

УДК 575:577.2:576.3

UDC 575:577.2:576.3

**ФИНГЕРПРИНТИНГ АБОРИГЕННЫХ
ДАГЕСТАНСКИХ СОРТОВ ВИНОГРАДА
ПО ДАННЫМ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО
АНАЛИЗА***

**FINGERPRINTING OF LOCAL
DAGESTAN GRAPES CULTIVARS
USING MICROSATELLITE
ANALYSIS**

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

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

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

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

Супрун Иван Иванович
канд. биол. наук, зав. лабораторией
генетики и микробиологии

Suprun Ivan
Cand. Sci. Biol., Head of Laboratory
of Genetics and Microbiology

Макаркина Марина Викторовна
мл. науч. сотрудник
лаборатории сортоизучения
и селекции винограда

Makarkina Marina
Junior Research Associate
of Laboratory of Variety's Study
and Breeding of Grapes

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

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

Изучение и сохранение генетического разнообразия представляет собой одну из наиболее важных научных проблем в генетике культурных растений. Аборигенные, стародавние сорта различных регионов возделывания винограда – ценная часть мирового генофонда этой культуры. При изучении генофонда винограда в настоящее время традиционные ампелографические описания дополняются молекулярно-генетическими данными. В наших исследованиях проведено генотипирование 14 автохтонных сортов винограда Дагестана: Асыл Кара, Баят капы, Гимра, Гуляби дагестанский, Джунга, Дубут, Мола гусейн цибил, Риш баба, Сарах, Тавлинский

One of the most important scientific problems in the genetics of cultivated plants is study and conservation of genetic diversity. Local native cultivars of different regions are the important part of world grapes gene pool. Traditional ampelographic descriptions are supplemented by molecular genetic data in the study of the gene pool of grapes at the present time. Genotyping of the 14 Dagestan autochthonous grapes cultivars has done in our research: Asyl Kara, Bayat Kapu, Gimra, Gulaby Daghestanskiy, Joonga, Dubut, Mola Huseyn Tsibil, Rish Baba, Sarah, Tavlinskiy Pozdny,

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

поздний, Хатал баар, Хоп халат, Хоца цибил, Шавраны. Получены ДНК-фигерпринты по микросателлитным локусам VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 и VrZAG79. Указанные SSR-маркеры рекомендованы союзом генетиков винограда в качестве основных для генотипирования *Vitis vinifera*. Молекулярно-генетический анализ выполнен на автоматическом генетическом анализаторе, позволяющем получать данные, соответствующие современным мировым требованиям идентификации генотипов винограда. В работе было апробировано использование мультиплексной (полимеразной цепной реакции (ПЦР)). Мультиплексные наборы позволяют оптимизировать время, затрачиваемое на ДНК-анализ и значительно снизить стоимость его проведения. Наибольший полиморфизм при изучении данной группы дагестанских сортов выявлен по локусу VVMD27: идентифицировано 9 аллелей на локус; наименьший полиморфизм отмечен по локусу VrZAG62: 5 аллелей/локус. Определены сорта винограда с редкими аллелями по изученным локусам в исследуемой выборке данной группы сортов. Показана информативность набора микросателлитных маркеров VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 и VrZAG79 для фингерпринтинга проанализированной выборки сортов винограда.

Ключевые слова: ГЕНОТИПЫ *VITIS VINIFERA*, АБОРИГЕННЫЕ СОРТА ВИНОГРАДА, ПОЛИМОРФИЗМ SSR-ЛОКУСОВ.

Hatal Baar, Hop Halat, Khotsa Tsibil, Shavrany. DNA profiles were obtained by microsatellite loci VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 and VrZAG79. Above-noted SSR-markers are recommended as the main for *Vitis vinifera* genotyping. Molecular genetic analysis was performed on an automated genetic analyzer that provides data, corresponding to the modern world requirements for genotype identification. Using of multiplex PCR was tested in our work. Multiplex kits allow to optimize the time spending on analysis of DNA, as well as significantly reduce implementation costs. VVMD27 locus showed the highest polymorphism in the study of this group of Daghestan cultivars: 9 alleles per locus are identified; locus VrZAG62 showed the smallest polymorphism – 5 alleles / locus. The cultivars of grapes with uncommon alleles at the studied loci were determined in the analyzed varieties group. The information of number of microsatellite markers VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 and VrZAG79 for fingerprinting of analyzed samples of grapes cultivars is shown.

