

УДК 575:577.2:576.3

МИКРОСАТЕЛЛИТНОЕ ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ДОНСКИХ АБОРИГЕННЫХ СОРТОВ ВИНОГРАДА (*VITIS VINIFERA* L.)

© 2014 г. Е.Т. Ильницкая, С.В. Токмаков, И.И. Супрун

Государственное научное учреждение
Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт
садоводства и виноградарства Россельхозакадемии, Краснодар, Россия,
e-mail: kubansad@kubannet.ru; ilnitskaya79@mail.ru

Поступила в редакцию 19 июня 2014 г. Принята к публикации 22 августа 2014 г.

Местные аборигенные сорта – важная часть генофонда винограда. Получены ДНК-профили 11 аборигенных донских сортов винограда по микросателлитным локусам VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 и VrZAG79. Указанные SSR-маркеры рекомендованы союзом генетиков винограда как основные для генотипирования *Vitis vinifera*. В качестве референсных сортов в данной работе использованы Шардоне и Каберне-Совиньон. Маркеры были объединены в мультиплексные наборы, позволяющие анализировать по два локуса одновременно. Количество выявленных аллелей по локусам варьировало от 5 (VVS2, VMD7) до 11 (VVMD5) на локус в исследуемой выборке донских сортов винограда. Изученные сорта винограда обладают различными наборами аллельных комбинаций по проанализированным локусам. Кластерный анализ, проведенный по результатам генотипирования, показал, что наиболее генетически близки друг другу сорта Сибирьковский и Пухляковский белый.

Ключевые слова: *Vitis vinifera*, аборигенные сорта, генотипирование, SSR-маркеры.

ВВЕДЕНИЕ

Аборигенные стародавние сорта различных регионов возделывания винограда, как и дикие формы – ценная часть мирового генофонда культуры. В последнее десятилетие наиболее актуальным стало изучение местных сортов на молекулярно-генетическом уровне. Исследования на уровне ДНК являются наиболее информативным методом анализа генотипов растений. В работах по изучению генетического разнообразия, идентификации сортов наиболее распространенными являются маркерные системы, основанные на вариабельности микросателлитных участков ДНК. Микросателлиты (SSR – simple sequence repeats) – тандемные повторы простых последовательностей в структуре ДНК, источник полиморфизма которых – сайт-специфическое варьирование длины повтора, что, в свою очередь, обусловлено различием в числе единиц повтора (Schlotterer, Soller,

1997). Микросателлитные последовательности распространены повсеместно в геноме высших растений. Преимущества SSR-маркеров – кодоминантный тип наследования, высокая дифференцирующая способность, воспроизводимость результатов.

На современном этапе науки ДНК-профили сортов дополняют традиционное ампелографическое описание и агробиологические характеристики, позволяя точно идентифицировать сорта, изучать их происхождение, выявлять синонимы и примеси в коллекциях.

Исследования биологического разнообразия виноградных лоз регионов Кавказа и Причерноморья (северных ареалов Черного моря) особо значимы в рамках проблемы «эрозии генов» и широко признаны в мире в силу их огромного значения как первичного центра происхождения евразийского культурного винограда (Турок и др., 2006). Так, при исследовании генплазмы болгарского винограда был изучен полимор-

физм ядерных и хлоропластных микросателлитных локусов у 51 образца дикорастущего винограда различных регионов Болгарии и 19 местных стародавних сортов (Dzhambazova *et al.*, 2009). В результате работы были выявлены аллели, ранее не описанные по изучаемым локусам. Генотипирование 33 стародавних сортов Словении по 21 микросателлитному локусу выявило несколько сортов-синонимов и при этом не подтвердило ранее предполагаемое близкое родство с некоторыми сортами винограда из соседних стран (Stajneri *et al.*, 2008).

Юг России – Краснодарский край, Ростовская область, Дагестан – основная зона виноградарства Российской Федерации. Многие аборигенные донские сорта представляют значительную ценность как для возделывания, так и для использования в селекционной работе. Одицавшие лозы на правобережье Дона могут свидетельствовать о том, что такое многообразие сортов и форм винограда с ягодами, разнообразными по величине, окраске, вкусовым качествам, могло возникнуть только в результате его возделывания в течение многих сотен лет (Алиев и др., 2005). Таким образом, изучение разнообразия стародавних донских сортов на молекулярно-генетическом уровне представляет особый интерес.

