

## РЕЗУЛЬТАТИ САНІТАРНОЇ СЕЛЕКЦІЇ КЛОНІВ СОРТІВ ВИНОГРАДУ

**Н.А. Мулюкіна, М.І. Тулаєва, кандидати біологічних наук**  
**В.Ф. Хілько, доктор сільськогосподарських наук**  
**В.С. Чисніков, кандидат сільськогосподарських наук**  
**В.Л. Чистякова, Л.С. Мазуренко, молодші наукові співробітники**  
**І.А. Ковальова, науковий співробітник**  
**Національний науковий центр “Інститут виноградарства і виноробства**  
**ім. В.Є. Таїрова”**

---

*Наведено результати санітарної селекції клонів винограду, відібраних у 1981 – 1990 рр. у Центрі клонової селекції ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова». Показано, що ефективність санітарного контролю на етапах дослідження двох вегетативних поколінь залежить від комплексного використання методів тестування та періодичності їх застосування. Визначено, що санітарний стан близько 50 перспективних клонів, рекомендованих для промислового розмноження, характеризується відсутністю найбільш шкідливих вірусних хвороб – коротковузля, скручування листя та борознистості деревини винограду.*

**Санітарна селекція, клонова селекція, вегетативне покоління, вірусні хвороби винограду, індексація щепленням, імуноферментний аналіз, дволанцюгова РНК, молекулярна гібридизація.**

Санітарна селекція на клонодослідних ділянках є однією з головних складових технології отримання сертифікованого садивного матеріалу винограду [1, 2, 3]. Саме тут шляхом застосування комплексу методів оцінки визначається санітарний статус клону (відносно вірусної інфекції).

Прийоми та методи санітарної селекції, які застосовуються під час клонового добору, розмноження та санітарної сертифікації садивного матеріалу винограду в виноградарських країнах світу, є достатньо відомими [2, 3, 4]. Проте аналіз ефективності їх застосування щодо клонового матеріалу української селекції не проводився.

Метою роботи була оцінка ефективності санітарної селекції клонів винограду. Для цього слід було вирішити такі задачі:

- оцінити ефективність і результати санітарних заходів на етапах вивчення кущів-кандидатів у клони та двох вегетативних поколінь клонів винограду;
- визначити технологічні етапи, на яких збільшується ймовірність ураження та засоби запобігання цьому;

проаналізувати результати санітарної оцінки стану клонів у відношенні прихованого ураження вірусами, отримані за допомогою різних методів.

Дослідження проведено в Центрі клонової селекції ННЦ “ІВіВ ім. В.Є. Таїрова” протягом 1985 – 2006 рр. (наукові керівники робіт у 1985–2000 рр. – д.б.н. Мілкус Б.Н., у 2001–2006 – к.б.н. Мулюкіна Н.А.)

Роботу було здійснено на клонах, відібраних у різні роки в регіонах України. Вони являли собою різноманітний та складний матеріал для санітарної селекції через різну епідеміологічну ситуацію в цих регіонах. Всебічне вивчення клонів проведено протягом 15 – 20 років.

Первинний матеріал був представлений понад 500 вихідними кущами-клонами прищепних і підщепних сортів, з них у подальшому відібрали і розмножили 230 клонів першого вегетативного покоління, на яких застосовано повний комплекс польових і лабораторних методів санітарної селекції. Особливу увагу приділяли лабораторному тестуванню близько 50 клонів другого вегетативного покоління.

Основні санітарні вимоги до клонодослідних ділянок щодо вірусної інфекції полягали у використанні ґрунтів, в яких не було нематод-переносників НЕПО-вірусів та просторовій ізоляції від промислових насаджень плодкових культур та виноградників [2].

Щодо методики клонової селекції і комплексних технологічних завдань зі створення здорового садивного матеріалу перед закладанням ділянок клонодослідження першого вегетативного покоління кущі-родоначальники клонів (або  $P_0$ ) проходили попередню перевірку на приховане ураження найбільш шкідливими вірусами – коротковузлям і скручуванням листя винограду. Це дозволило запобігти занесенню небезпечних хвороб на клонодослідні ділянки та зберегти ґрунти на ній у відповідному санітарному стані.

