбудителя бактериального рака винограда при помощи молекулярной гибридизации с радиоактивно меченым зондом, который представлял собой радиоактивно меченую T-ДНК Ti-плазмиды возбудителя бактериального рака винограда *Agrobacterium tumefaciens* (vitis).

Высокая чувствительность и специфичность метода позволили протестировать тысячи растений клонов сортов винограда, которые стали основой размножения здорового посадочного материала в питомниках Украины [8]. Это позволило определить санитарное состояние биологических категорий посадочного материала винограда (исходный, базовый и сертифицированный) как контролируемый на поражение возбудителем бактериального рака винограда.

С 2008 года диагностика возбудителя бактериального рака винограда в лаборатории вирусологии и микробиологии ННЦ «ИВиВ им. В. Е. Таирова» выполняется с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) [7]. Это позволило оценить санитарное состояние посадочного материала зарубежного происхождения и произведенного в Украине в отношении латентного поражения возбудителем бактериального рака. Была подтверждена необходимость тщательного санитарного контроля за ввозом импортного посадочного материала винограда по причине высокого уровня поражения данной болезнью, оценен риск распространения инфекции в пределах участков, на которых были выявлены начальные очаги поражения этим опасным патогеном.

В отношении определения пораженности маточников и посадочного материала винограда вирусными болезнями коллективом ученых селекционно-генетического института и института виноградарства и виноделия им. В. Е. Таирова было предложено на первых этапах отбора материала применить разработанный ими метод неспецифического скрининга на поражение вирусами короткоузлия, скручивания листьев и мраморности винограда. На первом этапе такой скрининг выполнялся с

использованием выделения и электрофоретического анализа двуспиральной вирусной РНК.

На следующем этапе в отделе молекулярной генетики СГИ для упрощения методики и с целью возможности тестирования большого количества образцов был разработан метод молекулярной гибридизации с радиоактивно мечеными и биотинилированными дсРНК-зондами [6]. Оба метода были использованы для предварительного тестирования клонов сортов винограда на латентное поражение вирусами винограда. В случае неспецифического выявления наличия вирусной инфекции для дальнейшей идентификации вирусов использовали метод иммуноферментного анализа.

С 2008 года в лаборатории вирусологии и микробиологии ННЦ «ИВиВ им. В. Е. Таирова» для идентификации возбудителей вирусных и фитоплазмовых болезней винограда используют ПЦР [7].

Еще одним направлением применения ДНК-технологий в исследованиях винограда стал генетический и санитарный контроль материала на этапах отбора и получения безвирусного исходного посадочного материала. Так, анализ дсРНК и молекулярная гибридизация были использованы для оценки санитарного состояния материала после хемо- и термотерапии, а именно для подтверждения статуса «безвирусный» [11].

Для оценки генетической однородности материала после проведения химиотерапии *in vitro* был использован метод микросателлитного анализа [12]. Проведенные исследования показали, что применение рибавирина в культуре апексов для оздоровления сорта Каберне-Совиньон от скручивания листьев винограда не приводит к выраженным генетическим изменениям исходного материала.

**Выводы.** 1. Применение ДНК-технологий в селекции винограда позволило разработать методические подходы к дифференциации клонов подвойных и привойных сортов винограда, проанализировать происхождение ряда сортов селекции ННЦ «ИВиВ им. В. Е. Таирова» и применить элементы маркерной селекции для создания бессемянных сортов.

2. ДНК-технологии как составляющая системы санитарного контроля в производстве посадочного материала винограда европейской категории «сертифицированный» позволили провести широкомасштабный скрининг исходного материала на клоновой и генеративной основе на поражение

вирусними, бактеріальними і фітоплазменними болезнями і провести изучение их распространения на виноградниках України.

#### Литература

1. Blaich R. The analysis of restriction fragment length polymorphism as a tool for the differentiation of grapevine cultivars // *Riv.viticult. e enol.* – 1989. – 42. № 1. – P. 33-35
2. Mossop D.W., Elliott D.R., Richards K.D. Association of closterovirus-like particles and high molecular weight double-stranded RNA with grapevine affected by leaf-roll disease // *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 внутрисортовой 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 // *Виноградарство і виноробство: міжвідомчий тематичний науковий збірник.* – 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. Мулюкіна, А. А. Русин // *Биотехнология.* – 1992. – № 6. – С. 55-58.
7. Мулюкіна, Н. А. Бактериальный рак и фитоплазменная инфекция винограда: диагностика, идентификация, меры борьбы /Н. А. Мулюкіна, Л. А. Конуп, В. Л. Чистякова, А. В. Щербина, А. И. Конуп // *Виноградарство і виноробство: міжв. тем. наук. зб.* – Одеса, 2009. – Вип. 46(2). – С. 41-43.
8. Сиволап, Ю. М. Биотехнологический метод диагностики бактериального рака / Ю. М. Сиволап, Л. Ф. Дьяченко, Б. Н. Милкус // *Биотехнология.* – 1991. – №5. – С. 82-85.
9. Мулюкіна, Н.А. Ідентифікація та паспортизація генотипів винограду за допомогою ДНК-маркер /Н. А. Мулюкіна, В. Р. Бочарова, М. І. Тулаєва, І. А. Ковалева ів // *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. Мулюкіна, И. А. Ковалева, Л. В. Герус, О. М. Карастан, А. А. Небиш, К. С. Маргарян, Г. Г. Мелян, Р. М. Арутюнян // *Биологический журнал Армении.* – 2014. – №1 (66). – С. 103-106.
11. Мулюкіна, Н.А. Прижилкова мозаїка та борознистіть деревини винограду (етіологія, діагностика, заходи боротьби): автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол.наук. – Київ, 1993. – 18 с.
12. Мулюкіна, Н. А. Методи оздоровлення від вірусів винограду із застосуванням культури *in vitro* // *Виноградарство і виноробство: міжв. наук. тем. зб.* / Н. А. Мулюкіна, Н. М. Зеленянська, Д. Ю. Лосєва, Н. І. Ніколаєва, О. М. Карастан, Г. В. Плачинда – Одеса: ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», 2013. – Вип. 50. – С. 198-204.