

УДК 634:836:631.537

DOI <https://doi.org/10.32851/2226-0099.2020.115.11>

## ГЕНЕТИКО-САНИТАРНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛОНІВ СОРТІВ ВИНОГРАДУ ЯК ОСНОВА СЕРТИФІКОВАНОГО ВИНОГРАДНОГО РОЗСАДНИЦТВА УКРАЇНИ

Ковальова І.А. – к.с.-г.н., директор,

Національний науковий центр

«Інститут виноградарства і виноробства імені В.Є. Таїрова»

У статті проаналізовано результати генетичного та санітарного контролю клонів селекції ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» сортів технічного й підщепного напрямів використання відповідно до європейських вимог до генетичної ідентичності й санітарного статусу «вільний від вірусів», які розмножуються за правилами системи виробництва біологічних категорій садивного матеріалу «базовий» і «сертифікований».

З використанням ампелографічного опису й мікросателітних ДНК-маркерів показано, що клони технічних, столових і підщепних сортів винограду характеризуються відповідністю вихідному сорту (*true-to-type*), що є необхідною передумовою їх використання в системі виробництва садивного матеріалу винограду біологічних категорій «базовий» і «сертифікований».

Аналіз даних імуноферментного аналізу та полімеразної ланцюгової реакції показав, що санітарний стан клонів, рекомендованих для розмноження, відповідно до вимог європейського законодавства щодо садивного матеріалу винограду категорії «сертифікований», характеризується відсутністю вірусів мозаїки резухи (*ArMV*), коротковузля винограду (*GFLV*), першого і третього серотипів вірусу скручування листя винограду (*GLRaV I*, *GLRaV III*), практичною відсутністю вірусу мармуровості (*GFKV*) та вірусів А і В винограду (*GVA*, *GVB*), асоційованих із борознистістю деревини. Постійний візуальний і вибірковий ДНК-контроль збудників бактеріального раку й фітоплазмозних хвороб показав їх відсутність або мінімізацію рівнів інфекції.

Визначено групу клонів, які внаслідок належності до сортів, чутливих до бактеріального раку винограду (Каберне Совіньйон, Одеський чорний, Трамінер рожжевий) і фітоплазмозних хвороб (Шардоне, Сухоліманський білий), потребують розробки більш суворої схеми санітарного контролю, ніж клони інших досліджених сортів винограду.

Розроблено та запропоновано до практичного використання схему санітарного контролю бактеріального раку й фітоплазмозних хвороб винограду на клонах сортів, чутливих до цих хвороб, з метою використання в системі виробництва садивного матеріалу винограду біологічних категорій «базовий» і «сертифікований» із більш частішою лабораторною перевіркою, використанням термотерапії та ітамів-антагоністів збудника бактеріального раку.

**Ключові слова:** виноград, клони й сорти, генетичний контроль, мікросателітний аналіз, санітарний контроль, віруси винограду, бактеріальний рак винограду, фітоплазмозні хвороби.

### **Kovaljova I.A. Genetic and sanitary characteristics of grape variety clones as the basis for certified grapevine propagation in Ukraine**

The paper analyzes the results of genetic and sanitary control of clones selected at NSC "Tairov Research Institute of Viticulture and Wine-Making" of wine varieties and rootstocks according to European requirements for genetic identity and sanitary status "virus-free", which are propagated under the production system of planting material of biological categories "base" and "certified".

Using ampelographic description and microsatellite DNA markers, it is shown that clones of wine varieties and rootstocks are characterized by conformity to the original variety (*true-to-type*), which is a necessary prerequisite for their use in the production of grapevine planting material of biological categories.

Analysis of enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction data showed that the sanitary status of clones recommended for propagation in accordance with the requirements of European legislation on planting material of the category "certified" is

characterized by the absence of arabis mosaic virus (*ArMV*), grapevine fanleaf virus (*GFLV*), grapevine leafroll viruses I and III (*GLRaV I*, *GLRaV III*), the practical absence of grapevine fleck virus (*GFkV*) and grapevine A and B viruses (*GVA*, *GVB*) associated with rugose wood complex. Continuous visual and selective DNA control of crown gall and phytoplasma diseases agents showed their absence or minimization of infection levels.

