

УДК 634.8: 631.52

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ КЛОНОВЫХ
ВАРИАЦИЙ СОРТОВ ВИНОГРАДА
КАБЕРНЕ-СОВИНЬОН И
САПЕРАВИ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА
МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ
ЛОКУСОВ**

Ильницкая Елена Тарасовна
канд. биол. наук

Супрун Иван Иванович
канд. биол. наук

Токмаков Сергей Вячеславович
канд. биол. наук

*Государственное научное учреждение
Северо-Кавказский зональный научно-
исследовательский институт
садоводства и виноградарства
Россельхозакадемии, Краснодар, Россия*

Изучен полиморфизм 10
микросателлитных локусов у сортов
винограда Каберне-Совиньон, Саперави
и их сертифицированных клонов.
Проведен анализ протоклонов,
выделенных ранее в процессе клоновой
селекции, с помощью sst-маркеров,
перспективных в идентификации
клонового полиморфизма. Выделено
7 протоклонов сорта Каберне-Совиньон
и 2 протоклона Саперави, имеющих
отличия по изученным локусам
от исходных сортов.

Ключевые слова: ВИНОГРАД,
КЛОНОВАЯ СЕЛЕКЦИЯ,
ИДЕНТИФИКАЦИЯ КЛОНОВ,
МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЕ МАРКЕРЫ

UDC 634.8: 631.52

**IDENTIFICATION OF THE CLONAL
VARIATIONS OF CABERNET
SAUVIGNON AND SAPERAVI
GRAPES BASED
ON THE MICROSATELLITE
LOCI ANALYSIS**

Il'nitskaya Elena
Cand. Biol. Sci.

Suprun Ivan
Cand. Biol. Sci.

Tokmakov Sergey
Cand.Sci.Biol.

*State Scientific Organization North
Caucasian Regional Research Institute
of Horticulture and Viticulture
of the Russian Academy of Agricultural
Sciences, Krasnodar, Russia*

Polymorphism of 10 microsatellite loci
of Cabernet Sauvignon, Saperavi grapes
and their certified clones was studied.
An analysis of previously identified
by clonal selection grapes protoclonal
is conducted with perspective
for clonal polymorphism identification
SSR-markers. 7 protoclonal of Cabernet
Sauvignon and 2 protoclonal of Saperavi
with differences in the studied loci from
original cultivars are allocated.

Keywords: GRAPES, CLONAL
BREEDING, IDENTIFICATION
OF CLONES, MICROSATELLITE
MARKERS

Введение. В настоящее время ДНК-маркеры широко применяются при оценке биологического разнообразия, классификации генотипов и паспортизации сортов. Для дифференцировки растений внутри вида и идентификации сортов наиболее часто применяют маркерные системы, основанные на вариативности микросателлитных участков ДНК.

Микросателлиты (SSR – simple sequence repeats; STR – simple tandem repeats) – тандемные повторы простых последовательностей в структуре ДНК, которые могут состоять из 4, 3, 2 нуклеотидов и распространены повсеместно в геноме высших растений. Для идентификации сортов винограда также наиболее часто применяют микросателлитные маркеры. Так для европейского проекта по изучению генетических ресурсов винограда (<http://www.genres.de/vitis/>) были выбраны нейтральные SSR-маркеры VVS2, VVMD5, VVMD7, VrZAG47, VrZAG62, VrZAG79, благодаря их высокой распознавательной способности [1].

Результаты ряда работ по идентификации клонов винограда показывают, что микросателлитный анализ также дает возможность оценивать степень генетического родства клонов между собой и исходным сортом винограда, однако определенный набор маркеров может давать разную информативность на отдельных сортах. Для некоторых групп сортов могут выявляться индивидуальные оптимальные наборы маркеров, позволяющие проводить идентификацию клоновых вариаций [2, 3].

Клоновая селекция – важное направление в селекции винограда, метод сортоулучшения, позволяющий выделить высоко адаптированные формы к конкретным местам возделывания. Наиболее сложный и длительный этап клоновой селекции – достоверная идентификация клона: определение наличия генетических различий с исходным сортом.