Целью работы являлось изучение полиморфизма микросателлитных локусов аборигенных донских сортов винограда *Vitis vinifera*, определение степени генетического сходства указанных сортов и составление SSR-фингерпринтов изученных генотипов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы аборигенные сорта винограда Дона: Варюшкин, Бессергеновский 1, Красностоп золотовский, Кумшацкий белый, Сибирьковский, Сыпун черный, Цимладар, Пухляковский белый, Махроватчик, Плечистик, Кизилловый, включенные в российскую ампелографическую коллекцию в г. Анапе. ДНК выделяли из молодых листьев апикальной части побегов 4–5 типичных кустов сорта методом СТАВ (Rogers, Bendich, 1985).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили согласно стандартной процедуре (Шибата, 1999). Разделение продуктов ПЦР

проводили методом электрофореза в агарозном 2 %-м геле (при оптимизации параметров ПЦР) и с использованием автоматического генетического анализатора ABI Prism 3130. Анализировали продукты ПЦР и рассчитывали размер фрагментов с помощью компьютерных программ Gene Mapper и Peak Scanner. В исследовании были задействованы микросателлитные маркеры, рекомендованные для молекулярно-генетической паспортизации генотипов *Vitis vinifera* Европейской базой данных и проектом GrapeGen06: VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 и VrZAG79 (This *et al.*, 2004). В качестве контрольных (референсных) сортов в работе использованы Шардоне и Каберне-Совиньон, аллельный состав которых по изучаемым SSR-локусам известен (This *et al.*, 2004), что дает возможность анализировать получаемые результаты и сопоставлять данные по генотипированию винограда из различных лабораторий.

При оценке результатов микросателлитного анализа матрица генетических дистанций была построена с использованием коэффициентов (индексов) подобия по М. Nei и W. Li (1979). Кластерный анализ выполнен методом попарного невзвешенного кластирования с арифметическим усреднением (UPGMA) и методом ближайших соседей (NJ) с использованием FreeTree Application 0.9.1.50 (ZDAT v.o.s.). Дендрограмма была построена в программе TreeView (Win32) 1.6.6. Фактическая и ожидаемая гетерозиготность, эффективное число аллелей рассчитаны в соответствии с работой Martines с соавт. (2006) с использованием программы GenAlEx 6.3.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении генотипирования SSR-маркеры были объединены в мультиплексные наборы с учетом диапазонов длин амплифицируемых фрагментов по конкретным локусам, согласно литературным данным, и температуры отжига праймерных пар, при использовании различных флуоресцентных красителей в одном наборе. Мультиплексные наборы позволяют оптимизировать процедуру генотипирования и значительно снизить стоимость его проведения.

Генотипирование сортов проводилось следующими маркерными парами: VVS2 + VVMD7;

VVMD27 + VVMD5; VrZAG62 + VrZAG79. В ходе фрагментного анализа продуктов ПЦР оптимальные сочетания SSR-маркеров позволили получить точно интерпретируемые результаты. На рис. 1 в качестве примера представлен результат анализа ДНК сорта Кизилловый по SSR-локусам VVS2 и VVMD7. Наличие двух

пиков по каждому маркеру говорит о гетерозиготности изучаемого образца по данным локусам.

