

УДК 575.174.015.3

**ДНК-ПАСПОРТИЗАЦИЯ
НЕКОТОРЫХ СОРТОВ
ВИНОГРАДА СЕЛЕКЦИИ
СКЗНИИСИВ И АЗОСВиВ**

Ильницкая Елена Тарасовна
канд. биол. наук,
зав. лабораторией сортоизучения
и селекции винограда

Токмаков Сергей Вячеславович
канд. биол. наук,
науч. сотрудник лаборатории генетики
и микробиологии

Кайдышева Галина Анатольевна
студент магистр 2 курса
кафедры генетики, микробиологии
и биотехнологии КубГУ

*Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«Северо-Кавказский зональный научно-
исследовательский институт садоводства
и виноградарства», Краснодар, Россия*

Целью представленной работы была ДНК-паспортизация ряда востребованных сортов винограда селекции СКЗНИИСИВ и АЗОСВиВ на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов. Результаты проведенного исследования могут быть использованы для идентификации сортов, проверки чистосортности маточных насаждений и посадочного материала отечественных сортов винограда. Нами проведено изучение сортов отечественной селекции, перспективных для совершенствования промышленного сортимента винограда юга России на молекулярно-генетическом уровне. В статье представлены результаты ДНК-паспортизации шести отечественных сортов винограда: Бархатный, Владимир, Дмитрий, Достойный, Курчанский, Красностоп АЗОС. Анализ генотипов сортов проводили на смеси образцов ДНК из 7-10 типичных растений

UDC 575.174.015.3

**DNA-FINGERPRINTING
OF SOME GRAPEVINE
CULTIVARS OF NCRRIH&V
AND AZESV&W BREEDING**

Ilitskaya Elena
Cand. Biol. Sci.
Head of Laboratory of Variety's Study
and Breeding of Grapes

Tokmakov Sergey
Cand. Biol. Sci.
Research Associate of Laboratory
of Genetics and Microbiology

Kaydysheva Galina
Master's student of the 2nd course
of Department of Genetics,
Microbiology and Biotechnology
of Kuban State University

*Federal State Budgetary Scientific
Institution "North Caucasian
Regional Research Institute
of Horticulture and Viticulture",
Krasnodar, Russia*

The aim of the present work was the DNA fingerprinting of a number of promising grapevine cultivars of NCRRIH&V and AZESV&W breeding, based on the analysis of polymorphism of microsatellite loci. The results of the study can be used for identifying of the studied cultivars and for control purebred of parent vines plantations and planting material of domestic cultivars. Domestic breeding cultivars, promising to improve the industrial assortment of grapes in the Southern Russia were studied on the molecular genetic level. The article presents the results of a DNA-fingerprinting of six domestic cultivars of grapes: Barchatny, Vladimir, Dmitry, Dostoiny, Kurchanskiy, Krasnostop AZOS. Analysis of cultivars genotypes carried out on the mixture of DNA samples of 7-10 typical plants of each cultivar.

по каждому сорту. ДНК-профилирование проведено по микросателлитным локусам VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 и VrZAG79, именно эти маркеры рекомендованы в качестве основных для генотипирования *Vitis vinifera* L. Микросателлиты (SSR-simple sequence repeats) – тандемные повторы простых последовательностей в структуре ДНК чаще всего используют в качестве ДНК-маркеров для изучения генотипов винограда. Основным методом, применяемый в работе, – полимеразная цепная реакция с разделением продуктов реакции с использованием автоматического генетического анализатора ABI Prism 3130. В качестве контроля в работе использовали ДНК сортов Шардоне и Каберне-Совиньон, аллельный состав которых по изучаемым SSR-локусам известен. Генотипы сортов показали различные комбинации аллелей по изученным локусам. Таким образом, рекомендуемого минимального набора микросателлитных маркеров достаточно для дифференциации изученных генотипов. В статье также приведено краткое описание исследованных сортов, их основные отличительные положительные агробиологические характеристики.