Key words: *VITIS VINIFERA* GENOTYPES, LOCAL GRAPES CULTIVARS, SSR-LOCI POLYMORPHISM

Введение. Изучение и сохранение генетического разнообразия представляет собой одну из наиболее важных фундаментальных научных проблем в генетике культурных растений. Многие страны мира разработали и реализуют национальные программы по сохранению и использованию генетических ресурсов растений. Аборигенные,

стародавние сорта различных регионов возделывания винограда, как и дикие формы, – наиболее ценная часть мирового генофонда этой культуры.

В настоящее время наиболее эффективными методами для изучения генетического разнообразия, выяснения филогенетических взаимосвязей на различных таксономических уровнях являются методы, основанные на анализе полиморфизма первичной структуры ДНК. В работах по изучению генетического разнообразия и идентификации генотипов наиболее часто используют микросателлитные маркеры.

Микросателлитные последовательности (SSR)-тандемные повторы простых последовательностей в структуре ДНК – распространены повсеместно в геноме высших растений. Так, анализ полиморфизма SSR-локусов успешно применяют для исследований происхождения [1-6] и точной генетической идентификации сортов винограда [7-9].

Дагестан – один из основных регионов возделывания винограда в Российской Федерации, здесь же обнаружены и старые аборигенные сорта, изучение генотипов которых может выявить уникальные аллели, определить степень генетического сходства с другими группами, в целом расширить знания о генетическом полиморфизме этой географической группы. Первый этап подобных исследований – фингерпринтинг сортов. Так, при генотипировании 33 стародавних сортов Словении по 21 микросателлитному локусу выявлено несколько сортов-синонимов, и при этом не подтвердилось ранее предполагаемое близкое родство с некоторыми сортами винограда из соседних стран [10]. Генетический анализ 55 сортов из шести разных провинций Южной Анатолии в Турции определил с помощью SSR-маркеров один пример синонимов и четыре сорта-омонима в исследуемой генплазме винограда [11].

В представленной работе проведено генотипирование дагестанских аборигенных сортов винограда на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов.

Объекты и методы исследований. В работе были использованы аборигенные сорта винограда Дагестана: Асыл Кара, Баят капы, Гимра, Гуляби дагестанский, Джунга, Дубут, Мола гусейн цибил, Риш баба, Сарах, Тавлинский поздний, Хатал баар, Хоп халат, Хоца цибил, Шавраны.

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 в качестве основных для молекулярно-генетической паспортизации генотипов *Vitis vinifera* Европейской базой данных и проектом GrapeGen06: VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 и VrZAG79. ПЦР проводили по стандартному протоколу, экспериментально подобрав температуры отжига для праймеров. В качестве контроля (референсных сортов) в работе использовали сорта винограда Шардоне и Каберне-Совиньон, аллельный состав которых по изучаемым SSR-локусам известен [6, 11].

Образцы ДНК были выделены из апробированных растений ряда дагестанских аборигенных сортов, произрастающих на ампелографической коллекции в г. Анапе. ДНК выделяли из молодых листьев апикальной части побегов методом СТАВ [12].

Обсуждение результатов. В работе нами было апробировано использование мультиплексной ПЦР. Мультиплексные наборы позволяют оптимизировать время, затрачиваемое на ДНК-анализ, и значительно снизить стоимость его проведения. SSR-маркеры были объединены в наборы с учетом диапазонов длин амплифицируемых фрагментов по конкретным локусам, согласно литературным данным, и температуры отжига праймерных пар, с использованием различных флуоресцентных красителей в одном наборе. Генотипирование сортов проводилось следующими маркерными парами: VVS2 + VVMD7; VVMD27 + VVMD5; VrZAG62 + VrZAG79. Оптимальные сочетания SSR-маркеров позволили получить точно интерпретируемые результаты в ходе фрагментного анализа продуктов ПЦР.

