

УДК 634.836

UDC 634.836

DOI 10.30679/2219-5335-2023-6-84-62-77

DOI 10.30679/2219-5335-2023-6-84-62-77

**ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА
МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ
ОБРАЗЦОВ ВИНОГРАДА
С НЕИДЕНТИФИЦИРОВАННОЙ
СОРТОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТЬЮ
АМПЕЛОГРАФИЧЕСКОЙ
КОЛЛЕКЦИИ «МАГАРАЧ»
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ***

**STUDY OF MICROSATELLITE LOCI
POLYMORPHISM
OF GRAPE SAMPLES
WITH UNIDENTIFIED
VARIETAL AFFILIATION
OF MAGARACH AMPELOGRAPHIC
COLLECTION USING
THE MOLECULAR
MARKERS ***

Корнильев Гурий Викторович
канд. биол. наук
ведущий инженер
лаборатории молекулярно-генетических
исследований
e-mail: guriy-kornilev@yandex.com
<https://orcid.org/0000-0001-6876-3424>

Korniliev Hurii Viktorovich
Cand. Biol. Sci.
Leading Engineer
of Molecular Genetic Studies
Laboratory
e-mail: guriy-kornilev@yandex.com
<https://orcid.org/0000-0001-6876-3424>

*Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
«Всероссийский национальный
научно-исследовательский институт
виноградарства и виноделия
«Магарач» РАН»,
Ялта, Республика Крым, Россия*

*Federal State Budgetary
Institution of Science
«All-Russian National
Research Institute
of Viticulture and Winemaking
«Magarach» RAS»,
Yalta, Republic of Crimea, Russia*

В работе представлены результаты ДНК-профилирования 28 образцов винограда с неидентифицированной сортовой принадлежностью, собранные на ампелографической коллекции «Магарач» и приведена оценка полиморфизма их микросателлитных локусов. Генотипирование проводили по 9 ядерным (VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62, VrZAG79, VVS2) и 3 хлоропластным (ccmp3, ccmp5, ccmp10) SSR-маркерам. По ядерным локусам выявлено 105 аллелей, среднее число аллелей на локус (na) составило 11,7; среднее значение эффективного числа аллелей (ne) – 7,23; информационный индекс Шеннона (I)

The paper presents the results of DNA profiling of 28 grape samples with unidentified varietal affiliation, selected from the Magarach Ampelographic Collection, and provides polymorphism assessment of their microsatellite loci. Genotyping was performed using 9 nuclear (VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62, VrZAG79, VVS2) and 3 chloroplast (ccmp3, ccmp5, ccmp10) SSR markers. For nuclear loci, 105 alleles were identified, the average number of alleles per locus (na) was 11.7; the average effective number of alleles (ne) is 7.23; Shannon information index (I)

* Работа выполнена в рамках темы государственного задания № FNZM-2022-0008.

* The work was carried out within the framework of the topic of the state task No. FNZM-2022-0008.

для исследуемой выборки образцов – 2.13. Отмечена наибольшая частота встречаемости у образцов с аллелями VVS2₁₃₃ и VVS2₁₃₅ ($p = 0.250$), VVMD5₂₃₈ ($p = 0.232$), VVMD7₂₄₇ ($p = 0.232$), VVMD25₂₃₉ ($p = 0.250$), VVMD27₁₈₀ ($p = 0.232$), VVMD28₂₃₆ ($p = 0.143$), VVMD32₂₇₂ ($p = 0.304$), VrZAG62₁₈₈ ($p = 0.179$), VrZAG79₂₅₁ ($p = 0.232$). Среднее значение фактической гетерозиготности Het_o составило 0.8333, ожидаемой гетерозиготности Het_e – 0.8712. По хлоропластным локусам выявлено 7 аллелей: ccmp3₁₀₆, ccmp3₁₀₇, ccmp5₁₀₄, ccmp5₁₀₅, ccmp10₁₁₄, ccmp10₁₁₅, ccmp10₁₁₆. Идентифицированы 4 хлоротипа: А (1 образец), В (9), С (13), D (5). По методу UPGMA построена дендрограмма генетического сходства, которая показала наличие трёх кластеров, содержащих, соответственно, 11, 11 и 6 образцов. Отмечено равномерное распределение хлоротипов В и D по трём кластерам, хлоротипа С – по двум кластерам. Сделан вывод о возможности использования полученных для оценки генетического разнообразия ампелографической коллекции «Магарач».

Ключевые слова: АМПЕЛОГРАФИЧЕСКАЯ КОЛЛЕКЦИЯ «МАГАРАЧ», МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЕ ЛОКУСЫ, nSSR-МАРКЕРЫ, cpSSR-МАРКЕРЫ, ГЕНОТИПИРОВАНИЕ, ДНК-ПРОФИЛЬ, ПОЛИМОРФИЗМ АЛЛЕЛЕЙ, ХЛОРОТИПЫ.

for the studied batch of samples was 2.13. The highest allele frequency was observed in samples with VVS2₁₃₃ and VVS2₁₃₅ ($p = 0.250$), VVMD5₂₃₈ ($p = 0.232$), VVMD7₂₄₇ ($p = 0.232$), VVMD25₂₃₉ ($p = 0.250$), VVMD27₁₈₀ ($p = 0.232$), VVMD28₂₃₆ ($p = 0.143$), VVMD32₂₇₂ ($p = 0.304$), VrZAG62₁₈₈ ($p = 0.179$), VrZAG79₂₅₁ ($p = 0.232$) alleles. The average value of actual heterozygosity Het_o was 0.8333, expected heterozygosity Het_e was 0.8712. For chloroplast loci, 7 alleles were identified: ccmp3₁₀₆, ccmp3₁₀₇, ccmp5₁₀₄, ccmp5₁₀₅, ccmp10₁₁₄, ccmp10₁₁₅, ccmp10₁₁₆. Also 4 chlorotypes were identified: A (1 sample), B (9), C (13), D (5). A dendrogram of genetic similarity was constructed using the UPGMA method, which showed the presence of three clusters containing, respectively, 11, 11 and 6 samples. There was a uniform distribution of chlorotypes B and D over three clusters, and chlorotype C – over two clusters. It is concluded that the results can be used to assess the genetic diversity of Magarach Ampelographic Collection.