Ключевые слова: ДНК-ПАСПОРТИЗАЦИЯ, СОРТА ВИНОГРАДА, МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЙ ПРОФИЛЬ

DNA profiles were obtained by microsatellite loci MD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 and VrZAG79, these markers are recommended as the basic ones for *Vitis vinifera* L. genotyping. Microsatellites (SSR-simple sequence repeats) – tandem repeats of simple sequences in the DNA structure are the most often used as DNA markers for studying of the grapes genotypes. The main method used in the work – polymerase chain reaction with the separation of the reaction products using an automated genetic analyzer ABI Prism 3130. The DNA of Chardonnay and Cabernet Sauvignon were used as the control, allelic compositions of studied SSR-loci are known for these cultivars. Cultivars genotypes showed the different alleles combinations on studied loci. Thus, the minimum recommended set of microsatellite markers is sufficient to differentiate of studied genotypes. The article also provides a brief description of the studied cultivars and their main distinguishing positive agronomic and biological characteristics.

Key words: DNA-FINGERPRINTING, GRAPEVINE CULTIVARS, MICROSATELLITE PROFILE

Введение. Идентификация сортов винограда традиционно базируется на ампелографии. В основе ампелографического метода – морфологические различия листьев, побегов, гроздей и ягод различных сортов. Данный метод достаточно точен и надежен, но на ампелографические показатели могут влиять условия окружающей среды, а молодые растения часто не обладают типичными морфологическими характеристиками взрослых растений, при этом некоторые сорта сложно различить при визуальном сравнении их морфологических признаков. Стремительное развитие молекулярной биологии перевело на другой уровень процесс идентификации ге-

нотипов: ДНК-профили служат основой для достоверного определения генотипов, дополняя традиционные ампелографические описания и агробиологические характеристики сортов[1].

Для генотипирования образцов винограда наиболее часто используют микросателлитные маркеры. Микросателлиты (SSR-simple sequence repeats; STR-simple tandem repeats) – тандемные повторы простых последовательностей в структуре ДНК, которые могут состоять из 4, 3, 2 или даже одного нуклеотида. Источник полиморфизма микросателлитных последовательностей – сайт-специфическое варьирование длины повтора, что в свою очередь обусловлено различием в числе единиц повтора. Микросателлитные последовательности распространены повсеместно в геноме высших растений.

В настоящее время SSR-маркеры VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 и VrZAG79 составляют минимальный основной набор в работах по ДНК-паспортизации сортов винограда.

Ранние работы по микросателлитному генотипированию сортов винограда включали различные наборы SSR-маркеров, что зачастую делало сложным сопоставление результатов разных исследовательских центров. Thisetal. изучили данные различных лабораторий и выделили 6 вышеуказанных наиболее информативных, полиморфных микросателлитных маркеров, которые были рекомендованы для изучения генотипов *Vitis vinifera* L. [2]. В результатах этой же работы был представлен референсный список аллелей наиболее распространенных и известных сортов винограда (Каберне-Совиньон, Шардоне, Каберне фран, Пино нуар, Мерло и др.).

Позже список маркеров для генотипирования, идентификации, дифференциации и классификации сортов винограда был дополнен VVMD25, VVMD28, VVMD32 [3]. Также следует отметить и работы Cipriani G. и др.: из идентифицированных 26962 микросателлитов исследователями были отобраны содержащие три-, тетра- и пентаповторы для изучения в целях

составления генетических паспортов сортов [4]. После тестирования на информативность и воспроизводимость результатов, 38 SSR-маркеров были рекомендованы для генотипирования *Vitis spp.*

В дальнейшую работу были включены наиболее полиморфные 34 маркера: ими была прогенотипирована коллекция из 1148 образцов – 1005 сортов из Национального Каталога Винограда Италии и менее популярные местные сорта. Профили 32 референсных сортов по изученным локусам опубликованы [5]. Таким образом, в случае паспортизации генетически близких образцов, когда полиморфизма минимального набора SSR-маркеров может быть недостаточно, число анализируемых микросателлитных локусов увеличивают.

Целью нашей работы была ДНК-паспортизация ряда востребованных сортов винограда селекции СКЗНИИСиВ и АЗОСВиВ на основе микросателлитного анализа.

