

УДК 634.8.093

DOI 10.30679/2587-9847-2020-29-145-149

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО СХОДСТВА ГИБРИДНЫХ ФОРМ ВИНОГРАДА, ПОЛУЧЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ *VITIS AMURENSIS* RUPR. ПРИ ПОМОЩИ ДНК-МАРКЕРОВ, СЦЕПЛЕННЫХ С ГЕНАМИ УСТОЙЧИВОСТИ**Котляр В.К., м.н.с., Ильницкая Е.Т., канд. биол. наук, Макаркина М.В. м.н.с., Степанов И.В., м.н.с.***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства" (Краснодар)*

Реферат. Дикорастущий амурский виноград представляет собой ценный материал для селекции устойчивых к болезням и вредителям сортов винограда, пригодных для возделывания в северных регионах. Данное исследование посвящено изучению гибридных форм винограда, созданных с использованием *Vitis amurensis* Rupr. и оценки их генетического разнообразия на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов.

Ключевые слова: ДНК-маркеры, филогенетическое древо, UPGMA, амурский виноград

Summary. Wild *Vitis amurensis* are a valuable material for breeding disease-and pest-resistant grape varieties suitable for cultivation in the Northern regions. This study is devoted to the study of hybrid forms of grapes created using *Vitis amurensis* Rupr. and estimation of their genetic diversity based on analysis of microsatellite locus polymorphism.

Key words: DNA-markers, phylogenetic tree, UPGMA, *Vitis amurensis*

Введение. Виноград является одной из самых важных плодовых культур в мире, однако производство винограда в значительной степени ограничено температурным фактором.

Виноград, культивируемый в регионах с морозными зимами, часто страдает от воздействия низких температур, при этом повреждения могут быть значительными. Это приводит к финансовым потерям и ограничивает дальнейшее развитие производства винограда. Как и для многих других культур, использование устойчивости к низким температурам через генетическое скрещивание и молекулярное размножение было бы эффективной стратегией для решения этой проблемы.

Vitis amurensis Rupr. - это дикий вид винограда, широко распространенный в Азии, с высокой морозоустойчивостью, превосходящей таковую у *Vitis vinifera*, доминирующего культивируемого вида винограда [1].

Кроме этого, некоторые сорта, полученные с использованием *V. amurensis* демонстрируют высокий уровень устойчивости к милдью (*Plasmopara viticola*) [2]. Помимо устойчивости к милдью и холодостойкости, *V. amurensis* проявляет и иные ценные признаки, такие как устойчивость к антракнозу, белой гнили. Также в растении обнаружены соединения, представляющие медицинский интерес [3-5]. Эти особенности побудили ученых включить *V. amurensis* в свои селекционные программы.

Благодаря способности амурского винограда скрещиваться с культивируемыми видами, эти ценные качества дикорастущего винограда могут быть переданы культурным сортам. Таким образом, дикорастущий виноград представляет собой ценный материал для создания новых устойчивых к болезням и вредителям сортов винограда, пригодных для возделывания в северных зонах [6].

И.В. Мичурин впервые привлек дикий амурский виноград для селекционной работы при выведении новых зимостойких сортов. В настоящее время селекционеры, следуя примеру Мичурина, используют *V. amurensis* с целью получения новых сортов, не нуждающихся в укрытии на зиму в южных районах виноградарства или морозостойких сортов [7].

Другим российским ученым, использовавшим *V. amurensis* в селекции, стал Федор Ильич Шатилов, который на его основе создал такие знаменитые в северном виноградарстве сорта как: Амурский чёрный ультраранний, Памяти Домбковской, Алёшкин, Подарок Шатилова, Мускат белый и д.р. [8]. В Оренбургской области сохранились малоизвестные гибридные формы (ГФ) селекции Ф.И. Шатилова, не получившие статус сорта в связи их малой изученностью. Именно они и стали объектом нашего исследования. Ранее мы уже оценивали потенциал устойчивости к милдью этих гибридов с помощью ДНК-маркеров [9].