Объекты и методы исследований. С 2005 года сотрудники лаборатории селекции, сортоизучения и сохранения генофонда винограда Северо-Кавказского зонального НИИ садоводства и виноградарства проводят планомерную работу в ряде виноградпроизводящих хозяйств Краснодарского края по выделению высокоадаптивных клонов востребованных винных сортов винограда. Так, к настоящему времени по комплексу положительных признаков отобрано свыше 50 протоклонов таких популярных сортов, как Каберне-Совиньон и Саперави [4, 5].

Проводится второй этап клоновой селекции: оценка выделенных протоклонов по их вегетативному потомству на клоноиспытательном участке, что позволит определить лучшие образцы и отбраковать случайные модификации. Параллельно проводится изучение протоклонов методами ДНК-маркирования с использованием микросателлитных маркеров.

В работе использованы SSR-маркеры VVS2, VVMD5, VVMD7, VrZAG47, VrZAG62, VrZAG79, рекомендованные союзом генетиков винограда в качестве основных для генотипирования *V.vinifera*, а также VMC3a9, VMC5g7, VVMD30, VVMD32 – микросателлитные маркеры, перспективные для идентификации клонов, по литературным данным [3].

Микросателлитный анализ проводили на основе ПЦР-метода с разделением продуктов реакции с помощью электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле и визуализацией в УФ-свете с предварительным окрашиванием раствором бромистого этидиума. Обработку результатов вели с помощью программы Gel-Pro 3.1.

Обсуждение результатов. При больших объемах анализируемых образцов встает вопрос о пропускной способности лаборатории и сохранении материала для экстракции ДНК в необходимом состоянии. Выделение образцов ДНК из взрослых листьев вегетирующих растений – достаточно сложный процесс по причине высокого содержания в тканях винограда веществ, ингибирующих ПЦР (особенно полифенольных соединений), требующий дополнительных этапов очистки, в том числе и постэкстракционной, что удорожает процесс.

С целью проведения экстракции ДНК из листьев на максимально ранних этапах вегетации и регулирования объема экспериментальных работ нами в октябре-ноябре были заготовлены черенки с изучаемых кустов и заложены на хранение при 6–8 °С. Через два месяца, после прохождения фазы физиологического покоя, черенки могут пробудиться при соответст-

вующих условиях. При таком алгоритме можно уже в декабре-январе проводить экстракцию проб ДНК, регулируя при этом нагрузку работы сроком выведения черенков из стадии покоя. Проращивали черенки на воде при комнатной температуре без прямого доступа солнечных лучей. Экстракцию ДНК проводили из только что появившихся листочков стандартным методом ЦТАБ, дополнительных этапов очистки не требовалось.

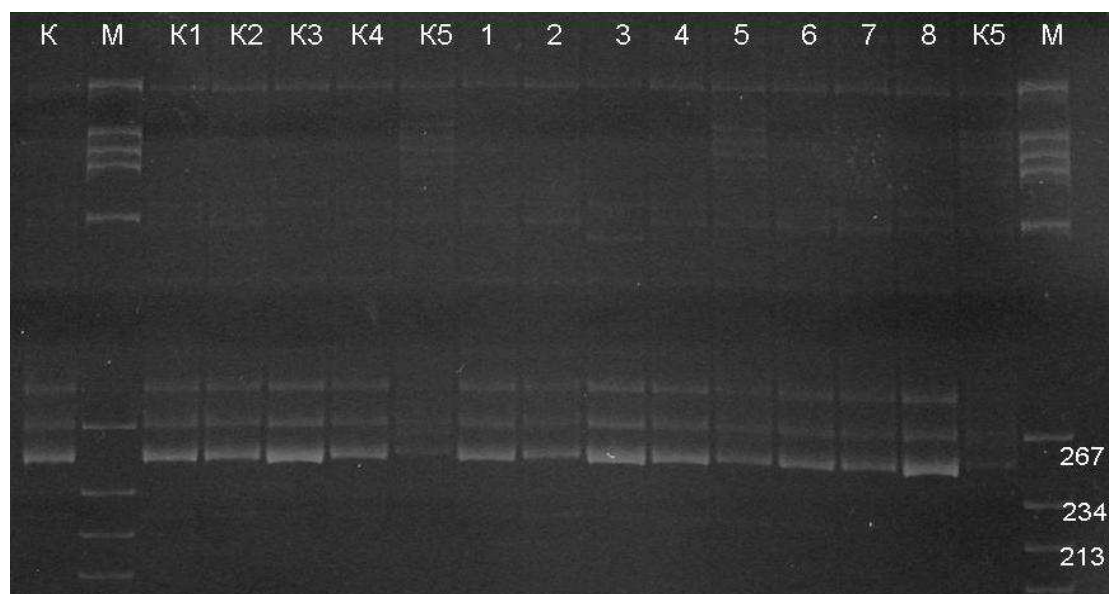
Таким образом, данный подход дает возможность рационально распределять трудозатраты при массовых анализах, а также сохранять анализируемый материал; при использовании данной схемы построения эксперимента метод ЦТАБ позволяет получать из растений винограда образцы ДНК достаточно высокой степени чистоты, дающие четкие ПЦР-продукты хорошего качества. Кроме того, данный метод является и достаточно низким по себестоимости.

