

ПОДТВЕРЖДЕНИЕ РОДОСЛОВНОЙ СОРТА ВИНОГРАДА «ГРАНАТОВЫЙ» МЕТОДОМ SSR-ПРОФИЛИРОВАНИЯ

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

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

Васильева О.Ю., магистрант

*ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»,
(Краснодар)*

Реферат. Данные ДНК-паспортов винограда могут быть эффективно использованы для определения чистосортности посадочного материала, уточнения родительских форм и в спорных вопросах авторства сорта. Выполнено ДНК-профилерование винограда сорта «Гранатовый» и подтверждено его происхождение по данным ДНК-анализа.

Ключевые слова: виноград, ДНК-маркеры, происхождение сорта, ДНК-паспорт, SSR-локус

Summary. The data of grape DNA passports can be effectively used to determine the purity of planting material, clarify parental forms and in controversial issues of variety authorship. DNA profiling of the «Granatovy» grape variety was carried out and its origin was confirmed according to DNA analysis.

Key words: grapes, DNA-markers, variety's origin, DNA-passport, SSR-loci

Введение. Виноград (*Vitis L.*) используется во всем мире для производства винодельческой продукции и непосредственно употребления в пищу. Сорта винограда очень разнообразны, их традиционно описывают и идентифицируют стандартными ампелографическими дескрипторами. Ещё в 1873 году в Вене был создан Международный комитет по ампелографии, который подготовил первые международные стандарты для классификации виноградных лоз по морфологическим признакам. На сегодняшний день ампелографическое описание сортов включает 150 дескрипторов [1, 2]. Однако проявление морфологических признаков зависит от фазы развития растения, его общего состояния и условий окружающей среды. Генетическая паспортизация – ДНК-фингерпринтирование (DNA-fingerprinting) – совокупность методов создания генетических «отпечатков пальцев», основанных на анализе полиморфизма ДНК.

Введение в практику идентификации генотипов молекулярных маркеров позволяет дать более точную характеристику, поскольку результаты не зависят от влияния факторов окружающей среды. ДНК-маркеры демонстрируют различный полиморфизм. На винограде широко использовали разнообразные маркеры, такие как RAPD, SSR, SNP, AFLP на основе RFLP или ПЦР-анализа [3-8]. Микросателлиты или SSR-локусы (simple sequence repeats – тандемные повторы простых последовательностей) стали предпочтительными в качестве маркерной системы, поскольку они имеют некоторые преимущества (совместное доминантное наследование, гипер-вариабельность) по сравнению с другими молекулярными маркерами. Аллели микросателлитного локуса отличаются друг от друга длиной – числом повторов. Для типирования микросателлитов требуется небольшое количество

ДНК, которую можно экстрагировать даже из сильно деградированного биологического материала. Микросателлиты встречаются в большом количестве у всех эукариотических организмов и сейчас используются для изучения как природных популяций, так и популяций сельскохозяйственных животных и растений [8]. Методы генетической паспортизации также применяются по всему миру в семеноводстве при проверке покупаемых партий семян на соответствие заявленному сорту.

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. В 2004 году исследованием Р. This и соавторов были проведены обобщение и анализ данных различных лабораторий, в итоге были отобраны 6 наиболее информативных, полиморфных микросателлитных локусов, которые и были рекомендованы для изучения генотипов сортов винограда. Кроме того, был представлен референсный список аллелей наиболее распространенных и известных сортов винограда (Каберне Совиньон, Шардоне, Каберне фран, Пино нуар, Мерло и др.) [6]. Так, SSR-маркеры VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 и VrZAG79 можно рассматривать как основной минимальный набор в работах по генотипированию сортов винограда. Позже этот набор дополнился ещё тремя маркерами: VVMD25, VVMD28, VVMD32 [7].