Санітарні заходи включали візуальну санітарну селекцію (двічі на рік) та повне проходження всіх видів польового і лабораторного тестування на етапі першого вегетативного покоління ( $P_1$ ).

На етапі другого вегетативного покоління (P<sub>2</sub>) здійснювали повторне лабораторне тестування перспективних клонів, або проводили ті діагностичні процедури, що не використовували за тестування першого вегетативного покоління.

Тестування клонів, проведене в Центрі клонової селекції Національного наукового Центру «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» можна розподілити на чотири основних етапи (табл. 1).

1. Тестування клонового матеріалу винограду на приховане ураження вірусною інфекцією

Тип тестованого матеріалу	Періоди тестування та кількість тестованих клонів (або вихідних кущів-клонів)			
	1985–1990 рр.	1991–1995 рр.	1996–2000 рр.	2001–2006 рр.
Клони прищепних сортів	131 клон 66-ти сортів	376 клонів 81-го сорту	45 клонів 21-го сорту	28 клонів 23-х сортів
Клони підщепних сортів	17 клонів 3-х сортів	59 клонів 5-ти сортів	18 клонів трьох сортів	7 клонів 3-х сортів

Перший етап тривав, з 1985 до 1990 року, характеризувався переважним тестуванням вихідних кущів клонів і клонів першого вегетативного покоління. Тестування базувалось на індексації щепленням і серологічних методах. На початку робіт для виявлення вірусної інфекції застосовували тест віробактеріальної аглютинації, з 1987 р. для тестування почали широко використовувати імуноферментний аналіз (ІФА), діагностичні набори для проведення якого отримували в лабораторії вірусології та мікробіології ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» [5].

На другому етапі, з 1991 до 1995 рр. тестування проходили, головним чином, клони першого вегетативного покоління. Для перевірки на приховане ураження вірусною інфекцією використовували ІФА (діагностичні набори

власного виробництва та з 1995 року – діагностичні набори виробництва фірми „Агрітест” (Італія)) [5, 6]. Як допоміжні методи неспецифічного скринінгу використовували аналіз електрофоретичних профілів дволанцюгової РНК (длРНК) та молекулярну гібридизацію з длРНК-зондами [7, 8].

З 1991 до 1995 рр. було тестовано найбільшу кількість клонів, через технологічні особливості процесів клонової та санітарної селекції на етапі першого вегетативного покоління [2].

З 1996 до 2006 рр. перевагу в тестуванні отримують клони другого вегетативного покоління рекомендовані для розмноження, та рослини банку клонів, що зменшило вибірку тестування. Тим самим закінчуються етапи вивчення клонів, які були відібрані в 1981–1990 рр. Головним методом для виявлення вірусів залишається імуноферментний аналіз, хоча для вибіркового контролю санітарного стану клонів використовується аналіз електрофоретичних профілів длРНК та молекулярна гібридизація.

Санітарний стан перспективних клонів щодо вірусної інфекції остаточно визначали на підставі результатів, отриманих кількома різними методами. Це важливо, особливо із урахуванням того, що перелік вірусних хвороб, на які проводилося тестування лабораторними методами, розширювався поступово, із збільшувався доступної методичної бази сертифікованого розсадництва в світі. Так, на перших двох етапах, зазначених в табл. 1, серологічна діагностика проводилася, головним чином, на віруси коротковузля і скручування листя (без визначення серотипу останнього) та обмежено – на вірус мозаїки резухи. Застосування індексації щепленням дозволило певною мірою скорегувати недостатній перелік вірусів у серологічній діагностиці, а також виявити хвороби, які навіть тепер серологічно не виявляються (наприклад, некроз жилок). Неспецифічне виявлення вірусної інфекції за допомогою аналізу длРНК та молекулярної гібридизації з длРНК-зондами також зробило свій внесок у вірогідність результатів оцінки санітарного стану клонів.

З третього етапу перелік вірусів, на які проводиться тестування, розширюється за рахунок використання імпортованих діагностиків. На цьому

етапі визначали вірус коротковузля винограду, перший та третій серотипи вірусу скручування листя, а також вірус мармуровості, віруси А і В винограду.