В результате проведенного анализа получены ДНК-профили 14 дагестанских сортов по шести основным для генотипирования *Vitis vinifera* микросателлитным локусам (табл.). Все генотипы имеют в своем профиле сортоспецифичную комбинацию аллелей.

Наибольший полиморфизм при изучении данной группы дагестанских сортов выявлен по локусу VVMD27: идентифицировано 9 аллелей на локус; наименьший – по локусу VrZAG62: 5 аллелей/локус. В локусах VVS2 и VrZAG79 определено по 8 видов аллелей на локус, в VVMD5 и VVMD7 – 7 аллелей/локус.

В каждом из шести изучаемых локусов выявлены и редкие аллели в исследуемой выборке сортов. Так, по локусу VVS2 в генотипе сорта Риш баба идентифицирована аллель размером 150 пар нуклеотидов, в сорте Джунга – 146 п.н., Хоп халат – 132 п.н., в остальных дагестанских сортах аллели таких размеров в локусе VVS2 не были выявлены.

По локусу VVMD7 единичные аллели в данной группе сортов определены в сортах винограда Дубут и Асыл кара – 263 и 244 п.н., соответственно. По локусу VVMD5 как редкие определены аллели в сорте

винограда Риш баба – 226 п.н. и в сорте Баят капы – 244 п.н. По локусу VVMD27 – единичные аллели определены в сорте Гимра – 179 п.н.

ДНК-профили изученных сортов винограда

Сорт	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	244	181	189	236	240	188	196	244	246
Гуляби дагестанский	134	136	242	252	183	196	232	238	188	200	258	260
Шавраны	134	142	248	252	181	194	238	238	196	200	252	260
Дубут	134	144	242	262	181	194	230	236	188	196	252	260
Риш баба	138	150	252	252	181	185	226	236	196	204	252	260
Гимра	136	144	246	246	179	181	236	238	196	200	252	260
Джунга	134	146	246	248	189	192	236	242	202	204	238	262
Хоп халат	132	142	242	250	181	192	238	242	202	204	240	246
Хоца цибил	134	142	242	246	189	189	242	242	200	204	244	244
Баят капы	134	144	242	246	183	183	238	244	188	204	260	260
Хатал баар	142	144	242	248	189	192	242	242	202	202	240	244
Мола гусейн цибил	134	144	248	252	181	185	238	242	200	202	252	260
Тавлинский поздний	142	142	242	248	181	192	238	242	202	202	240	260
Асыл кара	134	144	244	250	181	189	236	242	202	204	238	260
Сарах	136	142	250	250	181	194	236	238	200	200	258	260

* – Сорта-контроли

По локусу VrZAG79 в генотипе сорта Джунга определена аллель размером 262 п.н. и в Хоп халат – 246 п.н. Данные аллели не выявлены в генотипах остальных проанализированных дагестанских сортов.

Заключение. В результате проведенной работы получены ДНК-профили 14 аборигенных дагестанских сортов винограда. Апробирован и результативно применен мультиплексный SSR-анализ.

Показана информативность набора микросателлитных маркеров VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 и VrZAG79 для фингерпринтинга проанализированной выборки сортов винограда.

Изучение методом SSR-анализа стародавних сортов винограда Дагестана будет продолжено, расширение выборки позволит сделать выводы о генетическом полиморфизме данной группы и определить генотипы с редкими аллелями.