Сорта *Vitis vinifera* – основа высококачественного виноделия. «Гранатовый» – один из самых известных сортов винограда селекции ФГБНУ СКФНЦСВ в Краснодарском крае и за его пределами, получен путём скрещивания высококачественных сортов винограда «Каберне Совиньон» и «Саперави». Можно сказать, что генотип взял от родительских форм самые лучшие качества.

Урожай сорта используется для получения высококачественных столовых и десертных вин, а также виноградного сока. Столовые вина характеризуются интенсивной окраской, полным гармоничным вкусом и хорошо выраженным сортовым ароматом. Дегустационная оценка 8,0 балла. Десертные вина имеют очень интенсивную окраску, полный, сложенный и мягкий вкус с ярким сортовым тоном в аромате. Дегустационная оценка 8,2-8,5 балла. С выдержкой свойства десертного вина улучшаются. В районированном сортименте «Гранатовый» может составить достойную конкуренцию сорту «Каберне-Совиньон» как превосходящий его по урожайности и качеству [9].

Цель работы: ДНК-паспортизация сорта винограда «Гранатовый» на основе полиморфизма микросателлитных локусов VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62, VrZAG79 и уточнение происхождения генотипа по данным ДНК-анализа.

Объекты и методы исследований. В исследования были включены соответствующие сортовому описанию растения, произрастающие на Анапской ампелографической коллекции (г. Анапа). ДНК выделяли из апикальных листьев молодых побегов типичных растений сорта методом ЦТАБ [10]. Основной метод применяемый в работе – полимеразная цепная работа (ПЦР). В исследовании использовали SSR-маркеры VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62, VrZAG79, рекомендованные как минимальный набор для сортовой идентификации винограда [6]. ПЦР проводили в конечном объёме 20 мкл, содержащем 50 нг геномной ДНК, 1,5 единицы Tag-полимеразы, 1xTag-полимеразного буфера, 2мМ MgCl₂, дезоксинуклеотидтрифосфаты по 0,2 мМ и 200 мкМ каждого из праймеров (ООО «Синтол», Россия) по следующей схеме: начальная денатурация – 3 минуты при +95 °С, далее 34 цикла: денатурация – 10 секунд при +95 °С, отжиг праймеров – 30 секунд при +55 °С для маркеров VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, при +58 °С для VrZAG62, VrZAG79, элонгация – 30 секунд при +72 °С; заключительный этап – элон-

гация 3 минуты при +72 °С с использованием прибора BioRad (США). Далее следует разделение продуктов реакции методом капиллярного электрофореза на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 3130. Размеры амплифицированных фрагментов оценивали посредством специального программного обеспечения GeneMapper и PeakScanner. В качестве референсных генотипов для уточнения размеров амплифицированных фрагментов в работе использовали ДНК сортов «Каберне Совиньон» и «Шардоне».

Обсуждение результатов. Морфологические признаки растений винограда сорта «Гранатовый» соответствовали ампелографическому описанию: лист средний, воронковидный, округлый, пятилопастный, средне или глубоко рассеченный с острыми зубчиками на концах лопастей и слабым щетинисто-паутинистым опушением; черешок на освещенной солнцем стороне окрашен в винно-красный цвет; ягода темно-синяя, средняя или мелкая, округлая, с сочной мякотью; гроздь коническая, плотная и средней плотности, со средней массой 200 г.; куст среднерослый с тонкими побегами [11].

Методом SSR-профилирования с использованием маркеров VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62, VrZAG79 проведен анализ генотипа сорта «Гранатовый». Полученный ДНК-паспорт подтверждает происхождение «Гранатовый» от сортов «Саперави» и «Каберне-Совиньон». Так, по каждому проанализированному локусу отслеживается кодоминантный тип наследования аллелей: в каждом SSR-локусе генотипа «Гранатовый» обнаружена одна аллель от генотипа «Каберне Совиньон» и другая – от «Саперави» (табл.).