Данное исследование посвящено определению генетического разнообразия гибридных форм Шатилова на основе данных об идентифицированных нами аллелях и анализу их генетического сходства на основании полученных результатов.

Методы. В исследования были включены генотипы винограда (21 образец), полученные Ф.И. Шатиловым с использованием *V. amurensis*, сохраняемые в коллекции А.Ю. Немытова (Оренбургская обл., Новосергиевский район, село Покровка), переданные на исследование в Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия (г. Краснодар).

Для ДНК-маркерного анализа гибридных форм на наличие гена *Rpv10*, отвечающего за устойчивость к милдью, использован маркер GF09-46, для идентификации гена *Rpv12* использованы маркеры UDV343 и UDV360 [10-11].

Для составления дендрограммы мы использовали метод UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages) - простой метод агломерационной иерархической кластеризации при помощи программы GenAIEx 6.5 и PAST.

Результаты. С помощью ДНК-маркера GF09-46 было идентифицировано 5 различных типов аллелей. Это аллели длиной в 395, 407, 409, 416 и 423 пар нуклеотидов (п.н.). В результате ДНК-маркерного анализа 21-ой гибридной формы было установлено наличие трёх аллелей размером 395 п.н. (в том числе, в одном образце в гомозиготном состоянии), три аллели размером 407 п.н. (исключительно в гетерозиготном состоянии), одна аллель - 409 п.н. (в гомозиготном состоянии у одного образца). Аллели размером 416 п.н., соответствующие согласно литературным данным наличию гена устойчивости *Rpv10*, были обнаружены в гетерозиготном состоянии в контрольном сорте Сапери Северный и ГФ3. Так же в 18 образцах была идентифицирована аллель размером в 423 п.н., в 16 образцах – в гомозиготном состоянии [9].

При использовании ДНК-маркеров UDV343 и UDV360 для детекции локуса Rpv12, целевые фрагменты, коррелирующие с аллельным состоянием гена, определяющим устойчивость к милдью, были выявлены в генотипе с названием «Мускат сверхранний №1». Образцом - контролем являлся сорт Кунлеань, обладающий геном устойчивости, согласно литературным данным, и анализ генотипа которого выявил аллели размером 164 п.н. и 213 п.н., соответственно, по локусам UDV343 и UDV360, как коррелирующие с устойчивостью.

С помощью маркера UDV343 в изучаемых нами образцах чаще всего выявлялась аллель 199 п.н. (в 11 образцах из 21 анализируемых). Вторые по частоте встречаемости оказались аллели 195 п.н. и 216 п.н., которые были идентифицированы в 9-ти образцах. Аллели длиной 189 п.н. и 200 п.н. встречаются в трёх образцах. Реже всего в исследуемой нами выборке в локусе UDV343 встречалась аллель размером 164 п.н., она была идентифицирована всего в двух гибридных формах из 21-ой изученных нами.

Среди аллелей, идентифицированных маркером UDV360, самой часто встречаемой стала аллель размером 207 п.н., которая была обнаружена в девяти гибридных формах из нашей выборки. Вторыми по встречаемости стали аллели 198 п.н., 206 п.н., 209 п.н. и 217 п.н., которые встречаются в пяти образцах. Аллели размером 187 п.н. и 188 п.н. встречаются в единичном экземпляре.

В общей сложности по трём анализируемым микросателлитным локусам (GF09-46, UDV343 и UDV360) при анализе 21-ого образца гибридных форм, полученных с использованием *V. amurensis* было определено 26 типов аллелей.

Обе формы, в которых обнаружено потенциальное присутствие генов устойчивости Rpv10 и Rpv12 можно отнести к столовому винограду, по сведениям сохраняющего их Немытова А.Ю.