Key words: MAGARACH AMPELOGRAPHIC COLLECTION, MICROSATELLITE LOCI, nSSR-MARKERS, cpSSR-MARKERS, GENOTYPING, DNA PROFILE, ALLELE POLYMORPHISM, CHLOROTYPES.

Введение. Виноград – одна из наиболее значимых сельскохозяйственных культур, насчитывающая более 20 тысяч сортов [1]. Несмотря на постоянное появление новых сортов с хозяйственно ценными признаками, актуальной остаётся проблема утраты некоторых малораспространённых и аборигенных сортов, происходящая на фоне реконструкции старых насаждений и внедрения интенсивных сортов и приводящая к снижению генетического разнообразия и так называемой «генетической эрозии». При этом могут быть утрачены редкие аллели, ответственные за высокие адаптивные свойства к

конкретным регионам виноградарства [2]. Важную роль банка генетических ресурсов винограда играют ампелографические коллекции, выполняющие задачи по сбору и сохранению генофонда винограда различного эколого-географического происхождения. Ампелографическая коллекция «Магарач» (АК «Магарач») ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН» является одной из старейших (основана в 1814 году) в мире и зарегистрирована в ФАО (Food and Agriculture Organization of the United Nations). АК «Магарач» расположена в Западном предгорно-приморском районе Крыма (с. Вилино, Бахчисарайский р-н, Республика Крым) и включает свыше 4000 местных и селекционных сортов и форм винограда из более чем 40 стран, относящихся к различным мировым регионам виноградарства (Европы, Азии, Северной Америки) [3-4]. Важной задачей АК «Магарач» является оценка её генетических ресурсов, в частности, идентификация и паспортизация сортов и форм.

Классическим подходом к идентификации сортов и форм винограда является ампелографическое описание, основанное на комплексе морфо-биологических характеристик, таких как признаки верхушки молодого побега, молодого и взрослого листа, грозди, ягоды, молодого и вызревшего побегов и др. Оценка признаков грозди и ягоды проводится при вступлении растения в период плодоношения и, поскольку виноград имеет продолжительный ювенильный период, для описания всего комплекса морфо-биологических характеристик требуется некоторое время. На погрешность оценки может влиять фенотипическая изменчивость признаков и физиологическое состояние растения, в связи с чем необходимо, чтобы сравнение со стандартным сортом проводилось в одинаковых условиях произрастания. Дополнительную сложность представляет идентификация близкородственных сортов, а также наличие сортов-синонимов и омонимов, имеющих местные названия.

В дополнение к ампелографической оценке для идентификации сортов и форм, оценки чистосортности маточных насаждений и посадочного мате-

риала широко используется ядерные (nSSR) и хлоропластные (cpSSR) микросателлитные локусы (маркеры), которые представляют собой tandemные повторы простых сайт-специфических последовательностей из 2-6 нуклеотидов в некодирующей области ДНК [5-7]. Данные локусы характеризуются полиморфизмом и мультиаллельностью за счёт сайт-специфичного варьирования длины повтора, кодоминантным типом наследования (ядерный геном) или наследованием по материнской линии (хлоропластный геном), а также высокой точностью, стабильностью и воспроизводимостью результатов. За счёт более высокого полиморфизма nSSR-маркеры позволяют идентифицировать исследуемые образцы по ДНК-профилям на любой стадии развития растения, исключая сорта-синонимы и омонимы; cpSSR-маркеры, характеризующиеся меньшей вариабельностью и отсутствием рекомбинации, применяются для оценки возможного происхождения образца. Наиболее широкой базой данных по микросателлитным профилям nSSR- и cpSSR-локусов сортов винограда является Vitis International Variety Catalogue (VIVC) [8]. Следует отметить, что в данной информационной базе достаточно широко представлены ДНК-профили сортов европейского происхождения, в то же время многие отечественные и аборигенные сорта, сорта восточного происхождения, а также малораспространённые сорта в VIVC не упоминаются. Кроме того, дополнительную сложность могут представлять мутации, выражающиеся в отличии размеров аллелей в маркерных локусах от стандартного ДНК-профиля сорта, что имеет место у длительно культивируемых сортов и, в частности, описано в наших предыдущих исследованиях [9].

В связи с этим целью нашего исследования является ДНК-профилевание образцов винограда с неидентифицированной сортовой принадлежностью ампелографической коллекции «Магарач» для определения полиморфизма их микросателлитных локусов и оценки генетических взаимоотношений.

Объекты и методы исследования. В исследование включены 28 образцов винограда с неидентифицированной сортовой принадлежностью, которые собраны на ампелографической коллекции «Магарач» и значатся в каталоге коллекции под условными номерами: 1/114, 2/91, 3/8, 4/108, 6/65, 6/80, 9/59, 11/66, 12/42, 12/43, 12/69, 12/112, 13/63, 14/105, 15/98, 17/96, 17/121, 18/43, 18/52, 18/88, 18/95, 19/75, 19/125, 20/56, 21/48, 21/84, 22/57, 24/4.