В табл. 1 представлены результаты генотипирования 11 донских аборигенных сортов винограда по шести микросателлитным локусам, рекомендованным в качестве основных

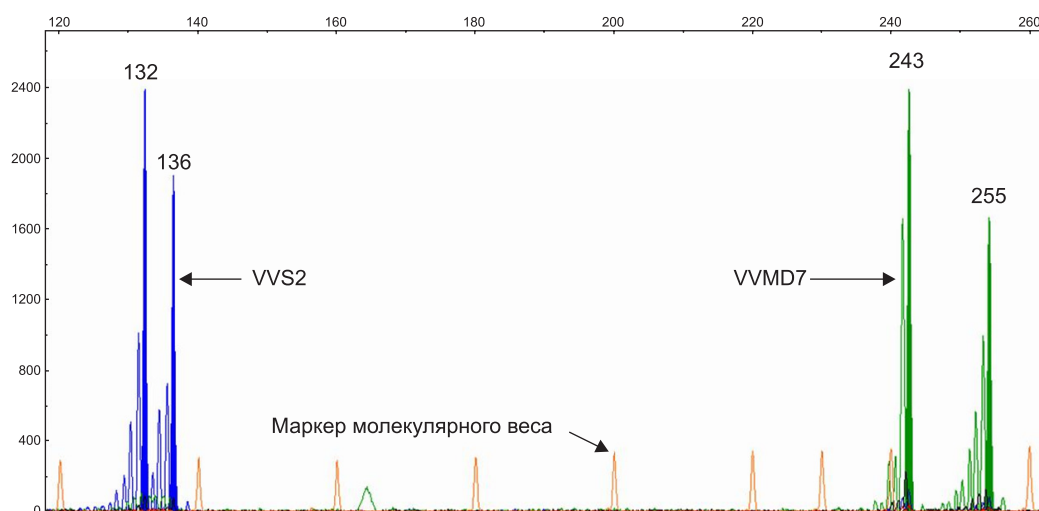


Рис. 1. Результат фрагментного анализа продуктов мультиплексной ПЦР сорта Кизилловый с SSR-маркерами VVS2 и VVMD7.

Таблица 1

Микросателлитные ДНК-профили 11 аборигенных донских сортов винограда

Сорта	Размеры аллелей 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
Донские сорта												
Бессергеновский 1	142	144	243	253	183	185	238	242	188	200	240	252
Варюшкин	132	142	249	249	187	196	240	242	198	204	254	254
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
Кизилловый	132	136	243	255	179	187	238	248	188	200	252	252
Кумшацкий белый	134	144	243	253	191	198	234	246	190	202	254	254
Красностоп золотовский	132	144	243	243	191	191	226	250	190	198	246	258
Сибирьковский	132	142	243	243	181	183	232	242	190	190	254	262
Сыпун черный	142	144	243	251	196	196	236	250	196	206	252	260
Цимладар	136	144	243	249	191	198	242	246	190	204	254	254

для генотипирования *V. vinifera*. Вид *V. vinifera* в целом и, соответственно, сорта винограда обладают диплоидным набором хромосом (за редким исключением) и перекрестным типом опыления. Этим объясняется то, что по большинству локусов изученные образцы гетерозиготны. Но все сорта, кроме Бессергеновского 1, гомозиготны хотя бы по одному SSR-локусу (например сорт Варюшкин – по локусу VrZAG79, Махроватчик – по VVS2, Сибирьковский – по локусам VVMD7 и VrZAG62 и т. д.), что видно из табл. 1.

Изученные сорта обладают различными наборами аллельных комбинаций: все исследуемые генотипы показали как минимум одну сортоспецифичную комбинацию аллелей.

Количество выявленных аллелей (Na) по изученным SSR-локусам варьировало от 5 (VVS2, VMD7) до 11 (VVMD5), в среднем 8 аллелей/локус (табл. 2). Функцией от доли полиморфных локусов, числа аллелей на локус и выравнимости частот аллелей является эффективное число аллелей (Ne) и, таким образом, оно является мерой генетического разнообразия. Эффективное число аллелей оценивает величину, обратную гомозиготности, и представляет собой такое число аллелей, при одинаковой частоте которых гетерозиготность будет равна фактической (Kimura, Crow, 1964; Девятова и др., 2011). Среднее значение Ne – 5,282. Ожидаемая гетерозиготность варьировала в небольшом диапазоне: от 0,645 (VVMD7) до 0,872 (VVMD27). Фактическая гетерозиготность определена как 1,00 по VVMD5 и 0,91 по VVS2, что указывает на высокий уровень генетической полиморфности данных локусов внутри изученной группы сортов. Среднее значение фактической гетерозиготности (0,788) было немного выше ожидаемой (0,783).

