

УДК 634.8:631.52:631.53:575

DOI 10.30679/2587-9847-2019-24-32-37

БАЗЫ ДАННЫХ АНАЛИЗА ДНК ДЛЯ ЦЕЛЕЙ СЕЛЕКЦИИ И ПИТОМНИКОВОДСТВА ВИНОГРАДА

Ильницкая Е.Т., канд. биол. наук, Макаркина М.В., аспирант,
Лободина Е.В., аспирант

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский
федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия»
(Краснодар)*

Реферат. ДНК-маркерные технологии всё шире привлекаются в процесс селекции, полезны они и для целей питомниководства. Базы данных ДНК-паспортов винограда могут быть эффективно использованы для определения чистосортности посадочного материала, уточнения родительских форм и в спорных вопросах авторства сорта. Данные о наличии генов устойчивости в генотипах винограда ценны при разработке селекционных программ.

Ключевые слова: ДНК-маркеры, генотипы винограда, SSR-профилирование

Summary. DNA-marker technologies are increasingly involved in the breeding process, they are also useful for the purposes of nursery. Databases of DNA passports of grapes can be effectively used to determine the purity of the planting material, clarify parental forms and in controversial issues of variety authorship. Data on the presence of resistance genes in grape genotypes are valuable for the development of breeding programs.

Key words: DNA markers, grape genotypes, SSR-profiling

Введение. Изучение и сохранение генетического разнообразия представляет собой одну из наиболее важных фундаментальных научных проблем в генетике культурных растений. Это обусловлено как необходимостью повышения эффективности использования генетических ресурсов и обеспечения устойчивого производства сельскохозяйственной продукции за счёт создания новых высокопродуктивных сортов, обладающих комплексной устойчивостью к стрессовым факторам среды, так и актуальностью исследований, направленных на изучение филогенетических аспектов и выяснение микроэволюционных путей формирования разнообразия.

В настоящее время наиболее эффективными методами для изучения генетического разнообразия, выяснения филогенетических взаимосвязей на различных таксономических уровнях признаны методы, основанные на анализе полиморфизма первичной структуры ДНК. В работах по изучению генетического разнообразия и идентификации генотипов наиболее часто используют микросателлитные (SSR) маркеры, которые позволяют точно идентифицировать сорта, изучать их происхождение, выявлять синонимы, омонимы и примеси в коллекциях [1, 2].

Виноградная культура в мировом производстве – одна из доминирующих. Важнейшим условием увеличения валовых сборов и улучшения качества виноградно-винодельческой продукции является систематическое совершенствование сортового состава виноградников, что обеспечивается селекцией. В свою очередь, фундаментальной основой решения теоретических и прикладных задач селекции, в том числе и винограда, является генофонд культуры. По этой причине многие страны мира разработали и реализуют национальные программы по сохранению и использованию генетических ресурсов растений. Первым этапом изучения генофонда винограда является его апробация на идентичность. В период сбора и накопления генофонда это самая необходимая и важная работа. В настоящее время методы молекулярно-генетической идентификации генотипов винограда на основе SSR-полиморфизма признаны наиболее достоверными.

Ранние работы по микросателлитному генотипированию сортов винограда включали различные наборы SSR-маркеров, что зачастую затрудняло сопоставление результатов разных исследовательских центров. Исследованием Thisetal. (2004) были проведены обобщение и анализ данных различных лабораторий, выделено 6 наиболее информативных, полиморфных микросателлитных локусов, которые и были рекомендованы для изучения генотипов *Vitis vinifera* L. 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.) [3].

Так, SSR-маркеры VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 и VrZAG79 можно рассматривать как основной минимальный набор в работах по генотипированию сортов винограда. К настоящему времени количество маркеров для генотипирования, идентификации, дифференциации и классификации сортов винограда дополнено ещё тремя: VVMD25, VVMD28, VVMD32 [4].

Результаты SSR-генотипирования, как правило, оформляются в базы данных: традиционные ампелографические описания и агробиологические характеристики дополняют ДНК-профилями сортов. Наиболее крупная и известная База данных – Vitis International Variety Catalogue [5].