Экстрагирование геномной ДНК с помощью ЦТАБ-буфера проводили из усреднённой пробы молодых листьев или зелёной камбиальной ткани побегов, отобранной с 3-5 черенков [10]. Чистоту и количество ДНК оценивали методом спектрофотометрирования на приборе «Biophotometer plus». Генотипирование проводили по рекомендованным 9 ядерным (VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62, VrZAG79, VVS2) и 3 хлоропластным (ssmp3, ssmp5, ssmp10) SSR-маркерам [5, 7]. В исследовании использованы праймеры с флуоресцентными метками FAM, TAMRA, R6G производства компании «Синтол». Праймеры с различающимися флуоресцентными метками были объединены в мультиплексы в соответствии с размерами получаемых ампликонов.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) выполнена на амплификаторе «T100 Thermal Cycler» (BioRad) по ранее отработанному протоколу [11]. В составе ПЦР-смеси использовали реакционную смесь 2.5x (содержит dNTP, SynTaq ДНК-полимеразу, 6.25mM MgCl₂, трис-HCl (pH 8.8), KCl, глицерол, Tween 20) и деионизированную воду производства ООО «Синтол».

Фрагментный анализ ПЦР-продуктов выполнен на генетическом анализаторе «ABI Prism 3130» с использованием программного обеспечения «GeneMapper 4.0» Идентификацию образцов проводили путём сравнения полученных микросателлитных профилей с результатами, приведёнными в базе данных Vitis International Variety Catalogue (VIVC). В качестве референсных сортов для соотнесения полученных размеров аллелей использовались сорта с известным аллельным составом – Каберне Совиньон и Пино

Нуар. Статистическую оценку генетического разнообразия и аллельной вариабельности pSSR-локусов проводили с использованием программы «PopGen 32», расчёт матрицы генетических дистанций и построение дендрограммы генетического сходства образцов на основе метода попарного внутригруппового невзвешенного среднего (UPGMA) – с применением программы «DARwin 6.0».

Обсуждение результатов. В процессе исследования проведено ДНК-профилирование 28 образцов винограда, собранных в АК «Магарач», по 9 ядерным (VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62, VrZAG79, VVS2) и 3 хлоропластным (ccmp3, ccmp5, ccmp10) SSR-маркерам. Пример полученного микросателлитного профиля образца под условным номером 12/69 представлен на рисунке 1.

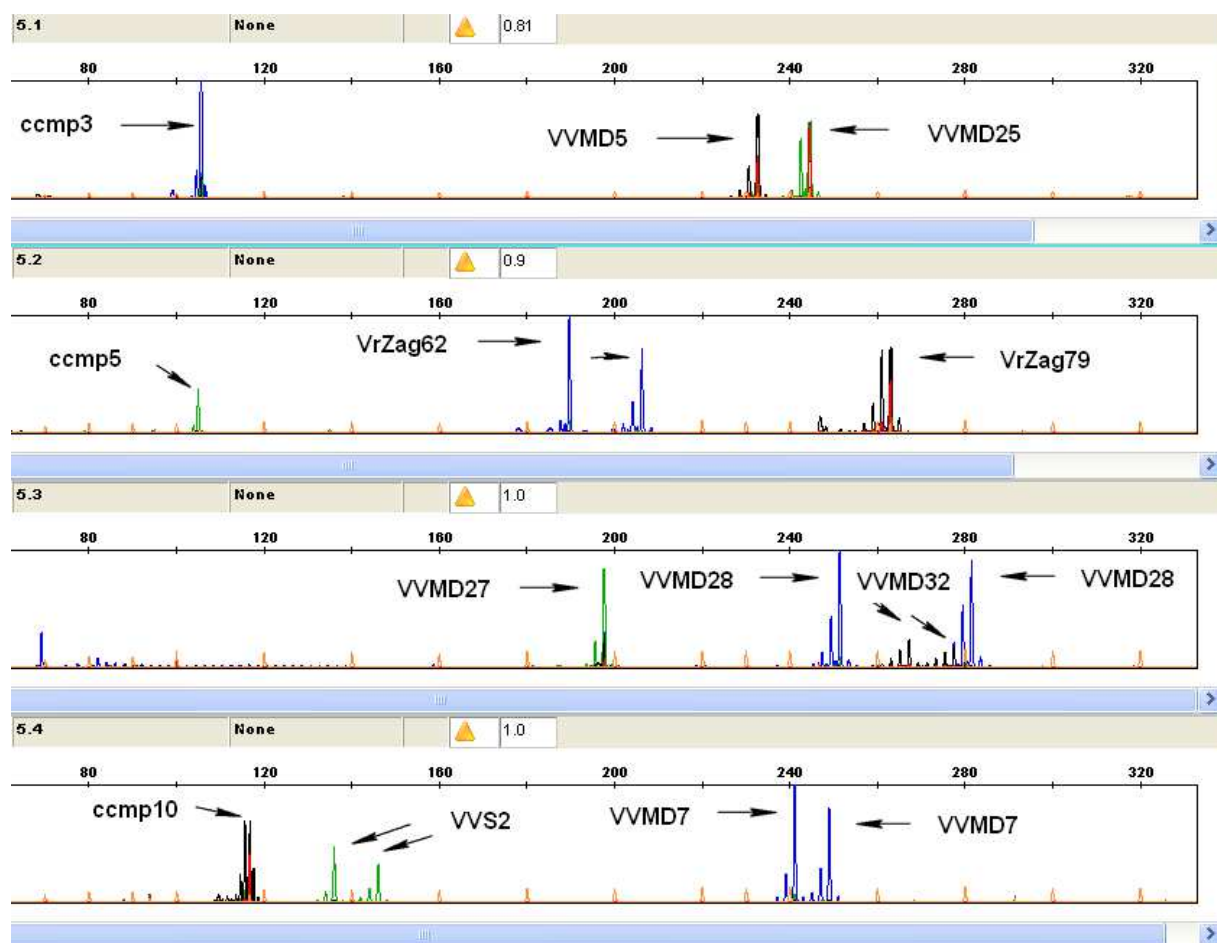


Рис. 1. Пример микросателлитного профиля образца 12/69

Пики соответствующих nSSR-и cpSSR-маркеров отмечены стрелками. Рисунок демонстрирует состав 4 мультиплексов, в которые были объединены праймеры в соответствии с их флуоресцентными метками и размерами аллелей маркерных локусов.