A group of clones has been identified which, due to belonging to varieties susceptible to grapevine crown gall disease agent (*Cabernet Sauvignon*, *Odessa Black*, *Traminer Pink*) and phytoplasma diseases (*Chardonnay*, *Sukholimansky White*) require the development of a stricter scheme of sanitary control than other clones.

A scheme of grapevine crown gall and phytoplasma diseases control on clones of varieties susceptible to these diseases has been developed and proposed for practical use into the system of production of grapevine planting material of biological categories "base" and "certified" with more frequent laboratory testing, thermotherapy and grapevine crown gall agent antagonists.

**Key words:** grapevine, clones and varieties, genetic control, microsatellite analysis, sanitary control, grapevine viruses, grapevine crown gall disease, phytoplasma diseases.

**Постановка проблеми.** Генетичний і санітарний контроль є необхідним складником європейських схем сертифікації садивного матеріалу винограду. Отже, вітчизняні українські клони сортів винограду різного напрямку використання, окрім ознак якості, продуктивності й адаптивності до ґрунтово-кліматичних умов мусять мати молекулярно-генетичне підтвердження сортової відповідності (*true-to-type*) і бути вільними від мінімального переліку вірусних хвороб, рекомендованих Євросоюзом для контролю на біологічних категоріях садивного матеріалу. Ці параметри контролюються стандартною схемою сертифікації садивного матеріалу винограду, проте генетичні відмінності сортименту кожної виноградарської країни та особливості фітосанітарного стану виноградників (склад патогенів, рівні ураження тощо) вимагають корегування схем сертифікації садивного матеріалу винограду в Україні.

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** Загальна схема виробництва садивного матеріалу біологічних категорій у європейських виноградарських країнах контролюється Директивами Євросоюзу, а аспекти генетичного та санітарного контролю – відповідними стандартами [1; 2].

Генетична відповідність клону вихідному сорту вірогідно може бути підтверджена лише молекулярно-генетичними методами [3]. Більше того, ці методи також дають можливість диференціації клонів. Так, S. Riaz зі співавторами використовував мікросателітні маркери для детекції внутрішньосортової мінливості в сортів Шардоне та Піно нуар [4].

Санітарний статус клону визначається комплексом процедур, який полягає в щорічній візуальній санітарній селекції, індексації щепленням на сорти-індикатори й лабораторною діагностикою 7 вірусів – *GFLV* (вірус коротковузля винограду), *ArMV* (вірус мозаїки резухи), *GLRaV I* (перший серотип вірусу скручування листя винограду), *GLRaV III* (третій серотип вірусу скручування листя винограду), *GFkV* (вірус мармуровості винограду), *GVA* (вірус А винограду), *GVB* (вірус В винограду). Особливості поширення вірусів – повільне розповсюдження інфекції за допомогою ґрунтових нематод і комах-переносників – дають змогу як отримувати здоровий садивний матеріал, так і запобігати вторинному ураженню, водночас об'єкти, що включені до схеми сертифікації дещо пізніше (збудники бактеріального раку та фітоплазмозних хвороб), складніше контролюються [5; 6] і потребують більш ретельного застосування процедур польового та лабораторного контролю. Цього можна досягти за рахунок унесення змін до стандартної процедури санітарного контролю [7].

**Постановка завдання.** В основу робочої гіпотези дослідження покладене припущення щодо можливих відмінностей у генетичній однорідності й санітарному статусі клонів вітчизняної селекції через особливості сортименту та видового складу патогенів на виноградниках.

**Метою роботи** є аналіз результатів генетичного й санітарного контролю клонів селекції ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» сортів столового, технічного та підщепного напрямів використання відповідно до європейських вимог до генетичної ідентичності й санітарного статусу «вільний від вірусів» у системі виробництва біологічних категорій садивного матеріалу винограду та корегування схеми сертифікації садивного матеріалу винограду біологічних категорій для українського розсадництва. Для цього потрібно вирішити такі завдання:

- проаналізувати дані ампелографічного опису та мікросателітного аналізу клонів сортів столового, технічного й підщепного напрямів використання та підтвердження на підставі цього їх належності до вихідного сорту;
- проаналізувати дані тестування на вірусні хвороби винограду за допомогою методів ІФА та ПЛР і визначити санітарний статус клонового матеріалу;
- визначити наявність генотипів клонів, чутливих до ураження бактеріальним раком і фітоплазмовими хворобами, і модифікувати схему санітарного контролю для них.