Литература

1. Bowers J. E., Boursiquot J. M., This P., Chu K., Johansson H., Meredith C.P. Historical genetics: the parentage of Chardonnay, Gamay, and other wine grapes of northeastern France // *Science*.- 1999. – V. 285. - P. 1562-1565.
2. Bowers J. E., Meredith C. P. The parentage of a classic wine grape: Cabernet Sauvignon // *Nat. Genet.* – 1996. – V. 16. – P. 84-87.
3. Di Vecchi Staraz M., Bandinelli R., Borselli M., This P. et al. Genetic structuring and parentage analysis for evolutionary studies in grapevine: kin group and origin of the cultivar Sangiovese revealed // *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* – 2007. – V. 132. – P. 514-524.
4. Vouillamoz J., Maigre D., Meredith C. P. Microsatellite analysis of ancient alpine grape cultivars: pedigree reconstruction of *Vitis vinifera* L. Cornalin du Valais. // *Theor. Appl. Genet.* – 2003. – V. 107. – P. 448-454.
5. Sefc K. M., Lopes M. S., Lefort F., Botta R. et al. Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars // *Theor. Appl. Genet.* – 2000. – V. 100. – P. 498-505.
6. 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>.
7. Ильницкая, Е.Т. изучение полиморфизма SSR-локусов южнороссийских аборигенных сортов винограда / Е.Т. Ильницкая, С.В. Токмаков // *Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]*. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2014. – № 27(3). – С. 1-6. – Режим доступа: <http://www.journal.kubansad.ru/pdf/14/03/01.pdf>.
8. Cipriani G., Frazza G., Peterlunger E., Testolin R. Grapevine fingerprinting using microsatellite repeats // *Vitis*. – 1994. – V. 33. – P. 211-215.
9. This P., Jung A., Voccacci 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.

10. Stajneri N., Korosec-Korusa Z., Rusjan D., Javornic B. Microsatellite genotyping of old Slovenian grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.) of the Primorje (coastal) winegrowing region // *Vitis*.- 2008.- V. 47.- № 4.- P. 201–204.

11. Boz Y., Bakir M., Çelikkol B.P., Kazan K. et al. Genetic characterization of grape (*Vitis vinifera* L.) germplasm from Southeast Anatolia by SSR markers // *Vitis*. – 2011. - V. 50.- № 3.- P. 99-106.

12. 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. Bowers J. E., Boursiquot J. M., This P., Chu K., Johansson H., Meredith C. P. Historical genetics: the parentage of Chardonnay, Gamay, and other wine grapes of northeastern France // *Science*.- 1999. – V. 285. - P. 1562-1565.

2. Bowers J. E., Meredith C. P. The parentage of a classic wine grape: Cabernet Sauvignon // *Nat. Genet*. – 1996. – V. 16. – P. 84-87.

3. Di Vecchi Staraz M., Bandinelli R., Borselli M., This P. et al. Genetic structuring and parentage analysis for evolutionary studies in grapevine: kin group and origin of the cultivar Sangiovese revealed // *J. Am. Soc. Hortic. Sci*. – 2007. – V. 132. – P. 514-524.

4. Vouillamoz J., Maigre D., Meredith C. P. Microsatellite analysis of ancient alpine grape cultivars: pedigree reconstruction of *Vitis vinifera* L. Cornalin du Valais. // *Theor. Appl. Genet*. – 2003. – V. 107. – P. 448-454.

5. Sefc K. M., Lopes M. S., Lefort F., Botta R. et al. Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars // *Theor. Appl. Genet*. – 2000. – V. 100. – P. 498-505.

6. 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://www.journal.kubansad.ru/pdf/13/03/01.pdf>.

7. Il'nitskaya, E.T. izuchenie polimorfizma SSR-lokusov yuzhnorossiyskikh aborigennykh sortov vinograda / E.T. Il'nitskaya, S.V. Tokmakov // *Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii [Elektronnyj resurs]*. – Krasnodar: SKZNIISiV, 2014. – № 27(3). – S. 1-6. – Rezhim dostupa: <http://www.journal.kubansad.ru/pdf/14/03/01.pdf>.

8. Cipriani G., Frazza G., Peterlunger E., Testolin R. Grapevine fingerprinting using microsatellite repeats // *Vitis*. – 1994. – V. 33. – P. 211-215.

9. 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.

10. Stajneri N., Korosec-Korusa Z., Rusjan D., Javornic B. Microsatellite genotyping of old Slovenian grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.) of the Primorje (coastal) winegrowing region // *Vitis*.- 2008.- V. 47.- № 4.- P. 201–204.

11. Boz Y., Bakir M., Çelikkol B.P., Kazan K. et al. Genetic characterization of grape (*Vitis vinifera* L.) germplasm from Southeast Anatolia by SSR markers // *Vitis*. – 2011. - V. 50.- № 3.- P. 99-106.

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