В первую очередь, с использованием вышеуказанных SSR-маркеров были проанализированы сертифицированные клоны зарубежной селекции: Каберне-Совиньон 15, Каберне-Совиньон 337, Каберне-Совиньон 338, Каберне-Совиньон 169, Саперави 101, Саперави 7 и соответствующие им сорта. Некоторые образцы дублировали – анализировали формы одного наименования, но из разных мест произрастания: производственные насаждения, ампелографическая коллекция.

Проявляя межсортовые различия, изученные SSR-локусы в основном не идентифицировали полиморфизм между клонами и сортами. На втором этапе работ проведен анализ ранее отобранных в процессе клоновой селекции протоклонов сортов Каберне-Совиньон, Саперави.

При анализе результатов электрофоретического разделения продуктов ПЦР с помощью программы Gel-Pro 3.1. столкнулись с вопросом о спорности наличия различий в размерах продуктов по некоторым локусам. За значимую отличимость принимали разницу в размере продукта свыше двух пар нуклеотидов.

Локус VrZAG79 проявил полиморфность и в идентификации сертифицированных клонов (выделился сорт винограда Каберне–Совиньон 169) и при изучении протоклонов сорта Каберне-Совиньон: размеры продуктов протоклонов варьировали в диапазоне 2-8 пар оснований, результаты электрофореза представлены на рисунке.



М – маркер молекулярного веса *pBR322/BsuRI*

К – Каберне-Совиньон (сорт 1), К1 – Каберне-Совиньон 15,

К2 – Каберне-Совиньон 337, К3 – Каберне-Совиньон 169,

К4 – Каберне-Совиньон 338, К5 – Каберне-Совиньон (коллекция),

1 – 8 – протоклоны сорта Каберне

Рис. Полиморфизм микросателлитного локуса VrZAG79

С целью наиболее точного определения аллельного полиморфизма микросателлитных локусов был использован метод фрагментного анализа (капиллярный электрофорез на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism3130), позволяющий идентифицировать аллельные различия до 1 пары нуклеотидов.

Так был изучен полиморфизм локуса VMC5g7 у 34 образцов: сорта Каберне-Совиньон, 4 сертифицированных клонов этого сорта и 8 выделенных нами протоклонов; сорта Саперави, 2 клонов этого сорта и 18 протоклонов. В исследованиях F.Pelsy et al. (2010) именно маркер VMC5g7 проявил результативность в выявлении клонового полиморфизма сорта Каберне-Совиньон [3].

Из четырех изученных сертифицированных клонов один (Каберне-Совиньон 337) имеет значимые генетические различия по локусу VMC5g7 с оригинальным сортом и другими клонами. Среди восьми протоклонов сорта Каберне-Совиньон 3 образца показали отличные от остальных размеры продуктов ПЦР (табл.).