Матеріалом для досліджень були клони селекції ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова», а саме: клони технічних сортів Аліготе, Голубок, Іршаї Олівер, Мускат Одеський чорний, Піно чорний, Ріслінг рейнський, Ркацителі, Рубін Таїровський, Сапераві, Сухолиманський білий, Совіньйон зелений, Трамінер рожевий і Шардоне в загальній кількості 34 клони, а також клони підщепних сортів Р х Р 101-14, БхР СО4 та Б х Р Кобера 5 ББ в загальній кількості 9 клонів.

Для виконання дослідження використано стандартні методи: молекулярно-генетичні – мікросателітний аналіз, імунологічні – імуноферментний аналіз і ПЛР із зворотною транскрипцією для виявлення вірусів винограду.

**Виклад основного матеріалу дослідження.** Мікросателітний аналіз і генетична відповідність клонів селекції ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» вихідному сорту підтверджена на першому етапі ампелографічним описом. На другому етапі проведено мікросателітний аналіз за 5-ма – 9-ма МС-локусами (В.Р. Бочарова зі співавторами, 2009) [8; 9], який не виявив випадків невідповідності вихідному сорту (таблиця 1).

Вегетативне розмноження винограду зумовлює накопичення соматичних мутацій, які є джерелом клонової мінливості [10]. Отже, мікросателітний аналіз використовується в деяких випадках для прояснення походження клонів. Так, МС-аналіз клонів сортів Піно Нуар і Піно Менсьє дав змогу виявити генетичний поліморфізм за локусом VVS2 [11]. Як відомо, процес клонової селекції може призводити до певних помилок, наприклад, у разі близького походження сортів [3]. Аналіз даних таблиці 1 демонструє, що всі проаналізовані клони належали до заявлених вихідних сортів як у випадку стародавніх європейських технічних сортів, так і у випадку, коли клоновий добір проведено на технічних сортах селекції ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова».

**Санітарний статус клонів щодо ураження вірусами винограду та відповідність європейським вимогам.** Найбільш відповідальним є санітарний контроль на банку клонів, оскільки із цього етапу іде первинне розмноження та закладання маточних насаджень категорії «базові». Більше того, стратегія паралельного генетичного та санітарного контролю, як визнано, є найбільш ефективною [12]. Резуль-

Таблиця 1

**Генетичний контроль клонового матеріалу технічних сортів  
винограду селекції ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» (вибірково)**

Сорти, на яких проведено клоновий добір	Кількість клонів	Відповідність вихідному сорту за даними ботанічного/ампелографічного опису	Відповідність сорту за даними МС-аналізу (кількість локусів)
Голубок	2	так	9 локусів
Каберне Совінйон	5	так	9 локусів
Одеський чорний	2	так	9 локусів
Ркацителі	3	так	9 локусів
Сухолиманський білий	3	так	9 локусів
Ріпарія х Рупестріс 101-14	3	Відповідає з деякими змінами ознак вічка та молодого пагону	Не проводили
Берландієрі х Ріпарія СО4	3	Так	5 локусів
Берландієрі х Ріпарія Кобера 5 ВВ	3	Так	6 локусів

тати аналізу клонів технічних сортів винограду методом ІФА на вірусні хвороби й методом ПЛР на збудника бактеріального раку винограду продемонстрували практичну відсутність вірусної інфекції на банку клонів. Латентна вірусна інфекція (вірус коротковузля винограду, перший і третій серотипи вірусу скручування листя винограду – по одному кущу на клон) виявлена на окремих кущах трьох клонів серед 34-х клонів технічних сортів, що проходили тестування (рис. 1) [13]. Водночас бактеріальний рак винограду виявлений візуально та методом ПЛР на 8-ми клонах із 34-х досліджених, що свідчить про складнощі контролю цієї хвороби порівняно з вірусними; фітоплазмову інфекцію контролювали візуально, її виявлено на окремих кущах 2-х клонів сорту Сухолиманський білий.

На досліджених клонах 3-х підщепних сортів не виявлено вірусної інфекції та збудника бактеріального раку винограду.