Полученные результаты показали, что каждый исследуемый образец имел уникальный генетический профиль, совпадений между профилями образцов не выявлено (табл. 1). При сравнении полученных генетических профилей исследованных образцов с профилями, представленными в информационной базе VIVC, совпадений не выявлено, что не позволяет установить сортовую принадлежность исследуемых образцов. Отсутствие генетических профилей исследуемых образцов в VIVC даёт основание предположить, что данные образцы могут относиться к аборигенным либо малораспространённым отечественным сортам, или же представлять собой соматические мутации длительно культивируемых сортов [12].

По результатам генотипирования исследуемых образцов по nSSR-локусам выявлено 105 аллелей. Диапазон числа аллелей на nSSR-локус (na), определенных в нашем исследовании, находился в пределах от 9 (локус VVMD5) до 19 (локус VVMD 28) (табл. 2); среднее число аллелей на локус составило (округлённо) 11,7. Это значение было сопоставимо с выявленным ранее для 76 аборигенных сортов АК «Магарач» (na 10.9) и превышало средние значения по 6 маркерным локусам для аборигенных донских (8), турецких (7.9) и по 14 маркерным локусам – для абхазских (5.9) сортов [13-16]. Факт того, что полученное нами среднее значение na превышает литературные данные для аборигенных сортов даёт основания предположить, что в исследованной выборке присутствуют сорта разных регионов происхождения.

Таблица 1 – Ядерные и хлоропластные микросателлитные профили исследуемых образцов АК «Магарач»

№ образца	Хлоропластные локусы, п.н.			Ядерные локусы, п.н.																			
	ссmp3	ссmp5	ссmp10	VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD25		VVMD27		VVMD28		VVMD32		VrZAG62		VrZAG79			
1/114	106	105	115	135	135	228	228	247	253	249	257	192	212	236	252	260	260	192	204	251	257		
2/91	106	105	116	133	135	238	238	231	245	249	255	180	182	218	268	264	272	194	196	255	259		
3/8	106	105	116	135	151	236	238	245	245	249	255	180	186	236	268	248	270	196	204	249	255		
4/108	107	104	115	133	135	238	238	231	237	239	255	186	194	240	244	256	270	196	204	249	251		
6/65	106	105	115	135	143	234	234	241	247	239	239	182	186	236	256	240	250	194	216	247	259		
6/80	106	105	114	131	139	238	242	237	239	261	265	182	190	236	250	258	260	186	194	247	259		
9/59	106	105	115	139	151	238	238	245	253	255	267	176	196	234	244	250	260	190	200	237	251		
11/66	106	105	116	135	139	234	238	239	247	239	255	196	196	258	276	250	270	188	200	249	257		
12/42	106	105	115	133	133	240	242	247	249	239	253	194	194	228	260	252	264	194	204	249	251		
12/43	106	105	116	135	143	234	234	239	239	239	255	180	194	246	248	256	264	188	194	239	249		
12/69	106	105	116	133	143	230	230	239	247	237	237	194	194	248	278	262	272	188	204	257	257		
12/112	106	105	115	143	145	240	242	247	247	255	267	180	180	236	244	250	272	190	204	249	251		
13/63	106	105	116	133	151	230	240	237	255	249	249	190	192	234	258	240	272	188	188	247	251		
14/105	107	104	115	133	133	230	238	239	249	239	249	180	182	248	268	256	272	186	196	255	259		
15/98	106	105	116	133	149	234	240	247	249	239	249	186	196	244	244	272	272	186	192	251	257		
17/96	106	105	115	135	137	240	242	239	253	239	241	176	190	248	258	250	272	196	200	237	237		
17/121	106	105	116	143	151	234	240	239	253	249	249	190	196	228	234	240	272	194	200	249	257		
18/43	107	104	115	135	143	230	238	239	247	239	255	180	194	234	252	254	260	188	196	249	259		
18/52	107	104	115	131	143	228	238	231	231	241	241	182	190	216	246	260	260	194	204	249	251		
18/88	106	105	115	145	145	234	240	239	253	239	239	192	192	216	236	240	260	188	202	245	257		
18/95	106	105	115	141	151	230	234	247	253	241	255	180	194	234	248	262	272	200	204	237	259		
19/75	106	105	116	147	151	226	236	233	243	249	255	196	196	248	258	256	272	188	204	247	251		
19/125	106	105	115	133	135	230	242	249	255	249	255	180	186	234	258	252	272	188	200	249	251		
20/56	106	105	116	133	139	236	248	249	261	249	253	180	180	220	276	272	272	186	200	247	251		
21/48	106	105	116	133	133	228	234	249	249	239	249	186	186	220	234	252	258	186	204	251	257		
21/84	106	105	116	133	135	236	240	239	247	237	237	180	190	248	268	250	272	188	202	249	255		
22/57	106	105	116	135	143	230	238	247	247	239	255	180	192	236	244	250	272	190	190	237	251		
24/4	107	104	115	135	143	228	236	237	249	241	253	188	210	236	238	256	272	180	202	249	261		