Объекты и методы исследований. Изучение генотипов проводится методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В работе используется метод ЦТАБ для выделения ДНК из молодых листьев типичных растений изучаемых сортов [6].

SSR-генотипирование нами проведено с использованием маркеров VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 и VrZAG79. В качестве контролей использовали ДНК сортов Шардоне и Каберне Совиньон. Идентификация аллельного состояния генов *Rpv3*, *Rpv10* и *Rpv12* в сортах винограда выполнено с помощью ДНК-маркеров, рекомендованных для детекции данных генов [7-9].

Амплификацию ДНК осуществляли прибором Eppendorf Master cycler gradient (Германия); разделение продуктов реакции – методом капиллярного электрофореза и оценка размера амплифицированных фрагментов – с использованием автоматического генетического анализатора ABI Prism 3130 и специального программного обеспечения GeneMapper и PeakScanner. В качестве контролей для уточнения размеров амплифицированных фрагментов в работе использовали ДНК сортов, которые несут исследуемые гены, согласно опубликованным данным.

Обсуждение результатов. Полученные формулы сорта (ДНК-паспорта) на практике могут быть эффективно использованы для определения чистосортности посадочного материала и насаждений винограда, уточнения родительских форм образца и в спорных вопросах авторства сорта. Например, в случае сомнений в родословной сорта, достаточно сравнить ДНК-профили предполагаемых родительских форм генотипа и микросателлитный профиль изучаемого сорта. Так, проведенный нами SSR-анализ ДНК растений сортов винограда подтверждает происхождение сорта Красностоп АЗОС от сортов Филлоксероустойчивый Джемете и Красностоп анапский [10]. В таблице в микросателлитном профиле генотипа Красностоп АЗОС подчеркнуты аллели, унаследованные от сорта Филлоксероустойчивый Джемете, обычным шрифтом представлены аллели от сорта Красностоп анапский. Показано полное соответствие ДНК-профиля Красностоп АЗОС генотипам родительских форм.

Микросателлитные ДНК-профили сортов винограда

Сорт	Аллели SSR-локусов, п.н.											
	VVS2		VVMD7		VVMD27		VVMD5		VrZAG62		VrZAG79	
Шардоне (контроль)	137	143	240	244	181	189	236	240	188	196	244	246
<i>Мускат гамбургский</i>	<i>135</i>	<i>149</i>	<i>248</i>	<i>250</i>	<i>179</i>	<i>185</i>	<i>234</i>	<i>240</i>	<i>186</i>	<i>192</i>	<i>240</i>	<i>256</i>
Достойный	<u>125</u>	133	<u>240</u>	<u>254</u>	<u>181</u>	189	224	<u>242</u>	188	<u>200</u>	244	<u>248</u>
<u>Ф/У Джемете</u>	<u>125</u>	<u>143</u>	<u>240</u>	<u>254</u>	<u>175</u>	<u>181</u>	<u>238</u>	<u>242</u>	<u>200</u>	<u>200</u>	<u>238</u>	<u>248</u>
Красностоп АЗОС	<u>125</u>	145	240	<u>254</u>	<u>175</u>	189	224	<u>238</u>	188	<u>200</u>	<u>238</u>	244
Красностоп анапский	133	145	240	266	189	189	224	248	188	196	244	256

Анализ генотипа сорта Достойный, напротив, показал, что происхождение этого сорта отличается от заявляемого [8]. В таблице аллели, унаследованные от сорта Филлоксероустойчивый Джемете выделены подчеркиванием в ДНК-профиле, таким образом подтверждается, что одной из родительских форм является Филлоксероустойчивый Джемете. Однако второй родительской формой никак не может быть сорт Мускат гамбургский. В генотипе сорта Достойный ни в одном из шести изученных SSR-локусов не выявлено аллелей, идентифицированных в генотипе сорта Мускат гамбургский (см. табл.). Таким образом, сорт Достойный является результатом скрещивания Филлоксероустойчивый Джемете с иным сортом, но не с Мускатом гамбургским.