Аналіз на вірусні хвороби й бактеріальний рак винограду, проведений у кількох виноградарських регіонах на базових маточниках, продемонстрував трохи вищі рівні ураження вірусними хворобами – 8 кущів (імовірно, за рахунок вторинного ураження) – і розширення переліку сортів, уражених бактеріальним раком винограду порівняно з банком клонів. Крім того, ураження бактеріальним раком виявлено також на підщепних сортах винограду (наприклад, на підщепі Телекі 5 С у Закарпатті). Як видно з рисунку, переважна частина клонів – понад 75% – є вільною від усіх

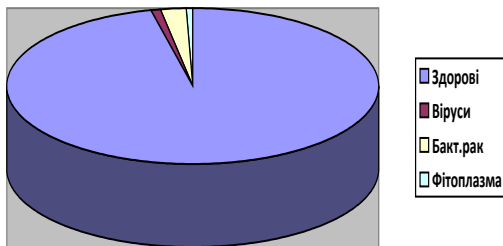


Рис. 1. Частина здорових та уражених кущів клонів технічних сортів на банку клонів (2017–2019 рр., вибірково)

типів хронічних хвороб. Оскільки ураження бактеріальним раком і фітоплазмою виявлено на окремих кущах клонів, їх видалення з банку клонів також дало можливість використання інших рослин цього ж клону для подальшого розмноження.

**Клони сортів, чутливих до збудників бактеріального раку й фітоплазм; особливості санітарного контролю.** Санітарний контроль у виробництві садивного матеріалу біологічних категорій відбувається за загальними правилами, проте має певні особливості в різних країнах через відмінності сортименту та спектру патогенів і їх поширення на виноградниках. Ці особливості, як правило, стосуються переліку патогенів і суворості заходів їх контролю. Результати санітарного контролю клонів винограду в Україні приводять до висновку, що особливості можуть також стосуватися сортименту винограду через чутливість окремих сортів до певних патогенів. Це стосується такої хвороби, як бактеріальний рак винограду [14], і фітоплазмозних хвороб [15]. Так, симптоми бактеріального раку виявлялися нами частіше на клонах сортів Каберне Совіньйон та Одеський чорний (Каберне Совіньйон х Алікант Буше). Єдиний випадок виявлення симптомів фітоплазмозної інфекції був на клоні сорту Сухолиманський білий – нащадку чутливого до ураження фітоплазмою сорту Шардоне.

Запропонована нами схема санітарного контролю для цих 2-х хвороб [16] базується на більш суворому періодичному лабораторному контролі (на банку клонів – щорічно замість 1 раз на три роки в попередній версії санітарного контролю та одночасному використанні додаткових методів зниження рівня інфікованості). Для збудника бактеріального раку це насамперед застосування методу біологічного захисту – штамів-антагоністів [17], для фітоплазмозних хвороб – використання термотерапії [18].

**Висновки і пропозиції.** У генетичному стосунку клони технічних і підщепних сортів винограду селекції ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» характеризуються відповідністю вихідному сорту (true-to-type-ness), що підтверджено ампелографічним описом і методом мікросателітного аналізу.

Санітарний стан клонів, рекомендованих для розмноження, відповідно до вимог європейського законодавства щодо садивного матеріалу винограду категорії «базовий» і «сертифікований», характеризується відсутністю вірусів мозаїки резухи (ArMV), коротковузля винограду (GFLV), першого та третього серотипів вірусу скручування листя винограду (GLRaV I, GLRaV III), практичною відсутністю вірусу мрамуровості (GFkV) та вірусів А і В винограду (GVA, GVB), асоційованих із борознистістю деревини. Постійний візуальний і вибірковий ДНК-контроль збудників бактеріального раку й фітоплазмозних хвороб гарантує їх відсутність або мінімізацію рівнів інфекції.