Объекты и методы исследований. Основной метод, применяемый нами в исследовании, – полимеразная цепная реакция (ПЦР) с разделением продуктов реакции с использованием автоматического генетического анализатора ABI Prism 3130. ДНК выделяли методом ЦТАБ из развивающихся листочков молодых побегов [6]. ПЦР проводили на основе стандартного протокола, экспериментально подобрав температуры отжига для пар праймеров. В исследовании задействованы SSR-маркеры VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 и VrZAG79. Генотипирование осуществляли мультиплексными наборами маркеров [7]. Проанализированы генотипы технических сортов винограда Бархатный, Владимир, Дмитрий, Достойный, Курчанский, Красностоп АЗОС, произрастающие на ампелографической коллекции (г. Анапа). Данные сорта винограда созданы селекционерами СКЗНИИСиВ (Владимир, Дмитрий, Курчанский) и АЗОСВиВ (Бархатный, Достойный, Красностоп АЗОС).

Анализ генотипов сортов проводили на смеси образцов ДНК из 7-10 типичных растений по каждому сорту. В качестве контроля (референсных сортов) в работе использовали Шардоне и Каберне-Совиньон, аллельный состав которых по изучаемым SSR-локусам известен [2].

Обсуждение результатов. В настоящее время все больше внимания уделяется развитию виноградовинодельческой отрасли Российской Федерации. Последние годы возрос интерес и к, так называемому, винному туризму. В связи с этим всё актуальнее становится вопрос увеличения доли в насаждениях винограда сортов отечественной селекции, наиболее адаптированных к агроклиматическим условиям их создания. Перспективные сорта винограда, их агробιοлогические характеристики и качество урожая изучаются традиционными методами.

Нами проведено изучение сортов отечественной селекции, перспективных для совершенствования промышленного сортимента винограда юга России, на молекулярно-генетическом уровне. Выполнено микросателлитное профилирование технических сортов винограда Бархатный, Владимир, Дмитрий, Достойный, Курчанский, Красностоп АЗОС (табл.).

Сорт Бархатный относят к европейским сортам по генетическому происхождению, остальные сорта – межвидовые гибриды, и часть из них имеют общие родительские формы.

Таблица – Микросателлитные ДНК-профили сортов винограда

Сорт	Аллели SSR-локусов, п.н.											
	VVS2		VVMD7		VVMD27		VVMD5		VrZAG62		VrZAG79	
Каберне-Совиньон *	139	151	240	240	175	189	234	242	188	194	248	248
Шардоне *	137	143	240	244	181	189	236	240	188	196	244	246
Бархатный	135	151	248	250	179	183	230	240	186	186	248	256
Владимир	129	143	240	240	181	189	238	242	200	202	248	256
Дмитрий	133	145	240	252	189	189	234	234	194	194	244	260
Достойный	125	133	240	254	181	189	224	242	188	200	244	248
Курчанский	145	145	240	252	181	189	228	242	194	194	244	248
Красностоп АЗОС	125	145	240	254	175	189	224	238	188	200	238	244

Бархатный (Кировабадский х Мускат гамбургский) – технический сорт винограда среднего срока созревания, селекции Анапской зональной опытной станции виноградарства и виноделия. Данный сорт ценится за качество приготовляемых из его урожая вин, обладающих выраженным мускатным ароматом, переходящем во вкусе в нежно-цитронные тона.

Достойный – сорт позднего срока созревания (Филлоксероустойчивый Джемете х Мускат гамбургский), селекции АЗОС ВиВ, обладает устойчивостью к корневой форме филлоксеры и может выращиваться в корнесобственной культуре. *Красностоп АЗОС* (Филлоксероустойчивый Джемете х Красностоп анапский) также характеризуется толерантностью к корневой форме филлоксеры и при этом имеет повышенную устойчивость к морозу, относится к сортам среднего срока созревания.

Сорта селекции СКЗНИИСиВ – *Владимир* (Мицар х Саперави северный), среднего срока созревания, и *Курчанский* (Мускат кубанский х Саперави северный), среднепоздний сорт, характеризуются высокой морозоустойчивостью (до – 27 °С) и повышенной устойчивостью к основным грибным заболеваниям, обладая при этом высоким качеством продукции.

Сорт *Дмитрий* (Варусет х Гранатовый), позднего срока созревания, с повышенной устойчивостью к морозу и толерантностью к корневой форме филлоксеры, пригоден к возделыванию в корнесобственной культуре.