Анализ генетического сходства на основе данных микростеллитного анализа позволяет определить наиболее близкие и отдаленные генотипы. Данная информация может быть полезна и при подборе родительских форм для гибридизации. Например, в случае набора схожих характеристик у возможных планируемых отцовских форм для гибридизации предпочтение следует отдать сорту с меньшим генетическим сходством с материнской формой.

Успех селекционной работы базируется на используемом исходном материале, генотипе культуры. Подбор родительских пар для планируемых скрещиваний на современном этапе развития науки необходимо проводить на основе агробиологических и хозяйственно ценных характеристик сортов, а также с использованием генетических данных. Так, одним из важнейших ресурсов для селекции является накопленная информация о наличии в том или ином генотипе хозяйственно ценных генов. Актуальная задача селекции – поиск генотипов – доноров устойчивости. Сорты *Vitis vinifera*, являясь основой высококачественного виноградарства, практически не обладают генетической устойчивостью ко многим болезням и вредителям винограда.

Одним из самых распространенных и вредоносных грибных заболеваний винограда является милдью. Патоген *Plasmopara viticola* Berl. Et de Toni развивается на всех зеленых органах виноградной лозы – листьях, побегах, соцветиях, ягодах, усиках. Генотипы, несущие гены устойчивости к милдью, принадлежат в основном к видам винограда Северной Америки и Азии (*V. aestivalis*, *V. berlandieri*, *V. cinerea*, *V. riparia*, *V. rupestris* и др.), а также *Muscadinia rotundifolia* [11, 12].

При использовании методов молекулярной генетики на сегодняшний день удалось определить более 20 локусов устойчивости к милдью в геноме винограда [3]. Одни из них имеют большой вклад в фенотипическое варьирование, другие относят к минорным локусам. Объединение нескольких генов в одном растении позволяет создать высокоустойчивый сорт. Первым этапом в этой работе является идентификация генотипов – носителей генов устойчивости.

Нами сформирована «База данных ДНК-маркерного анализа генов устойчивости к милдью в сортах винограда» (свидетельство на базу данных № 2019620547 от 09.04.2019, заявка от 25.03.2019 № 2019620396). В настоящее время в Базе данных представлен материал ДНК-маркерного анализа аллельного состояния генов *Rpv3*, *Rpv10*, *Rpv12* – наиболее значимых генов устойчивости к милдью согласно литературным данным [7-9]. Также в Базе содержится информация о происхождении сортов, информация представлена на русском и английском языках (рис.)

Гены *Rpv10* и *Rpv12* наследуются от *V. amurensis*, следовательно, могут быть обнаружены в сортах, имеющих в родословной дикий амурский виноград. Различные гибридные генотипы, имеющие в родословной *V. labrusca*, *V. rupestris*, *V. riparia* или *V. lincecumii*, могут обладать геном *Rpv3* и быть использованы в селекции в качестве доноров устойчивости к милдью.

