

УДК 575:576.3

**ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА
SSR-ЛОКУСОВ ЮЖНОРОССИЙСКИХ
АБОРИГЕННЫХ СОРТОВ
ВИНОГРАДА***

Ильницкая Елена Тарасовна
канд. биол. наук
старший научный сотрудник
НЦ сортоизучения и селекции

Токмаков Сергей Вячеславович
канд. биол. наук
научный сотрудник
НЦ сортоизучения и селекции

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

Фундаментальной основой решения теоретических и прикладных задач селекции является генофонд культуры. Аборигенные, стародавние сорта различных регионов возделывания винограда, как и дикие формы, – наиболее ценная часть мирового генофонда культуры. Местные, аборигенные сорта представляют большой интерес для решения прикладных задач селекции и фундаментальных вопросов. Именно в генотипах автохтонных сортов винограда могут быть выявлены комплексы признаков, обеспечивающие адаптивность растений к конкретным агроклиматическим условиям возделывания. Целью настоящей работы является изучение генотипов южнороссийских аборигенных сортов винограда на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов. Начаты исследования по генотипированию автохтонных сортов винограда юга России.

UDC 575:576.3

**STUDY OF SSR-LOCI
POLYMORPHISM
OF SAUHTRUSSIAN LOCAL
GRAPE CULTIVARS**

Ильницкая Елена
Cand. Biol. Sci.
Senior Research Associate
of SC of Varieties Study and Breeding

Tokmakov Sergey
Cand. Biol. Sci.
Research Associate
of SC of Varieties Study and Breeding

*State Scientific Organization North
Caucasian Regional Research Institute
of Horticulture and Viticulture
of FASO of Russia, Krasnodar, Russia*

The fundamental basis for the solving of theoretical and applied problems of breeding is the culture gene pool. Native, age-old varieties of various regions of grapes cultivation, as well as wild forms, is the most valuable part of a world gene pool of culture. Local native varieties represent a great interest for solving of applied problems of breeding and fundamental questions. Just in genotypes of autochthonic varieties of grapes the complexes of traits providing adaptability of plants to specific agriclimate conditions of cultivation can be revealed. The purpose of this work is studying of genotypes of the South Russian native grapes varieties on the basis of the analysis of polymorphism of microsatellite loci. Researches on genotyping of autochthonic grapes varieties of the South of Russia are begun.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края по гранту № 13-04-96541p_юг_a.

Получены ДНК-профили 12 аборигенных сортов по микросателлитным локусам VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 и VrZAG79.

Установлено, что каждый сорт винограда имеет свой уникальный ДНК-профиль. Определены сорта с редкими аллелями по изученным локусам в исследуемой группе сортов винограда.

Ключевые слова: АБОРИГЕННЫЕ СОРТА ВИНОГРАДА, ГЕНОТИП, ДНК-МАРКЕРЫ, ПОЛИМОРФИЗМ SSR-ЛОКУСОВ

DNA profiles of 12 native varieties on microsatellite loci of VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 and VrZAG79 are received. It is established that each grapes variety has the own unique DNA profile. The varieties with rare alleles are determined by the studied loci in the research group of grapes varieties.

Key words: LOCAL GRAPES VARIETIES, GENOTYPE, DNA-MARKERS, SSR-LOCI POLYMORPHISM

Введение. Важнейшим условием стабильного урожая, увеличения валовых сборов и улучшения качества виноградно-винодельческой продукции является систематическое совершенствование сортового состава виноградников, что обеспечивает селекция. В свою очередь, фундаментальной основой решения теоретических и прикладных задач селекции, в том числе и винограда, является генофонд культуры.

Крупнейшая ампелографическая коллекция в России была создана в 1995 году в Анапе. В настоящее время в коллекции собран генофонд в количестве более четырех тысяч образцов. По видовому составу в собранном генофонде преобладают сорта *Vitis vinifera* L. Большинство сортов *Vitis vinifera* L. представлены местными сортами различных регионов виноградарства [1]. Аборигенные, стародавние сорта различных регионов возделывания винограда, как и дикие формы, – наиболее ценная часть мирового генофонда культуры.