На четвертому етапі визначали сім вірусів винограду (коротковузля, мозаїки резухи, перший, другий та третій серотипи вірусу скручування листя, вірус мармуровості, вірус А винограду).

Отже, кожний етап тестування з технологічної та методичної точки зору характеризується певним комплексом методів, доцільність використання яких визначалася їх чутливістю та специфічністю. При аналізі співвідношення методів, що використовувалися для тестування на віруси протягом 1985–2006 рр., визначено, що найбільший відсоток припадає на імуноферментний аналіз (близько 85 %), значно менший – молекулярно-біологічні методи та біологічна індексація (відповідно 9 і 6 %). Співвідношення між використанням ІФА та молекулярно-біологічних методів загалом відповідає цьому показнику робіт європейських лабораторій, що контролюють санітарний стан садивного матеріалу винограду (згідно даних Міжнародної Ради з вивчення вірусів та вірусних хвороб винограду (ICVG)). Цей факт пояснюється високим рівнем стандартизованості параметрів ІФА та простотою і швидкістю його виконання. Стандартизувати молекулярно-біологічні методи, які відрізняються великою кількістю модифікацій, наразі ще важко.

Фрагмент аналізу результатів тестування клонів за допомогою різних методів, наданий в таблиці 2, демонструє доповнення результатів індексації щепленням і ІФА пізнішими даними аналізу дЛРНК і молекулярної гібридизації.

З табл. 2 видно, що тільки у випадку тестування кущів клону 1632 сорта Сухолиманський білий отримані результати, які підтверджують ураження його вірусом мармуровості за допомогою усіх використаних методів. Проте санітарний статус цього клону визначається як задовільний, оскільки присутність напівлатентних хвороб на клоновому матеріалі згідно з чинним законодавством Європейської Співдружини не перешкоджає його промислового розмноження та використанню.

Тестування кущів клону 1441 сорту Каберне Совіньйон та клону 1835 сорту Мускат таїровський показало наявність мозаїки жилок за результатами індексації щепленням. Певною мірою наявність такого ураження підтверджується результатом аналізу електрофоретичних профілів дЛРНК та позитивним результатом гібридизації з універсальним дЛРНК зондом.

Є випадки, коли один з методів тестування дає результат, який свідчить про ураження тим чи іншим вірусним чи вірусоподібним захворюванням, через отримання помилковопозитивного результату в ІФА або правильної інтерпретації візуальних симптомів під час індексації щепленням. При цьому проведення подальших тестів дає можливість підтвердити добрий санітарний стан клону.

Так, кущі клону 441 сорту Каберне Совіньйон при тестуванні методом ІФА дали позитивний результат на ураження першим та третім серотипами вірусу скручування листя. Проте результати індексації щеплення на ураження скручуванням листя та молекулярно-біологічні тести були негативними. Індексація щепленням кущів клону 1791 сорту Берландієрі x Ріпарія СО4 показала наявність ураження мармуровістю, в той час як імуноферментний аналіз і молекулярно-біологічні методи цього не підтвердили. Кущі клону 2034 сорту Мускат гамбурзький були позитивно тестовані індексацією на коротковузля, проте іншими методами тестування вірус коротковузля не було виявлено.

Отже, аналіз із застосуванням різних груп методів, від біологічної індексації до молекулярно-біологічних, дозволяє отримати високий ступінь точності оцінки санітарного стану клонового садивного матеріалу винограду.

Результати візуальної санітарної селекції та тестування клонів винограду на приховане ураження вірусною інфекцією з 1995 до 2006 рр. показані в табл. 3. Візуально на клонах не було виявлено найбільш шкідливих вірусних хвороб – коротковузля, скручування листя та борознистості деревини винограду.

При візуальній санітарній селекції клонів підщепних сортів не спостерігали проявів найбільш шкідливої хвороби - коротковузля та його штамів. Симптоми напівлатентної хвороби, мозаїки жилок, були виявлені на двох кущах клону 3093 сорту Ріпарія Глуар.

2. Порівняльний аналіз результатів тестування кущів клонів винограду за допомогою біологічної індексації, імуноферментного аналізу і молекулярно-біологічних методів.