Примечание. **Жирным** шрифтом выделены редкие аллели. *Курсивом* отмечены гомозиготы

Таблица 2 – Характеристика полиморфизма микросателлитных локусов исследуемых образцов ампелографической коллекции «Магараж»*

Локус	na	ne	Het _o	Het _e	Ave Het	I
VVS2	11	5.7860	0.8214	0.8422	0.8272	1.9781
VVMD5	9	6.6160	0.7500	0.8643	0.8489	1.9935
VVMD7	12	7.0314	0.7857	0.8734	0.8578	2.1480
VVMD25	10	5.5406	0.7500	0.8344	0.8195	1.9113
VVMD27	11	7.3962	0.7143	0.8805	0.8648	2.1422
VVMD28	19	11.615	0.9643	0.9305	0.9139	2.6586
VVMD32	12	6.5333	0.8571	0.8623	0.8469	2.1562
VrZAG62	11	8.0410	0.9286	0.8916	0.8756	2.1982
VrZAG79	10	6.5062	0.9286	0.8617	0.8463	2.0220
Среднее	11.6667	7.2295	0.8333	0.8712	0.8557	2.1342
Стандартное отклонение	2.9155	1.8123	0.0911	0.0284	0.0279	0.2197

*Примечание. na – число вариантов аллелей; ne – эффективное число аллелей; Het_o – фактическая гетерозиготность; Het_e – ожидаемая гетерозиготность; Ave. Het. – средняя гетерозиготность; информационный индекс Шеннона.

Среднее значение эффективного числа аллелей (ne), учитывающего частоту их встречаемости, составило (округлённо) 7.23; среднее значение информационного индекса Шеннона (I), характеризующего разнообразие выборки, – 2.13.

Установлено, что среди исследованных наиболее часто встречаются образцы, в микросателлитных профилях которых выявлены следующие аллели: VVS2₁₃₃ и VVS2₁₃₅ (p = 0.250), VVMD5₂₃₈ (p = 0.232), VVMD7₂₄₇ (p = 0.232), VVMD25₂₃₉ (p = 0.250), VVMD27₁₈₀ (p = 0.232), VVMD28₂₃₆ (p = 0.143), VVMD32₂₇₂ (p = 0.304), VrZAG62₁₈₈ (p = 0.179), VrZAG79₂₅₁ (p = 0.232) (табл. 3).

Таблица 3 – Встречаемость аллелей различных размеров в исследуемых образцах АК «Магарац»*

Ядерные локусы, п.н./Nuclear loci, pn																	
VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD25		VVMD27		VVMD28		VVMD32		VrZAG62		VrZAG79	
п.н.	р	п.н.	р	п.н.	р	п.н.	р	п.н.	р	п.н.	р	п.н.	р	п.н.	р	п.н.	р
131	0.036	226	0.018	231	0.071	237	0.071	176	0.036	216	0.036	240	0.071	180	0.018	237	0.089
133	0.250	228	0.089	233	0.018	239	0.250	180	0.232	218	0.018	248	0.018	186	0.089	239	0.018
135	0.250	230	0.143	237	0.071	241	0.089	182	0.089	220	0.036	250	0.125	188	0.179	245	0.018
137	0.018	234	0.179	239	0.196	249	0.232	186	0.125	228	0.036	252	0.054	190	0.071	247	0.089
139	0.071	236	0.089	241	0.018	253	0.054	188	0.018	234	0.125	254	0.018	192	0.036	249	0.214
141	0.018	238	0.232	243	0.018	255	0.214	190	0.107	236	0.143	256	0.089	194	0.125	251	0.232
143	0.161	240	0.143	245	0.071	257	0.018	192	0.089	238	0.018	258	0.036	196	0.107	255	0.071
145	0.054	242	0.089	247	0.232	261	0.018	194	0.143	240	0.018	260	0.143	200	0.125	257	0.143
147	0.018	248	0.018	249	0.143	265	0.018	196	0.125	244	0.107	262	0.036	202	0.054	259	0.107
149	0.018			253	0.107	267	0.036	210	0.018	246	0.036	264	0.054	204	0.179	261	0.018
151	0.107			255	0.036			212	0.018	248	0.125	270	0.054	216	0.018		
				261	0.018					250	0.018	272	0.304				
										252	0.036						
										256	0.018						
										258	0.089						
										260	0.018						
										268	0.071						
										276	0.036						
										278	0.018						

*Примечание. п.н. – размер аллеля; р – частота встречаемости

При этом суммарная доля аллелей с частотой $p > 0.1$ по рассмотренным локусам составляла от 50.0 (VVS2) до 73.2 % (VVMD27), за исключением локуса VVMD28, в котором большинство аллелей имели $p < 0.1$ (их суммарная доля составила 60.7%).