При изучении сортов на современном этапе науки традиционные описания дополняются молекулярно-генетическими данными [2, 3]. Так, например, Greek Vitis database – греческая база данных *Vitis* L. включает в себя информационную базу данных, содержащую всю возможную информацию о греческих сортах винограда: микросателлитные профили геноти-

пов греческих сортов, базу данных микросателлитных профилей хлоропластов греческих сортов, ампелографическое описание 270 сортов.

Swiss Vitis Microsatellite Database (SVMD, швейцарская база данных микросателлитных маркеров винограда) является стандартизированной базой данных микросателлитных последовательностей практически всех сортов, подвоев или диких форм винограда, которые произрастают в Швейцарии. Она содержит результаты генотипирования 170 сортов винограда по шести микросателлитным локусам (VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 и VrZAG79), выбранным в качестве основных международным сообществом генетики винограда.

Местные, аборигенные сорта винограда – важная часть генофонда, представляющая интерес для решения прикладных задач селекции и фундаментальных вопросов. Именно в генотипах автохтонных сортов могут быть выявлены комплексы признаков, обеспечивающие адаптивность к конкретным агроклиматическим условиям. В целях изучения разнообразия генетических ресурсов винограда эта группа также представляет большой интерес: аборигенные сорта – источник уникальных аллелей.

Краснодарский край, Ростовская область, Дагестан, Ставропольский край – основные регионы возделывания винограда в Российской Федерации, здесь же обнаружены старые аборигенные сорта, изучение генотипов которых может выявить уникальные аллели, определить родственные связи с другими группами, в целом расширить знания о генетическом разнообразии этих сортов.

В настоящее время в Российской ампелографической коллекции собрано свыше 80 российских аборигенных сортов *Vitis vinifera* L. из Дагестана, Ростовской, Астраханской областей.

Целью настоящей работы является изучение генотипов южнороссийских аборигенных сортов винограда на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов.

Объекты и методы исследований. Основной метод, применяемый в работе, – полимеразная цепная реакция (ПЦР) с разделением продуктов реакции методом электрофореза как в агарозном 2 % геле (при оптимизации параметров ПЦР), так и с использованием автоматического генетического анализатора ABI Prism 3130 при выполнении SSR-фингерпринтинга генотипов. Использование в исследовании автоматического генетического анализатора и специального программного обеспечения Gene Mapper и Peak Scanner дает возможность получить данные, соответствующие современным мировым требованиям идентификации генотипов винограда.

В исследовании задействованы SSR-маркеры, рекомендованные для молекулярно-генетической паспортизации генотипов *Vitis vinifera* Европейской базой данных и проектом GrapeGen06: VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 и VrZAG79 [2]. ПЦР проводили в стандартных условиях, экспериментально подобрав температуру отжига праймеров для каждого маркера. ДНК выделяли из молодых листьев апикальной части побегов винограда методом СТАВ [4].

Для снижения себестоимости анализов апробировано использование мультиплексной ПЦР. SSR-маркеры были объединены в мультиплексные наборы с учетом диапазонов размеров амплифицируемых фрагментов по конкретным локусам и температуры отжига праймерных пар; использовали различные флуоресцентные красители в одном наборе.

Генотипирование сортов винограда проводилось следующими маркерными парами: VVS2 + VVMD7; VVMD27 + VVMD5; VrZAG62 + VrZAG79. В качестве контроля – референсных сортов – в работе использовали Шардоне и Каберне-Совиньон.

Обсуждение результатов. Получены ДНК-профили 12 аборигенных сортов винограда южнороссийских регионов по шести микросателлитным локусам, рекомендованным в качестве основных для генотипирования *Vitis vinifera* (табл.).