Сорт, клон, кількість тестованих кущів	Індексація щепленням, 1980-1985 рр.	Імуноферментний аналіз, 1990 -2000 рр.	Аналіз длРНК, 2001-2005 гг	Молекулярн. гібридизація, 1995-1997
Сухолиманський білий, 1632, три кущі	Позитивна на мармуровість і некроз жилок	Позитивна на мармуровість	Позитивний, один високомолекулярний фрагмент	+
Каберне Совіньйон, 1441, два кущі	Позитивна на мозаїку жилок	Негативна на п'ять вірусів	Позитивний, три високомолекулярні фрагменти	+
Каберне Совіньйон, 441, три кущі	Позитивна на некроз жилок	Підозра на ураження скручуванням листя (1-й і 3-й серотипи)	Негативний	-
Мускат гамбурзький, 2034, два кущі	Позитивна на коротковузля і некроз жилок	Негативна на п'ять вірусів, в тому числі коротковузля	Негативний	Не проводилась
Мускат таїровський, 1835, два кущі	Позитивна на мармуровість і мозаїку жилок	Негативна на п'ять вірусів	Позитивний, три високомолекулярні фрагменти	Не проводилась
Берландієрі x Ріпарія СО4, 1791, три кущі	Позитивна на мармуровість і некроз жилок	Негативна на п'ять вірусів	Негативний	-

Примітка. Позначка «+», або позитивний результат тестування, означає наявність ураження вірусами, позначка «-», або негативний результат тестування, означає відсутність ураження вірусами.

Тестування на відсутність прихованого ураження вірусними хворобами показало присутність вірусу коротковузля на окремих кущах клонів Ріпарія x Рупестріс 101-14 (832, 672). Виходячи з того, що в період 1985–1995 рр. на цих клонах коротковузля лабораторною діагностикою не виявлялося, а зараження щепленням унеможлиблювалося, можна припустити ймовірність зараження через ґрунт. Доказом на користь цього припущення є також відсутність ураження

коротковузлям на базовому маточнику цих клонів, закладених матеріалом з клонодослідної ділянки в 1988–1989 рр. у дослідному господарстві “Таїровський”.

Візуальною санітарною селекцією не виявлено симптомів коротковузля та скручування листя на клонах технічних сортів винограду.

### 3. Візуальна санітарна селекція і лабораторне тестування клонів сортів винограду на клонодослідних ділянках (1995–2006 рр.)

Група за сортом	Кількість		Візуальна санітарна селекція (кількість обстежених клонів/ кількість клонів, на яких виявлено симптоми вірусних хвороб)	Лабораторне тестування на приховане ураження вірусною інфекцією (кількість обстежених клонів/ кількість клонів, на яких виявлено вірусну інфекцію)
	Сортів	Клонів		
Клони підщепних сортів	9	40	40/1	40/3
Клони технічних сортів	18	47	47/1	47/2
Клони столових сортів	15	24	24/3	24/0

При тестуванні клонів технічних сортів у 1995–1997 рр. та повторному тестуванні 2005–2006 рр. виявлено наявність скручування листя на одному кущі клону 14174 сорту Ріслінг рейнський (перший серотип) та одному кущі клону 425 сорту Фетяска (третій серотип). Проте факт виявлення вірусу на окремих кущах клону, який має бути ідентичним за санітарним станом, дозволяє припустити зараження або внаслідок щеплення, або за допомогою переносників. Отже, необхідно підтримувати банк клонів у тепличних умовах, що допоможе контролювати переносників та виключити можливість ураження

Візуальна санітарна селекція клонів столових сортів винограду показала відсутність симптомів коротковузля та скручування листя винограду. Симптоми мозаїки жилок на пасинках було відмічено на одному кущі клону 7251 сорту

Мускат жемчужний та одному кущі клону 635 сорту Мускат янтарний.

Аналізуючи санітарний стан клонів, слід зазначити, що латентне ураження вірусною інфекцією не було виявлено на жодному з клонів столових сортів, в той час, як воно траплялося на окремих кущах клонів підщепних і технічних сортів винограду. Це пов'язано, ймовірно, з відносно недавнім походженням більшості столових сортів через генеративну селекцію, яка практично усуває вірусну інфекцію [4].