Частота встречаемости различных аллелей 6 микросателлитных локусов в исследуемой выборке варьировала от 5 до 54 % (рис. 2).

Таблица 2

Характеристика аборигенных сортов по микросателлитным локусам

SSR-локус	Na	Ne	Ho	He
VVS2	5	3,723	0,909	0,731
VVMD7	5	2,814	0,636	0,645
VVMD27	10	7,806	0,818	0,872
VVMD5	11	7,333	1,000	0,864
VrZAG62	9	6,050	0,818	0,835
VrZAG79	8	3,967	0,545	0,748
Среднее	8	5,282	0,788	0,783

Примечание. Na – общее число идентифицированных аллелей; Ne – эффективное число аллелей; Ho – фактическая гетерозиготность; He – ожидаемая гетерозиготность.

В изученной группе сортов Дона как редкие выделены аллели по локусу VVMD27 в сортах Плечистик, Бессергеновский 1, Кизилый и Махроватчик: 194, 185, 179 и 189 п.н. соответственно. Однако аллель 189 присутствует в обоих референсных сортах. По локусу VVMD5 в генотипах изученных донских сортов определили два аллеля, не обнаруженные ни в контрольных сортах, ни в других изученных донских – 226 и 232 п.н. в сортах Красностоп золотовский и Сибирьковский соответственно. Маркер VVS2 выявил аллель 134 п.н. только в сорте Кумшацкий белый. По локусу VVMD7 в сорте Кизилый определен аллель 255 п.н., не встречающийся в других анализируемых сортах. В сортах Кумшацкий белый и Сыпун черный – по локусу VrZAG62 выделены аллели 202 и 206 п.н. соответственно. По локусу VrZAG79 аллели 240, 258 и 260 п.н. определены в изученной выборке только в сортах Бессергеновский 1, Красностоп золотовский и Сыпун черный.

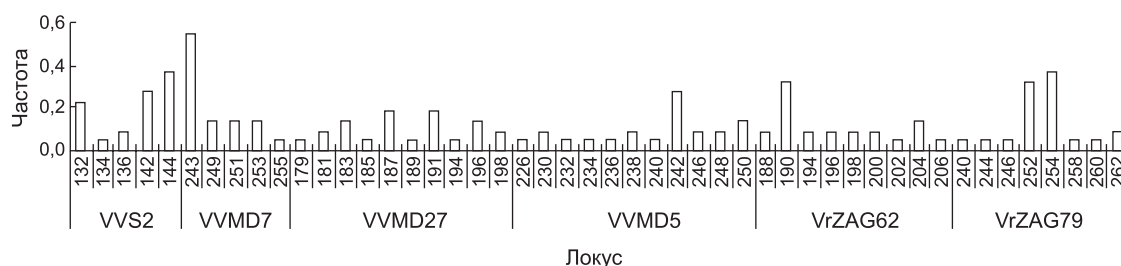


Рис. 2. Частота встречаемости выявленных аллелей.

Кластерный анализ матрицы генетических дистанций, созданной на основе выявленных значений аллелей исследуемых сортов по 6 микросателлитным локусам, разделил в две отдельные группы аборигенные сорта Дона и классические французские сорта винограда, используемые в качестве контроля (рис. 3). В выборке донских сортов обозначилось два кластера: один включает в себя сорта Кизилловый, Бессергеновский 1, Сыпун черный, Махроватчик, Плечистик; второй – Красностоп золотовский, Кумшацкий белый, Цимладар, Варюшкин, Пухляковский белый, Сибирьковский. Дендрограммы, сформированные по результатам анализа данных методами UPGMA и NJ, получились идентичными, отличались только длиной ветвей.

Сорт Сибирьковский на основании морфологических, ампелографических исследований принято считать естественным сеянцем сорта Пухляковский белый (Алиев и др., 2006). В

результате микросателлитного анализа исследуемой группы сортов именно эти два сорта оказались наиболее «близки» друг другу, различаясь только по одному аллелю локуса VVMD5. Так, в сорте Сибирьковский определены аллели размером 232–242 п.н., а в Пухляковском белом – 242–250 п.н. Таким образом, микросателлитный анализ подтверждает генетическую близость данных сортов и предположение о происхождении сорта Сибирьковский.