Например, ПЦР-анализ локуса VrZAG62 выявил в генотипе «Гранатовый» гетерозиготное состояние: идентифицированные размеры аллелей 194 и 200 пар нуклеотидов. Анализ SSR-профиля родительских форм указывает на то, что аллель размером 194 п.н. в локусе VrZAG62 унаследована от «Каберне Совиньон», а 200 п.н. – от «Саперави».

Микросателлитные ДНК-профили сортов винограда

Сорт	Аллели SSR-локусов, пары нуклеотидов											
	VVS2		VVMD7		VVMD27		VVMD5		VrZAG62		VrZAG79	
Шардоне	137	143	239	243	182	190	236	240	188	196	243	245
Каберне Совиньон	139	151	239	239	176	190	234	242	188	194	247	247
Гранатовый (Каберне Совиньон х Саперави)	139	<u>145</u>	239	<u>239</u>	190	<u>190</u>	234	<u>242</u>	194	<u>200</u>	<u>243</u>	247
<u>Саперави</u>	<u>133</u>	<u>145</u>	<u>239</u>	<u>239</u>	<u>190</u>	<u>193</u>	<u>226</u>	<u>242</u>	<u>188</u>	<u>200</u>	<u>243</u>	<u>261</u>

Таким образом, показано полное соответствие информации о происхождении сорта «Гранатовый» данным, полученным при анализе ДНК-профиля генотипа этого сорта и родительских форм («Саперави» и «Каберне-Совиньон»).

Выводы. Проведено SSR-профилирование сорта винограда «Гранатовый» по микросателлитным локусам VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62, VrZAG79. Подтверждено происхождение сорта от заявленных родительских форм. Полученный ДНК-паспорт может быть использован для идентификации растений данного сорта, проверки посадочного материала на чистосортность.

Литература

1. Tomić L., Štajner N., Javornik B. Characterization of grapevines by the use of genetic markers // The Mediterranean Genetic Code: Grapevine and Olive. 2013. P. 3-23.
2. OIV descriptor list for grape varieties and *Vitis* species (2nd edition). 2018. Режим доступа: <http://www.oiv.int/en/technical-standards-and-documents/description-of-grape-varieties/oiv-descriptor-list-for-grape-varieties-and-vitis-species-2nd-edition>.
3. Bowers J.E., Bandman E.B., Meredith C.P. DNA fingerprint characterization of some wine grape cultivars // American journal of enology and viticulture. 1993. Vol. 44(3). P. 266-274.
4. Ye G.N., Söylemezoğlu G., Weeden N.F., Lamboy W.F., Pool R.M., Reisch B.I. Analysis of the relationship between grapevine cultivars, sports and clones via DNA fingerprinting // Vitis. 1998. Vol. 37(1). P. 33-38.
5. Zinelabidine L.H., Haddioui A., Rodriguez V., Cabello F., Eiras-Dias J.E., Zapater J.M. M., Ibáñez J. Identification by *SNP* analysis of a major role for Cayetana Blanca in the genetic network of Iberian Peninsula grapevine varieties // American Journal of Enology and Viticulture. 2012. Vol. 63(1). P. 121-126.
6. This P., Jung A., Boccacci 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.
7. This P. Microsatellite markers analysis // Minutes of the First Grape Gen06 Workshop March 22nd and 23rd, INRA, Versailles (France). 2007. P. 3-42.
8. Kashi Y., King D., Soller M. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation // Trends in genetics. 1997. Vol. 13(2). P. 74-78
9. Сорта селекции СКЗНИИСиВ для импортозамещения и совершенствования отечественного сортимента технического винограда / Ильницкая Е.Т. и др. // Садоводство и виноградарство. 2016. № 5. С. 31-36.
10. 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.
11. Сорта растений, включенные в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Сорта культуры «Виноград»: Сорт Гранатовый. Режим доступа: <http://reestr.gossortrf.ru/reestr/sort/8005796.html>.