Санітарна селекція підпорядкована технологічній етапності клонової селекції. Очевидно, вивчення кількох вегетативних поколінь створює сприятливі умови для етапності санітарної роботи і створення бар'єрів на шляху ураження кінцевої продукції – сертифікованих саджанців винограду. При проведенні досліджень можливими причинами появи ураження вірусною інфекцією на клонах вітчизняної селекції, на наш погляд, були:

технологічні похибки розмноження (наприклад, щеплення на неперевірений підщепний матеріал);

зараження шляхом природного переносу.

Доказом цих шляхів ураження є те, що хворими виявлялися лише окремі кущі одного й того ж самого клону, санітарний стан якого мав би бути ідентичним.

Можливим є також ураження, як наслідок несвоєчасно виявленої хвороби через недостатню чутливість методу або недосконалість методики відбору проб, тестування за допомогою кількох методів запобігало цьому.

В будь-якому разі кожний випадок виявлення ураження прихованою вірусною інфекцією на етапах розмноження потрібно аналізувати для встановлення причини зараження та його запобігання.

Контроль за ураженням вірусною інфекцією досягався не тільки використанням різних методів тестування, але й певною періодичністю тестування (табл. 4). Вірогідність даних, що отримували, збільшувалась за рахунок використання різних типів тканин (листя, жилки, зскрібки кортикального

4. Періодичність тестування перспективних клонів другого вегетативного покоління (1995 – 2006 рр.)

Сорт	Клон	ІФА на GFLV, GLRaVI, III, GFkV, GVA, 1995 – 2000 рр.	Молекулярна гібридизація з біотинілірованим дл РНК зондом та аналіз длРНК, 1996-1998, 2001-2004 рр.	ІФА на GFLV, ArMV, GLRaV I, II, III, GFkV, GVA, 2005-2006 рр.
Каберне Совіньон	441	1995 - лоза 1996 – листя 1997 - лоза 1998 - листя	1997 - листя 2001, 2002 – лоза, листя	2005 – лоза 2006 - листя , лоза
Каберне Совіньон	1473	1995 – листя 1996 - лоза 1997 - листя 1998 - лоза 1999 - листя	1997 - листя 2002 - лоза	2005 - листя 2006 - лоза
Сухолиманський білий	5110	1996 - лоза, 1997 - листя	1996 - листя 2002 - лоза	2005 - листя
Сухолиманський білий	1632	1995 - лоза 1997 - листя 1999 - листя	1996 - листя 2002, 2004 – лоза, листя	2005 - листя 2006 - лоза
Марсельський чорний ранній	1294	1995 - листя 1997 - листя	1997 - листя 2002, 2004 – лоза, листя	2005 - листя 2006 - лоза
Мускат гамбурзький	2034	1995-1996 – не проводилось, 1997 - листя	1996 – листя 2002 - лоза	2005 – лоза 2006 - лоза

шару лози у стані спокою та ін.) та методичної обґрунтованості відбору проб для тестування (період відбору, використання проб, відібраних з різних точок куща).

Найчастіше при цьому застосовували імуноферментний аналіз. Молекулярну гібридизацію та метод аналізу електрофоретичних профілів длРНК

використовували одноразово, для попередньої оцінки санітарного стану садивного матеріалу або для підтвердження його санітарного статусу при розмноженні та закладанні в банку клонів. Перспективні клони другого вегетативного покоління в 1995–2006 рр. проходили тестування в середньому 1 - 2 рази на три роки, що є достатнім для контролю їх санітарного стану.

Подальшу роботу буде спрямовано на санітарний контроль кущів банку клонів у тепличних умовах. Зважаючи на те, що клонова селекція є перманентним процесом, дослідження будуть продовжені також у напрямі санітарної селекції клонів, добір яких наразі триває

### ВИСНОВКИ

1. Ефективність санітарних заходів на етапах вивчення першого та другого вегетативних поколінь клонів винограду визначається, головним чином, комплексом методів, які використовуються, періодичністю їх застосування та методичною обґрунтованістю відбору проб для тестування.
2. Санітарний стан перспективних клонів другого вегетативного покоління характеризується практичною відсутністю на них найбільш шкідливих вірусних хвороб – коротковузля, скручування листя та борознистості деревини винограду.
3. Для підтримки відповідного санітарного стану клонів на етапах вивчення двох вегетативних поколінь достатнім є проведення тестування 1 – 2 рази на три роки.
4. Ймовірність ураження вірусними хворобами збільшується, головним чином, на технологічних етапах розмноження шляхом щеплення та через тривале (понад 20 років) використання ділянок клонодослідження. Контроль цих етапів і використання банку клонів в теплиці спроможні зробити більш дієвим санітарний контроль та обмежити ураження.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Технология производства безвирусного посадочного материала плодовых, ягодных культур и винограда. Союзплодопитомник . – 1989. – 168 с.