Изученные сорта показали различные комбинации аллелей по исследуемым микросателлитным локусам. Так, в результате проведенной работы показано, что минимального рекомендуемого для генотипирования сортов винограда набора микросателлитных маркеров достаточно для дифференциации изученных генотипов.

Заключение. Приведенные ДНК-профили могут быть использованы для идентификации изученных сортов винограда, проверки чистосортности маточных насаждений и посадочного материала, а также при защите авторских прав.

Литература

1. Cipriani G. Grapevine fingerprinting using microsatellite repeats / G. Cipriani, G. Frazza, E. Peterlunger, R. Testolin // *Vitis*. – 1994. – V. 33. – P. 211-215.
2. This P. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars / P. This, A. Jung, P. Boccacci, J. Borrego, R. Botta, L. Costantini, M. Crespan, G.S. Dangl, C. Eisenheld, F. Ferreira-Monteiro, S. Grando, J. Ibanez, T. Lacombe, V. Laucou, R. Magalhaes, C.P. Meredith, N. Milani, E. Peterlunger, F. Regner, L. Zulini, E. Maul // *Theor. Appl. Genet.* – 2004. – V. 109. – P. 1448-1458.
3. This P. Microsatellite markers analysis / P. This // Minutes of the First Grape Gen06 Workshop March 22nd and 23rd, 2007 INRA, Versailles (France). – P. 3-42.
4. Cipriani G. A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (*Vitis* spp.) genotyping / G. Cipriani, M.T. Marrazzo, G. Di Gaspero, A. Pfeiffer, M. Morgante, R. Testolin // *BMC Plant Biol.* – 2008. – V.8 (127). – P.1-13.
5. Cipriani G. The SSR-based molecular profile of 1005 grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions uncovers new synonymy and parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origin / G. Cipriani, A. Spadotto, I. Jurman, G. Di Gaspero, M. Crespan, S. Meneghetti, R. Testolin // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2010. – 121(8). – P. 1569-1585.
6. Rogers S. O. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues / S. O. Rogers, A. J. Bendich // *Plant Molecular Biology*. – 1985. – P.69-76.
7. Ильницкая, Е.Т. Микросателлитное генотипирование донских аборигенных сортов винограда (*Vitisvinifera* L.) / Е.Т. Ильницкая, С.В. Токмаков, И.И. Супрун // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. - 2014.- Т.18.- № 3. – С.523-529.

References

1. Cipriani G. Grapevine fingerprinting using microsatellite repeats / G. Cipriani, G. Frazza, E. Peterlunger, R. Testolin // *Vitis*. – 1994. – V. 33. – P. 211-215.
2. This P. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars / P. This, A. Jung, P. Boccacci, J. Borrego, R. Botta, L. Costantini, M. Crespan, G.S. Dangl, C. Eisenheld, F. Ferreira-Monteiro, S. Grando, J. Ibanez, T. Lacombe, V. Laucou, R. Magalhaes, C.P. Meredith, N. Milani, E. Peterlunger, F. Regner, L. Zulini, E. Maul // *Theor. Appl. Genet.* – 2004. – V. 109. – P. 1448-1458.
3. This P. Microsatellite markers analysis / P. This // Minutes of the First Grape Gen06 Workshop March 22nd and 23rd, 2007 INRA, Versailles (France). – P. 3-42.
4. Cipriani G. A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (*Vitis* spp.) genotyping / G. Cipriani, M.T. Marrazzo, G. Di Gaspero, A. Pfeiffer, M. Morgante, R. Testolin // *BMC Plant Biol.* – 2008. – V.8 (127). – P.1-13.
5. Cipriani G. The SSR-based molecular profile of 1005 grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions uncovers new synonymy and parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origin / G. Cipriani, A. Spadotto, I. Jurman, G. Di Gaspero, M. Crespan, S. Meneghetti, R. Testolin // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2010. – 121(8). – P. 1569-1585.
6. Rogers S. O. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues / S. O. Rogers, A. J. Bendich // *Plant Molecular Biology*. – 1985. – P.69-76.
7. Il'nickaja, E.T. Mikrosatellitnoe genotipirovanie donskih aborigennyh sortov vinograda (*Vitisvinifera* L.) / E.T. Il'nickaja, S.V. Tokmakov, I.I. Suprun // *Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii*. - 2014.- T.18.- № 3. – S.523-529.