Полиморфизм локуса VMC5g7

Образец	Размер ПЦР-продукта, пар оснований
Каберне-Совиньон	200/201/202
Каберне-Совиньон 337	207/210/212
Каберне-Совиньон 15	199/200/201
Каберне-Совиньон 338	199/200/201
Каберне-Совиньон 169	199/200/201
Протоклон ЧК-3-58	201
Протоклон ЧК-3-75	200/201/202
Протоклон ЧК-8-38	201/205/210
Протоклон ЧК-1-10	199/200/201
Протоклон ЧК-1-77	201/205/210
Протоклон ЧК-1-80	201
Протоклон ЧК-2-21	192
Протоклон ЧК-2-33	201

По локусу VMC5g7 фрагментный анализ не выявил полиморфизма между сортом Саперави и клонами Саперави 7 и Саперави 101: размер продукта – 183-184 пар оснований. Анализ протоклонов выделил два образца (ФС-83-49 и ФС-146-17) с размером ПЦР-продукта, отличным от остальных образцов (162-163 пар оснований).

Метод фрагментного анализа позволяет с высокой степенью точности оценивать полиморфизм микросателлитных локусов и устраняет возможность субъективной ошибки при визуальной оценке результатов ПЦР-продуктов. Однако метод является дорогостоящим, по этой причине не был проведен анализ всех изучаемых образцов.

Мы предполагаем, что возможна разработка мультиплексных систем, когда одновременно проводится анализ по нескольким микросателлитным локусам, имеющим разные, не перекрывающиеся диапазоны размеры продуктов ПЦР, что позволит сократить себестоимость анализа.

Проведенный к настоящему времени анализ микросателлитных локусов выделил 7 протоклонов сорта Каберне-Совиньон (ЧК-1-10, ЧК-3-58, ЧК-1-77, ЧК-1-80, ЧК-2-33, ЧК-8-38, ЧК-2-21), 2 протоклона сорта Саперави (ФС-83-49, ФС-146-17), как имеющие значимые генетические отличия от исходных сортов (свыше 2 пар оснований). Данные протоклоны также входят в число лучших, выделяющихся по комплексу хозяйственно-ценных признаков.

Однако об отсутствии генетических различий по изученным локусам в других исследованных образцах мы утверждать не можем, так как разделение продуктов ПЦР-анализа проводилось в полиакриламидном геле, и интерпретация результатов осуществлялась с помощью программы Gel-Pro 3.1, на этом этапе существует вероятность субъективной ошибки. При составлении мировых генетических баз данных для высокоточного достоверного сопоставления результатов генотипирования применяют автоматические генетические анализаторы.

Заключение. Считаем перспективным продолжать исследования в данной области, главным образом в направлении совершенствования методических подходов для идентификации генетического полиморфизма.

Выполнение достоверной высокоточной ДНК-идентификации клонов винограда возможно с использованием фрагментного анализа на автоматических генетических анализаторах. При этом для снижения себестоимости анализов необходимо проводить мультиплексный анализ микросателлитных маркеров.

Работа проведена при финансовой поддержке РФФИ и региональных инвесторов: проект № 11-04-96538-р_юг_ц.

Литература

1. P. This, A. Jung, P. Boccacci et al. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars // Theor. Appl. Genet. – 2004. – Vol. 109. – P. 10448–11458.
2. F. Regner, R. Hack, J. L. Santiago Highly variable *Vitis* microsatellite loci for the identification of Pinot Noir clones // Vitis. – 2006. - Vol. 45. – P. 85–91.
3. F.Pelsy, S.Hocquigny, X.Moncada et al. An extensive study of the genetic diversity within seven French wine grape variety collections // Theor. Appl. Genet. – 2010. - Vol. 120. - P. 1219-1231.
4. Петров, В.С. Протоклоны винограда сортов Алиготе, Саперави и Цимлянский черный в АФ «Фанагория – Агро» / В.С. Петров, Е.Т. Ильницкая, Т.А. Нудьга [и др.] // Виноделие и виноградарство.– 2010.– № 4. – С. 26-27.
5. Петров, В.С. Улучшение агробиологических свойств сорта винограда Саперави методом клоновой селекции в условиях Тамани / В.С. Петров, Т.А. Нудьга, Е.Т.Ильницкая [и др.] // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2011. - № 8(2). – С. 12-16.– Режим доступа: <http://www.journal.kubansad.ru/pdf/11/02/02.pdf>.