2. Власов В.В., Тулаева М.И., Мулюкина Н.А. Система производства сертифицированного посадочного материала винограда в Украине // Питомниководство винограда в Украине. Тем. сборник материалов секции виноградарства Отделения растениеводства Росс. Акад. с.-х. наук. – Краснодар, 2004. – С. 34 – 43
3. EPPO Standards. Certification schemes. Pathogen-tested material of grapevine varieties and rootstocks // European and Mediterranean Plant Protection Organization, Paris, France. – 2003. – PM 4/1-26 English. – p. 1 – 13.
4. Walter B. (Ed.). Sanitary selection of the grapevine. Protocols for detection of viruses and virus-like diseases // INRA Editions, Paris. – 1997. – 227 p.
5. Милкус Б.Н., Каргузова В.И., Мулюкина Н.А., Гайдай А.Е., Конуп Л.А. Биотехнологические методы диагностики вирусных болезней и бактериального рака винограда // Виноградарство и виноделие: Сб. науч. работ. – 1997. – С. 32 – 37.
6. Милкус Б., Мулюкина Н., Бабенко А. Применение иммуноферментного анализа для выявления вирусов винограда // Труды научного центра виноградарства и виноделия. – Ялта, 1999. – Т. 1. – С. 27 – 28.
7. Сиволап Ю.М., Петрашевич В.П., Милкус Б.Н., Мулюкина Н.А., Русин А.А. Применение меченой двуспиральной РНК для выявления вирусных заболеваний винограда // Биотехнология. – 1992. – № 6. – С. 55 – 58.
8. Feld B.S., Mulyukina N.A. and B.N. Milkus. Ds-RNA investigation from grapevine affected by different viruses // Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica. – 1995. – 30 (3-4). – pp. 157-160.

#### Результаты санитарной селекции клонов сортов винограда

**Н.А. Мулюкина, М.И. Тулаева, В.Ф. Хилько,  
В.С. Чисников, В.Л. Чистякова, Л.С. Мазуренко, I.A. Ковалева**

*Приведены результаты санитарной селекции клонов винограда, отобранных в 1981 – 1990 гг. в Центре клоновой селекции ННЦ «ИВиВ им. В.Е. Таирова». Показано, что эффективность санитарного контроля на этапах изучения двух вегетативных поколений зависит от комплексного использования методов тестирования и периодичности их использования. Определено, что санитарное состояние около 50 перспективных клонов,*

*рекомендованных для промышленного размножения, характеризуются отсутствием наиболее вредных вирусных болезней винограда – короткоузлия, скручивания листьев, борозчатости древесины.*

***Санитарная селекция, клоновая селекция, вегетативное поколение, вирусные болезни винограда, индексация прививкой, иммуноферментный анализ, двуспиральная РНК, молекулярная гибридизация***

#### **The results of sanitary selection of grapevine clones**

**N.A. Muljukina, M.I. Tulaeva, V.F. Hilko, V.S. Chisnikov, V.L. Chistjakova,**

**L.S. Mazurenko, I.A. Kovaljova**

*The results of the sanitary selection of grapevine clones selected in 1981–1990 at NSC “Tairov Research Institute of Viticulture and wine-making” is presented. The effectiveness of sanitary control depends upon the complexity of the methods and the periodicity of testing. The sanitary state of nearly 50 clones is characterized by the absence of grapevine fanleaf, leafroll and rugose wood complex.*

***Sanitary selection, clonal selection, vegetative progeny, grapevine virus diseases, indexation by grafting, enzyme-linked immunosorbent assay, double-stranded RNA, molecular hybridization***