ДНК-профили изученных сортов винограда

Сорта	Аллели SSR-локусов, п.н.											
	VVS2		VVMD7		VVMD27		VVMD5		VrZAG62		VrZAG79	
Каберне-Совиньон *	138	150	240	240	175	189	234	242	188	194	248	248
Шардоне *	136	142	240	243	181	189	236	240	188	196	244	246
Варюшкин	132	142	249	249	187	196	240	242	198	204	254	254
Гимра	136	144	247	247	179	181	236	238	196	200	252	260
Гуляби дагестанский	134	136	243	253	183	196	232	238	188	200	258	260
Джунга	134	146	247	249	189	192	236	242	202	202	238	262
Дубут	134	144	243	263	181	194	230	236	188	196	252	260
Махроватчик	144	144	251	253	187	189	230	242	194	204	244	252
Плечистик	142	144	243	251	187	194	230	248	194	196	252	252
Пухляковский белый	132	142	243	243	181	183	242	250	190	190	254	262
Риш баба	138	150	253	253	181	185	226	236	196	204	252	260
Сарах	136	142	249	249	181	189	236	238	200	200	258	260
Толстокорый	134	134	253	253	181	185	230	238	200	202	252	260
Шавраны	134	142	249	253	181	194	238	238	196	200	252	260

Каждый сорт винограда имеет свой уникальный ДНК-профиль. Также в генотипах изученной группы сортов определены и редкие аллели в рамках изученной выборки.

Так, в генотипе сорта Риш баба по локусу VVS2 идентифицирована аллель размером 150 пар нуклеотидов, в этом же сорте по локусу VVMD5 определена аллель 226 п.н., в остальных 11 сортах аллели таких размеров по указанным локусам не были выявлены.

По локусу VVMD7 единичная аллель в данной группе сортов определена в сорте Дубут – 263 п.н. По локусу VVMD27 – в сорте Гимра: 179 п.н. По локусу VVMD5 в сортах Варюшкин и Плечистик определены

аллели размером 240 и 248 п.н., соответственно. В сорте Пухляковский белый – по локусу VrZAG62: 190 п.н. По локусу VrZAG79 в сорте Махроватчик определена аллель в 244 п.н.

Заключение. Изучение генотипов стародавних южнороссийских сортов винограда будет продолжено, расширение выборки исследуемых сортов позволит в дальнейшем сделать выводы о генетическом полиморфизме данной группы и определить генотипы с редкими аллелями.

Литература

1. Носульчак, В.А. Генофонд винограда. Виноград. Современные методологические аспекты организации селекционного процесса в садоводстве и виноградарстве. Монография / В.А. Носульчак, Е.Т. Ильницкая, О.М. Ильяшенко.– Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ, 2012.– С. 502-514.

2. Ильницкая, Е.Т. Идентификация клоновых вариаций сортов винограда Каберне-Совиньон и Саперави на основе анализа микросателлитных локусов / Е.Т. Ильницкая, И.И.Супрун, С.В. Токмаков // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс].– Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2013. – № 21(3).– С. 1-8.– Режим доступа: <http://www.journal.kubansad.ru/pdf/13/03/01.pdf>.

3. This P., Jung A., Boccacci P., Borrego J., et al. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars // Theor. Appl. Genet. – 2004. – V. 109. – P. 1448-1458.

4. Rogers S. O., Bendich A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Molecular Biology. – 1985. – P. 69-76.

References

1. Nosul'chak, V.A. Genofond vinograda. Vinograd. Sovremennye metodologicheskie aspekty organizatsii selektsionnogo protsessa v sadovodstve i vinogradarstve. Monografiya / V.A. Nosul'chak, E.T. Il'nitskaya, O.M. Il'yashenko.. Krasnodar: GNU SKZNIISiV, 2012. S. 502-514.

2. Il'nitskaya, E.T. Identifikatsiya klonovykh variatsiy sortov vinograda Kaberne-Sovin'on i Saperavi na osnove analiza mikrosatellitnykh lokusov / E.T. Il'nitskaya, I.I.Suprun, S.V. Tokmakov // Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii [Elektronnyj resurs].. Krasnodar: SKZNIISiV, 2013.– 21(3).– S. 1-8.. Rezhim dostupa: <http://vvn.eurnal.kubansad.ru/pdf/13/03/01.pdf>.

3. This P., Jung A., Boccacci P., Borrego J., et al. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars // Theor. Appl. Genet. – 2004. – V. 109. – P. 1448-1458.

4. Rogers S. O., Bendich A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Molecular Biology. – 1985. – P. 69-76.