Сорт (форма)	Cultivar (selection form)	Происхождение	Pedigree	UDV305	UDV737		
Армалага	Armalaga	Армлонг х Малага	Armlong x Malaga	321	334	271	312
Барт	Bart	Талисман (Фрумоаса алба) (Гузаль кара : Talisman (Frumoasa alba (Guzal kara x Seyv		299		279	
Болгария устойчивая	Bolgariya ustoychivaya	Сейв Виллар 20-473 х Болгария	Seyve Villard 20-473 x Bolgariya	299		279	295
Виктория	Victoria	(<i>Vitis vinifera</i> х <i>Vitis amurensis</i>) х Сейв F (<i>Vitis vinifera</i> х <i>Vitis amurensis</i>) х Сейв V		299		279	285
Декабрьский	Dekabrskiy	Корна нягра х Сейв Виллар 12-375	Korna niagra x Seyve Villard 12-375	299		279	285
Донус	Donus	Сейв Виллар 12-375 х Дружба [(Мускат Сейв Виллар 12-375 х Дружба [(Muscat g		299		279	
Дунавска гымза	Dunavska gymza	(Мавруд х Пино нуар) х Сейв Виллар 12	(Mavrud x Pinot noir) x Seyve Villard 12-37	299		279	293
Дунавски лазур	Dunavski lazur	Ркаштели х Сейв Виллар 12-375	Rkatsitely x Seyve Villard 12-375	299	326	279	295
Илья	Ilya	Восковой (Сейв Виллар 20-374 х Восток	Voskovoy (Seyve Villard 20-374 x Vostok	299		279	
Кшмиш 342	Kishmish 342	Сейв Виллар 12-375 х Перлетт	Seyve Villard 12-375 x Perlette	299	342	279	
Кодрянка	Kodryanka	Молдова х Маршалский	Moldova x Marshalskiy	299		279	285
Кристалл	Kristall	(<i>V. amurensis</i> х Чалочи лайош) х Сейв E (<i>V. amurensis</i> х Chaloci Layoshi) х Виллар		299		279	301
Кутузовский	Kutuzovskiy	Молдавский х Сейв Виллар 20-365	Moldavskiy x Seyve Villard 20-365	299		279	285
Леляной	Ledjanoy	Грушевский белый х Феникс	Grushevskiy beliy x Feniks	299		279	295
Матрешка	Matrioshka	Восковой (Сейв Виллар 20-374 х Восток	Voskovoy (Seyve Villard 20-374 x Vostok	299		279	
Мелоди	Melodi	Сейв Виллар 5-276 х Женева вайт 5 (Пин Сейв Виллар 5-276 х Женева вайт 5 (Pinc		0		271	
Мускат летний	Muscat letniy	Сейв Виллар 20-366 х Королева виноград	Seyve Villard 20-366 x Koroleva vinnogradni	299		279	285
Надежда АЗОС	Nadezhda AZOS	Молдова х Кардинал	Moldova x Kardinal	299		279	285
Ноа	Noah	<i>V. riparia</i> х <i>V. labrusca</i>	<i>V. riparia</i> x <i>V. labrusca</i>	321	0	271	312
Оригинал	Original	Дамасская роза х Сейв Виллар 20-365	Damasskaya roza x Seyve Villard 20-365	299	322	279	
Платовский	Platovskiy	Зала дендь (Сейв Виллар 12-375 х Жемч	Zala den'dy (Seyve Villard 12-375 x Zsal	299		279	
Подарок Магарача	Podarok Magaracha	Ркаштели х Магарач 2-57-72	Rkatsitely x Magarach 2-57-72	321		297	312
Полюкс	Polyuks	Оберлен 595 (<i>V. riparia</i> х Гаме черный) Oberlen 595 (<i>V. riparia</i> х Game chorniy) х		229	321	312	
Престиж	Prestizh	Дружба х Феникс	Druzhiba x Feniks	299		279	295
Ротфор	Roshfor	Талисман х Кардинал + смесь пыльцы	Talisman x Kardinal + pollen mix	299	342	279	285
Русбол	Rusbol	Сейв Виллар 12-375 х Сверхранний бещ	Seyve Villard 12-375 x Sverkhran'niy bessen	299		279	
Сейв Виллар 12-375	Seyve Villard 12-375	Зейбель 6468 х Зейбель 6905	Seibel 6468 x Seibel 6905	299	361	279	299
Слабоплодный	Slaboplotnyy	Джаштели х Сейв Виллар 12-375	Dzhashtely x Seyve Villard 12-375	300	326	270	305

Рис. Элементы Базы данных ДНК-маркерного анализа генов устойчивости к милдью в сортах винограда

Ген *Rpv3* имеет несколько гаплотипов устойчивости: *Rpv3*²⁹⁹⁻²⁷⁹ (наследуется от *V. rupestris*), *Rpv3*^{null-297} (*V. rupestris* или *V. lincecumii*), *Rpv3*³²¹⁻³¹² (*V. labrusca* или *V. riparia*), *Rpv3*^{null-271} (*V. labrusca* или *V. riparia*), *Rpv3*³⁶¹⁻²⁹⁹ (*V. rupestris*), *Rpv3*²⁹⁹⁻³¹⁴ (*V. rupestris*), *Rpv3*^{null-287} (*V. rupestris* или *V. labrusca*). Гаплотипы расположены в одном локусе, поэтому методами традиционной селекции в одном генотипе не могут быть объединены более, чем два типа гаплотипов устойчивости. Однако, используя ДНК-маркерную селекцию, можно провести программу скрещиваний по объединению в одном генотипе, например, трёх генов устойчивости *Rpv3*, *Rpv10*, *Rpv12*.