В результате работы получены ДНК-профили 11 аборигенных донских сортов винограда. Апробирован и результативно применен мультиплексный SSR-анализ. Показана информативность набора микросателлитных маркеров VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 и VrZAG79 для генотипирования донских сортов винограда. Наибольший полиморфизм в изученной выборке сортов выявлен по локусу VVMD5 – определено 11 аллелей. В среднем определено 8 аллелей на локус, что сопоставимо с данными

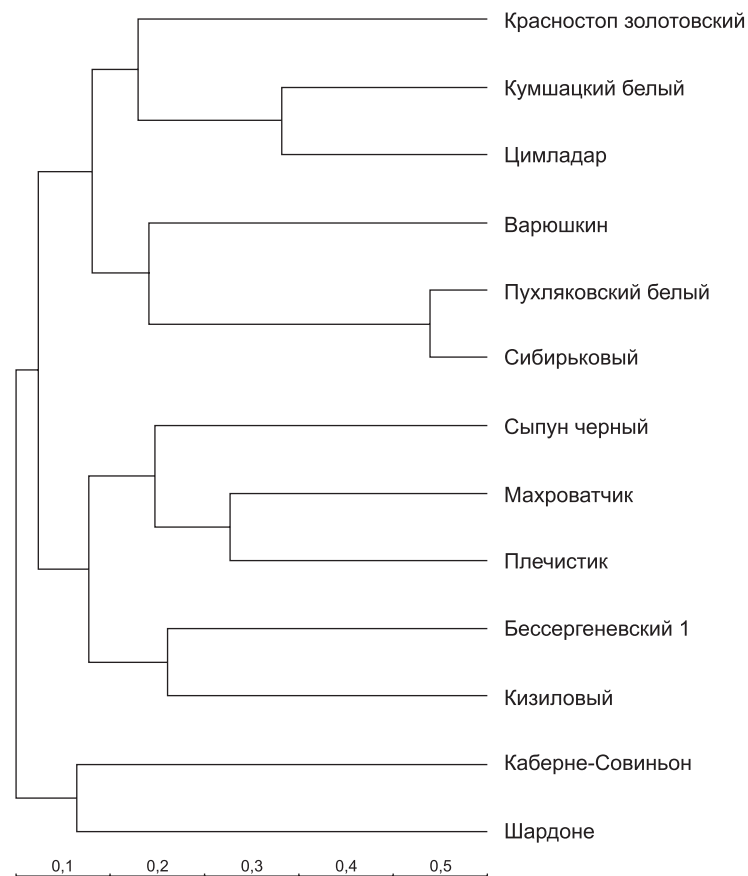


Рис. 3. Дендрограмма генетического сходства донских аборигенных сортов винограда по методу UPGMA.

Bowers с соавт. (1996) в работе на традиционных европейских винных и столовых сортах (в среднем 7,5 аллелей/локус), а также с исследованиями Stajneri с соавт. (2008) 32 стародавних сортов винограда Словении (8 аллелей/локус). При изучении испанских сортов I.P. Martin с соавт. (2003) и J. Ibanez с соавт. (2003) определили 9–13 и 4–16 аллелей/локус соответственно. В работе L.E. Martinez с соавт. (2006) с 25 сортами *V. vinifera* из Перу и Аргентины также получены более высокие значения: 6–13, в среднем 9,67 аллелей/локус. Увеличение выборки стародавних донских сортов, возможно, позволит выявить большее разнообразие аллелей в исследуемых локусах. Идентификация генотипов аборигенных южнороссийских сортов винограда будет продолжена: планируется расширить количество изучаемых генотипов, при необходимости – увеличить число SSR-маркеров.