Количество аллелей, встречающихся в локусах единожды ($p = 0.018$), находилось в пределах от 2 (VVMD5, VVMD32, VrZAG62) до 7 (VVMD28). При этом данные редкие аллели выявлены в 15 образцах, в которых их число составляло от 1 до 5. Наибольшее число редких аллелей (5) отмечено в образцах 19/75 (VVS2₁₄₇, VVMD5₂₂₆, VVMD7₂₃₃, VVMD7₂₄₃, VrZAG79₂₄₇) и 24/4 (VVMD27₁₈₈, VVMD27₂₁₀, VVMD28₂₃₈, VrZAG62₁₈₀, VrZAG79₂₆₁) (табл. 1). Фактическая гетерозиготность (Het_o) находилась в пределах от 0.7143 (VVMD27) до 0.9643 (VVMD28), ожидаемая гетерозиготность (Het_e) – от 0.8344 (VVMD25) до 0.9305 (VVMD28). Таким образом, локус VVMD28 показал наибольшую гетерозиготность по обоим показателям. Полученные нами средние показатели Het_o (0.8333) и Het_e (0.8712) имеют сравнимые значения с приведёнными в литературе для аборигенных сортов АК «Магарач» (соответственно, 0.807 и 0.781), аборигенных донских и дагестанских сортов (0.808 и 0.799), абхазских сортов (0.810 и 0.712) [13, 15, 17]. Гомозиготы выявлены в каждом nSSR-локусе, их количество в локусе составляло от 1 (VVMD28, VrZAG62, VrZAG79) до 6 (VVMD27) (табл. 1). Следует отметить, что гомозиготы VVS2_{133 133} и VVMD5_{238 238} встречались в локусе наибольшее число раз (3). В целом, гомозиготные локусы идентифицированы в 21 исследуемом образце; их количество составило от 1 до 3 гомозиготных локусов на образец. Наибольшее количество гомозиготных локусов (3) отмечено в образцах 12/69, 18/52, 21/48. Таким образом, все рассмотренные nSSR-локусы в исследованных образцах являются полиморфными.

В микросателлитных профилях срДНК исследованных образцов выявлены 7 аллелей: cсmp3₁₀₆, cсmp3₁₀₇, cсmp5₁₀₄, cсmp5₁₀₅, cсmp10₁₁₄,

ссmp10₁₁₅, ссmp10₁₁₆. На основании полученных размеров аллелей были идентифицированы 4 гаплотипа (хлоротипа): А, В, С, D [5], при этом 13 образцов имели хлоротип С (соответствует профилю ссmp3₁₀₆ ссmp5₁₀₅ ссmp10₁₁₆), 9 – В (ссmp3₁₀₆ ссmp5₁₀₅ ссmp10₁₁₅), 5 – D (ссmp3₁₀₇ ссmp5₁₀₄ ссmp10₁₁₅), 1 – А (ссmp3₁₀₆ ссmp5₁₀₅ ссmp10₁₁₄). При анализе хлоротипов образцов культурного (*Vitis vinifera* ssp. *sativa* (DC.) Hegi) и дикого (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* (Gmel.) Hegi) винограда различных регионов произрастания Арройо-Гарсиа установил, что хлоротип А встречался преимущественно в образцах, собранных в Центральной Европе и на Пиренейском полуострове, а также на Балканах и в Северной Африке; хлоротип В был распространён равномерно во всех рассмотренных регионах Евразии; хлоротип С – на Балканах, в Северной Африке и на Ближнем Востоке; хлоротип D – преимущественно в образцах, собранных на Ближнем Востоке, а также на Балканах, в Северной Африке и на Аппенинском полуострове [18]. Таким образом, исследованные нами образцы могут иметь различные регионы происхождения.

Для оценки генетического сходства изученных образцов на основе nSSR-профилей с использованием метода попарного невзвешенного кластирования с арифметическим усреднением (UPGMA) была рассчитана матрица генетических дистанций и построена дендрограмма (рис. 2). Как следует из приведённого рисунка, образцы объединились в 3 кластера, 2 из которых содержали по 11 образцов и 1 кластер – 6 образцов. При этом в первом кластере преобладали образцы с хлоротипом С и В, во втором – С, в третьем В и D. В целом, среди образцов с хлоротипами В, С и D (встречающихся в нашем исследовании более 3 раз) для хлоротипов В и D отмечается распределение по всем трём кластерам, для хлоротипа С – только по первому и второму.

Таким образом, полиморфность nSSR-профилей исследуемых образцов свидетельствует о том, что в одном кластере объединяются образцы с разными хлоротипами.