Заходи стандартного санітарного контролю на сортах, чутливих до бактеріального раку, доцільно проводити з використанням передпосадкової обробки кореневої системи саджанців штамми-антагоністами збудника бактеріального раку. На сортах, чутливих до фітоплазми, варто використовувати термотерапію на етапах отримання садивного матеріалу винограду. Для обох хвороб рекомендовано більш суворий лабораторний контроль – 1 раз на рік замість одного разу на три роки для рослин банку клонів у попередній версії технології виробництва сертифікованого садивного матеріалу винограду в Україні.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:**

1. Council Directive 2002/11/EC of 14 February 2002 amending Directive 68/193/EEC on the marketing of material for the vegetative propagation of the vine and repealing Directive 74/649/EEC.
2. EPPO Standards. Certification schemes. Pathogen-tested material of grapevine varieties and rootstocks. *European and Mediterranean Plant Protection Organization, Paris, France*. 2003. № 1. 13 p.
3. Cretazzo E., Meneghetti S., De Andres M.T., Gaforio L., Frare E. et Cifre J. Clone differentiation and varietal identification by means of SSR, AFLP, SAMPL and M-AFLP in order to assess the clonal selection of grapevine: the case study of Manto Negro, Callet and Moll, autochthonous cultivars of Majorca. *Ann. of Appl. Biol.* 2010. № 157. P. 213–227.
4. Riaz S., Garrison K.E., Dangl G.S., Boursiquot J.M., Meredith C.P. Genetic divergence and chimerism within ancient asexually propagated wine grape cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 2002. № 127. P. 508–514.
5. Armijo G., Schlechter R., Agurto M., Munoz D., Nunez C., Arce-Johnson P. Grapevine pathogenic microorganisms: understanding infection strategies and host response scenarios. *Front in Plant Sci.* 2016. № 7(382). P. 1–18.
6. Kolber M. Phytoplasma diseases of grapevine and the possible measures to control them. *Int. J. of Hort. Sci.* 2011. № 17 (3). P. 37–43.
7. Grohs D.S., Almanca M.A.K., Fajardo T.V.M., Halleen F., Miele A. Advances in propagation of grapevine in the world. *Rev. Bras. De Frutic.* 2017. № 39 (4). P. 1–15.
8. Бочарова В.Р. Генетико-морфологічний поліморфізм рослин винограду як показник диференціації для використання в селекції : дис. ... канд. біол. наук. Одеса, 2011. 204 с.
9. Bocharova V.R., Kovaljova I.A., Mazurenko L.S. Identification of grapevine clone genotypes by use of microsatellite markers. *Cytology and Genetics.* 2009. № 43 (6). P. 371–378.
10. Vondras A.M., Minio A., Blanco-Ulate B., Figueroa-Banderas R., Penn M.A., Zhou Y., Seymour D., Ye Z., Liang D., Espinosa L.K., Anderson M.M., Walker A., Gaut B. and Cantu D. The genomic diversification of grapevine clones. *BMC Genomics.* 2019. № 20. P. 972.
11. Stenkamp S.H.G., Becker M.S., Hill B.H.E., Blaich R., Forneck A. Clonal variation and stability assay of chimeric Pinot Meunier (*Vitis vinifera* L.) and descending sports. *Euphytica.* 2008. № 165 (1). P. 197–209.
12. Mannini F. Clonal selection in grapevine: interaction between genetic and sanitary strategies to improve propagation material. *Acta Hort.* 2000. № 528. 106 p.
13. Мулюкіна Н.А. Система санітарного контролю у виноградних розсадниках України : дис. ... докт. с.-г. наук. Одеса, 2008. 560 с.
14. Waite H., Whitelaw-Weckert M., Torley P. Grapevine propagation: principles and methods for the production of high-quality grapevine planting material. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science.* 2015. № 43 (2). P. 144–16.
15. Golino D., Fuchs M., Rwahnih M.A., Farrar K., Schmidt A., Martelli G.P. Regulatory aspects of grape viruses and virus diseases: certification and harmonization. В. Meng et al. (eds.), *Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management*, 2017. P. 581–598.
16. Система сертифікованого виноградного розсадництва України / Я.М. Гадзало та ін. ; наук. ред. акад. В.В. Власов. Київ : Аграрна наука, 2015. 287 с.
17. Habbadi K., Benkirane R., Benbouazza A., Bouaichi A., Maafa I., Chapulliot D., Achbani E.H. Biological control of grapevine crown gall caused by *Allorhizobium vitis* using bacterial antagonists. *International Journal of Science and Research (IJSR).* 2017. № 6 (6). P. 1390–1397.
18. Chalak L., Elbitar A., Mourad N., Mortada C., Choueri E. Elimination of grapevine bois noir phytoplasma by tissue culture coupled or not with heat therapy or not with heat therapy or hot water treatment. *Advances in crop science and technology.* 2013. № 01 (02). P. 1–4.