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

ЛИТЕРАТУРА

- Алиев А.М., Кравченко Л.В., Наумова Л.Г. Происхождение донских сортов винограда // Виноделие и виноградарство. 2005. № 3. С. 36–37.
- Алиев А.М., Кравченко Л.В., Наумова Л.Г., Ганич В.А. Донские аборигенные сорта винограда. Новочеркасск: Изд-во ЮРГТУ, 2006. 84 с.
- Девятова Н.М., Бельтюкова Н.Н., Назаров А.В. Анализ генетического разнообразия *Poa pratensis* L. в условиях нефтяного загрязнения почв с использованием IRAP-маркеров // Аграрн. вестн. Урала. 2011. № 1. С. 18–20.
- Турок Й., Маградзе Д.Н., Трошин Л.П. Сохранение генотипа евразийского винограда – первостепенная проблема европейских ампелографов // Науч. журн. КубГАУ [Электронный ресурс]. Краснодар: КубГАУ, 2006. № 01 (17). Режим доступа: <http://www.ej.kubagro.ru/2006/01/19/>
- Шибата Д.К. Полимеразная цепная реакция и молекулярно-генетический анализ биоптатов // Молекуляр. клинич. диагностика. М.: Мир, 1999. С. 395–427.
- Bowers J.E., Dangi G.S., Vignani R., Meredith C.P. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.) // Genome. 1996. V. 39. P. 628–633.
- Dzhambazova T., Tsvetkov I., Atanasov I. *et al.* Genetic diversity in native Bulgarian grapevine germplasm (*Vitis vinifera* L.) based on nuclear and chloroplast microsatellite polymorphisms // Vitis. 2009. V. 48. No. 3. P. 115–121.
- Ibanez J., Andres M.T., Molino A., Borrego J. Genetic study of key Spanish grapevine varieties using microsatellites analysis // Am. J. Enol. Vitic. 2003. V. 54. P. 22–29.
- Kimura M., Crow J.F. The number of alleles that can be maintained in a finite population // Genetics (US). 1964. V. 49. P. 725–738.
- Martin J.P., Borrego J., Cabello F., Ortiz J.M. Characterization of Spanish grapevine cultivar diversity using sequence-tagged microsatellite site markers // Genome. 2003. V. 46. P. 10–18.
- Martinez L.E., Cavagnaro P.F., Masuelli R.W., Zuniga M. SSR-based assessment of genetic diversity in South American *Vitis vinifera* varieties // Plant Sci. 2006. V. 170. P. 1036–1044.
- Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 5269–5273.
- Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Mol. Biol. 1985. V. 19. No. 1. P. 69–76.
- Schlotterer C., Soller M. Polymorphism and locus-specific effects on polymorphism at microsatellite loci in natural *Drosophila melanogaster* populations // Genetics. 1997. V. 146. P. 309–320.
- 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. No. 4. P. 201–204.
- This P., Jung A., Boccacci P. *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.

MICROSATELLITE GENOTYPING OF DON LOCAL GRAPE (*VITIS VINIFERA* L.) VARIETIES

E.T. Ilnitskaya, S.V. Tokmakov, I.I. Suprun

North Caucasian Zonal Research Institute for Horticulture and Viticulture,
Russian Academy of Agricultural Sciences, Krasnodar, Russia,
e-mail: kubansad@kubannet.ru, ilnitskaya79@mail.ru

Summary

Local traditional varieties constitute an important portion of grape genetic resources. DNA profiles for microsatellite loci VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62, and VrZAG79 were obtained for 11 local grape cultivars grown in the Don region. These SSR-markers are recommended as basic for *Vitis vinifera* genotyping. Chardonnay and Cabernet Sauvignon were used as reference cultivars. The markers were combined in multiple sets for simultaneous evaluation of two loci. The total number of different alleles per locus varied from 5 (VVS2, VMD7) to 11 (VVMD5) within the Don cultivars analyzed. The cultivars possessed different sets of allele combinations for loci under study. The genotyping results were subject to cluster analysis. Sibir'kovyi and Pukhlyakovskiy belyi showed the greatest proximity to each other. Molecular studies of local southern Russia grape cultivars will be continued.

Key words: *Vitis vinifera*, local grape cultivars, SSR markers, genotyping.