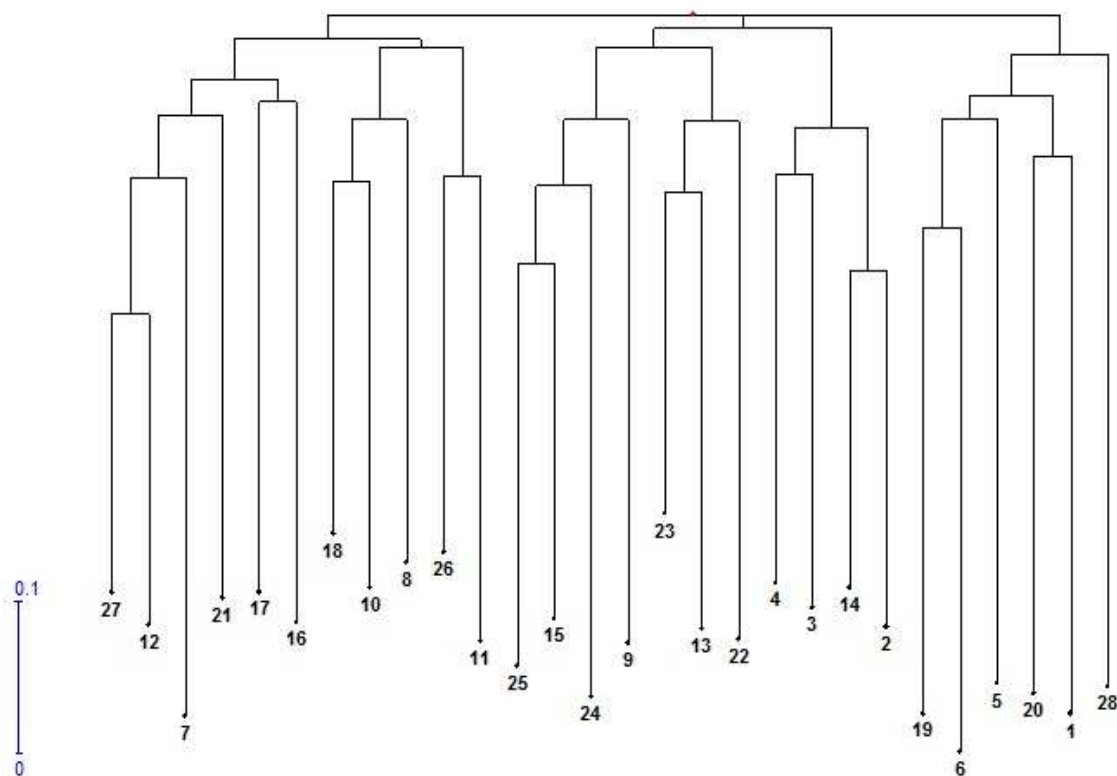


Рис. 2. Дендрограмма генетического сходства исследуемых образцов ампелографической коллекции «Магарач» по методу UPGMA

Заключение. Таким образом, для 28 исследованных образцов АК «Магарач» впервые получен микросателлитный профиль по 9 ядерным (VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62, VrZAG79, VVS2) и 3 хлоропластным (ccmp3, ccmp5, ccmp10) SSR-маркерам. По nSSR-локусам выявлено 105 аллелей, по cpSSR – 7 аллелей. Среднее число аллелей на nSSR-локус составило 11,7. Наибольшая частота встречаемости в nSSR-профилях отмечена для аллелей VVS2₁₃₃ и VVS2₁₃₅, VVMD5₂₃₈, VVMD7₂₄₇, VVMD25₂₃₉, VVMD27₁₈₀, VVMD28₂₃₆, VVMD32₂₇₂,

VrZAG62₁₈₈, VrZAG79₂₅₁. В cpSSR-профилях выявлены аллели csmr3₁₀₆, csmr3₁₀₇, csmr5₁₀₄, csmr5₁₀₅, csmr10₁₁₄, csmr10₁₁₅, csmr10₁₁₆. По nSSR-локусам среднее значение фактической гетерозиготности H_{et_c} составило 0.8333, ожидаемой гетерозиготности H_{et_e} – 0.8712. На основе генетического сходства по nSSR-профилям, исследуемые образцы объединились в 3 кластера. При этом связи между хлоротипами образцов и их генетическим сходством по nSSR-профилям не выявлено. Полученные данные являются основой для дальнейшей идентификации исследуемых образцов с привлечением ампелографических методов и оценки генофонда АК «Магарач».

Литература

1. Anderson K., Nelgen S. Which winegrape varieties are grown where? University of Adelaide, 2020. 800 p. Режим доступа: <https://www.adelaide.edu.au/press/titles/winegrapes> (дата обращения: 15.10.2023)
2. Alston J. M., Sambucci O. Grapes in the world economy // The grape genome. 2019. P. 1-24. DOI: 10.1007/978-3-030-18601-2_1
3. Ампелографическая коллекция «Магарач». Режим доступа: <http://magarach-institut.ru/ampelograficheskaja-kollekcija-magarach> (дата обращения: 15.10.2023)
4. Полулях А.А., Волынкин В.А. Генетические ресурсы винограда для интродукции и селекции // Виноградарство и виноделие. 2020. Т. 49. С. 83-86. DOI: 10.35547/1958.2020.39.79.001
5. Chloroplast microsatellite polymorphisms in *Vitis* species / R. Arroyo-Garcia, et al. // Genome. 2002. Vol. 45. P. 1142-1149. DOI: 10.1139/G02-087
6. Characterization of Simple Sequence Repeat (SSR) Markers Mined in Whole Grape Genomes / D. Pei, et al. // Genes. 2023. Vol. 14(3). 663. DOI: 10.3390/genes14030663
7. Development of standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars / P. This, et al. // Theor. Appl. Genet. 2004. Vol. 109. P. 1448-1458. DOI: 10.1007/s00122-004-1760-3
8. Vitis International Variety Catalogue. Режим доступа: <https://www.vivc.de/> (дата обращения: 15.10.2023)
9. Идентификация сортов винограда ампелографической коллекции «Магарач» с использованием микросателлитных маркеров [Электронный ресурс] / Г.В. Корнильев [и др.] // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2023. № 82(4). С. 57-68. Режим доступа: <http://journalkubansad.ru/pdf/23/04/06.pdf>. DOI: 10.30679/2219-5335-2023-4-82-57-68 (дата обращения: 23.10.2023).
10. Jabeen R., Habiba U., Khalid S., Shirazi J. H. Extraction and comparison of quality and purity of DNA of medicinal plants by CTAB and kit method. // Journal of Contemporary Pharmacy. 2022. Vol. 6(1). P. 19-22. DOI: 10.56770/jcp2022613
11. Генотипирование сортов винограда селекции Института «Магарач» на основе анализа аллельного полиморфизма SSR локусов / С.М. Гориславец [и др.] // «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2019. № 21(4). С. 289-293. DOI: 10.35547/IM.2019.21.4.002

12. Morphological and Genetic Clonal Diversity within the 'Greco Bianco' Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Variety / C. Villano, et al. // Plants. 2023. Vol. 12(3). 515. DOI: 10.3390/plants12030515

13. Характеристика биологического разнообразия аборигенных и диких форм *Vitaceae* Juss. как важнейшего ресурса зародышевой плазмы Крыма на основе анализа микросателлитных локусов / С.М. Гориславец [и др.] // Вестник РФФИ. 2020. №2(106). С. 25-37. DOI: 10.22204/2410-4639-2020-106-02-25-37

14. Ильницкая Е.Т., Токмаков С.В., Супрун И.И. Микросателлитное генотипирование донских аборигенных сортов винограда (*Vitis vinifera* L.). // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014. №18(3). С. 523-529. EDN: SXXZJL