Выводы. Базы данных ДНК-маркерного анализа генотипов винограда перспективны для использования в работе питомниководческих и селекционных центров. Так, данные о ДНК-паспортах сортов успешно могут быть использованы для определения чистосортности посадочного материала и соответствия его заявленному сорту. Для селекционных центров особую значимость имеют Базы данных наличия ценных генов в различных сортах и формах винограда. В идеале Базы данных различных коллекций винограда должны содержать в себе информацию о агробиологических свойствах сортов, их ампелографические описания и данные молекулярно-генетической оценки.

Литература

1. Лукьянов А.А., Большаков В.А., Ильницкая Е.Т. Создание базы данных и ДНК-паспортизация сортов Анапской ампелографической коллекции [Электронный ресурс] // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2018. № 51(3). С. 50-59. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/18/03/05.pdf>. DOI: 10.30679/2219-5335-2018-3-51-50-59 (дата обращения: 20.08.2019).
2. Казахмедов Р.Э., Мамедова С.М., Ильницкая Е.Т. Фенотипическая и генетическая характеристики нового технического сорта винограда Фиолетта дагестанской селекции [Электронный ресурс] // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2018. № 51(3). С. 79-88. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/18/03/08.pdf>. DOI: 10.30679/2219-5335-2018-3-51-79-88 (дата обращения: 20.08.2019).
3. This P., Jung A., Voccacci P., Borrego J., Botta R., Costantini L., Maul E. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars // Theor. Appl. Genet. 2004. Vol. 109. P. 1448-1458.
4. This P. Microsatellite markers analysis // Minutes of the First Grape Gen06 Workshop March 22nd and 23rd, INRA, Versailles (France). 2007. P. 3-42.
5. International Variety Catalogue VIVC // Julius Kuhn-Institut. – Режим доступа: <http://www.vivc.de>.
6. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Mol. Biol. 1985. Vol. 19 (1). P. 69-76.
7. Di Gaspero G., Copetti D., Coleman C., Castellarin S.D., Eibach R., Kozma P., Lacombe T., Gambetta G., Zvyagin A., Cindrić P., Kovács L., Morgante M., Testolin R. Selective sweep at the *Rpv3* locus during grapevine breeding for downy mildew resistance. Theor. Appl. Genet. 2012. Vol. 124. P. 227-286. DOI 10.1007/s00122-0111703-8.
8. Schwander F., Eibach R., Fechter I., Hausmann L., Zyprian E., Töpfer R. *Rpv10*: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine // Theor. Appl. Genet. 2012. Vol. 124 (1). P. 163-176. DOI 10.1007/s00122-011-1695-4.
9. Alleweldt G., Possingham J.V. Progress in grapevine breeding // Theor. Appl. Genet. 1988. Vol. 75. P. 669-673.
10. Ильницкая Е.Т., Токмаков С.В., Кайдышева Г.А. Микросателлитное профилирование в изучении происхождения некоторых сортов винограда отечественной селекции // Проблемы и перспективы современной науки: сборник статей ЦНС «Международные научные исследования» по материалам VII международной научно-практической конференции. Часть 2. Москва: «ISI-journal», 2016. С. 77-80.
11. Wan Y., Schwaninger H., He P., Wang Y. Comparison of resistance to powdery mildew and downy mildew in Chinese wild grapes // Vitis. 2007. Vol. 46. P. 132-136.
12. Venuti S., Copetti D., Foria S., Falginella L., Hoffmann S., Bellin D., Di Gaspero G. Historical introgression of the downy mildew resistance gene *Rpv12* from the Asian species *Vitis amurensis* into grapevine varieties // PLoS ONE. 2013. Vol. 8(4). P. 1-7. DOI 10.1371/journal.pone.0061228.