15. Генетический полиморфизм аборигенных абхазских сортов винограда / Е.Т. Ильницкая [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021. №25(8). С. 797-804. DOI: 10.18699/VJ21.092

16. Karatas H., Karaagac E., Karatas D. Agaoglu S. Genetic characterization of grapevine germplasm (*Vitis vinifera* L.) by SSR (simple sequence repeats) in Sanliurfa province, South-East Turkey. // Fresenius Environmental Bulletin and Advances in Food Sciences. 2019. Vol. 28(5). P. 3835-3842. Режим доступа: https://www.prt-parlar.de/download_feb_2019/ (дата обращения: 15.10.2023)

17. Ильницкая Е.Т., Токмаков С.В. Полиморфизм микросателлитных локусов в генотипах аборигенных донских и дагестанских сортов винограда // Магарач. Виноградарство и виноделие. 2015. № 3. С. 3-24. EDN: UGXKHN

18. Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms / R. Arroyo-Garcia, et al. // Molecular Ecology. 2006. Vol. 15. P. 3707-3714. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2006.03049.x

References

1. Anderson K., Nelgen S. Which winegrape varieties are grown where? University of Adelaide, 2020. 800 p. Available at: <https://www.adelaide.edu.au/press/titles/winegrapes> (accessed date: 15.10.2023)

2. Alston J. M., Sambucci O. Grapes in the world economy // The grape genome. 2019. P. 1-24. DOI: 10.1007/978-3-030-18601-2_1

3. Ampelographic collection "Magarach". Available at: <http://magarach-institut.ru/ampelograficheskaja-kollekcija-magarach> (accessed date: 15.10.2023)

4. Polulyakh A.A., Volynkin V.A. Grapevine genetic resources for introduction and breeding // Viticulture and Winemaking. 2020. Vol. 49. P. 83-86. DOI: 10.35547/1958.2020.39.79.001 (in Russian)

5. Chloroplast microsatellite polymorphisms in *Vitis* species / R. Arroyo-Garcia, et al. // Genome. 2002. Vol. 45. P. 1142-1149. DOI: 10.1139/G02-087

6. Characterization of Simple Sequence Repeat (SSR) Markers Mined in Whole Grape Genomes / D. Pei, et al. // Genes. 2023. Vol. 14(3). 663. DOI: 10.3390/genes14030663

7. Development of standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars / P. This, et al. // Theor. Appl. Genet. 2004. Vol. 109. P. 1448-1458. DOI: 10.1007/s00122-004-1760-3

8. Vitis International Variety Catalogue. Available at: <https://www.vivc.de/> (accessed date: 15.10.2023)

9 Identification of grape varieties of the ampelographic collection “Magarach” using microsatellite markers [Electronic resource] / G.V. Korniliev, et al. // Fruit growing and viticulture of South Russia. 2023. № 82(4). P. 57-68. Available at: <http://journalkubansad.ru/pdf/23/04/06.pdf>. DOI: 10.30679/2219-5335-2023-4-82-57-68 (accessed date: 23.10.2023) (in Russian)

10. Jabeen R., Habiba U., Khalid S., Shirazi J. H. Extraction and comparison of quality and purity of DNA of medicinal plants by CTAB and kit method. // Journal of Contemporary Pharmacy. 2022. Vol. 6(1). P. 19-22. DOI: 10.56770/jcp2022613

11. Genotyping of grape varieties released by the Institute Magarach based on analysis of allelic polymorphism of SSR loci / S.M. Gorislavets, et al. // Magarach. Viticulture and Winemaking. 2019. Vol. 21(4). P. 289-293. DOI: 10.35547/IM.2019.21.4.002 (in Russian)

12. Morphological and Genetic Clonal Diversity within the ‘Greco Bianco’ Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Variety / C. Villano, et al. // Plants. 2023. Vol. 12(3). 515. DOI: 10.3390/plants12030515

13. Characteristics of the biological diversity of native and wild forms *Vitaceae* Juss. as the most important resource of Crimea vegetation germplasm (Gene Pool) based on analysis of microsatellite loci / S.M. Gorislavets, et al. // RFBR Journal. 2020. Vol. 2(106). P. 25-37. DOI: 10.22204/2410-4639-2020-106-02-25-37 (in Russian)

14. Ilnitskaya E.T., Tokmakov S.V., Suprun I.I. Microsatellite genotyping of Don local grape (*Vitis vinifera* L.) varieties. // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2014. Vol. 18(3). P. 523-529. EDN: SXXZJL (in Russian)

15. Genetic polymorphism of local Abkhazian grape cultivars / E.T. Ilnitskaya, et al. // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2021. Vol. 25(8). P. 797-804. DOI: 10.18699/VJ21.092 (in Russian)

16. Karatas H., Karaagac E., Karatas D. Agaoglu S. Genetic characterization of grapevine germplasm (*Vitis vinifera* L.) by SSR (simple sequence repeats) in Sanliurfa province, South-East Turkey. // Fresenius Environmental Bulletin and Advances in Food Sciences. 2019. Vol. 28(5). P. 3835-3842. Available at: https://www.prt-parlar.de/download_feb_2019/ (accessed date: 15.10.2023)

17. Ilnitskaya E.T., Tokmakov S.V. Microsatellite loci polymorphism in the genotypes of native Don and Dagestan cultivars of grape. // Magarach. Viticulture and winemaking. 2015. Vol. 3. P. 23-24. (in Russian)

18. Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms / R. Arroyo-Garcia, et al. // Molecular Ecology. 2006. Vol. 15. P. 3707-3714. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2006.03049.x