Построенное нами филогенетическое древо отражено в рисунке 1. По оси ординат отложена шкала сходства

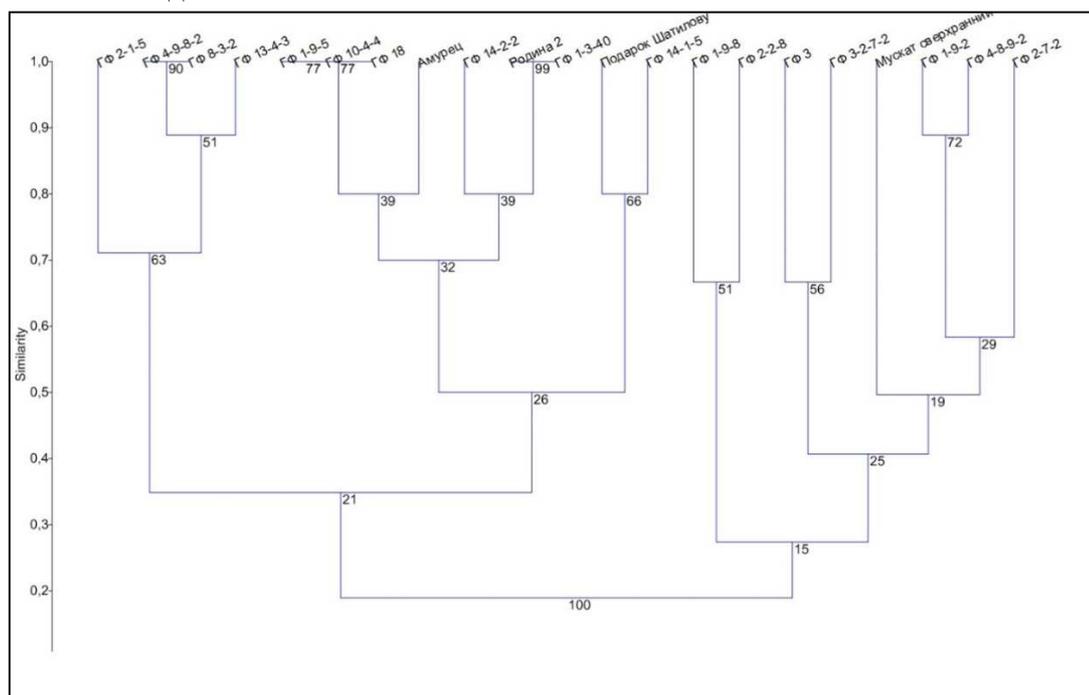


Рисунок 1 - Филогенетическое древо изучаемых нами образцов гибридных форм селекции Ф.И. Шатилова

Все образцы с высокой долей достоверности были разделены на два кластера (группы).

1-ая глобальная иерархическая группа включает в себя такие гибридные формы как: ГФ 2-1-5, ГФ 4-9-8-2, ГФ 8-3-2, ГФ 13-4-3, ГФ 1-9-5, ГФ 10-4-4, ГФ 18, Амурец, ГФ14-2-2, Родина 2, ГФ 1-3-40, Подарок Шатилову и ГФ 14-1-5. При этом ГФ 2-1-5 выделяется в отдельную иерархическую subgroupу, в то время как остальные гибридные формы этой группы имеют более высокую степень сходства.

В первом подкластере наиболее генетически близки гибридные формы ГФ 4-9-8-2 и ГФ 8-3-2, достоверность их родства довольно высока и составляет 90%. Во втором подкластере так же можно выделить несколько гибридных форм, которые продемонстрировали высокую степень генетического сходства при высоком проценте достоверности. К ним относятся такие образцы как: ГФ 1-9-5, ГФ 10-4-4 и ГФ 18. Так же очень интересно генетическое сходство между гибридной формой Родина 2 и ГФ 1-3-40, достоверность которого составляет 99% процентов.

ГФ 2-1-5 выделяется в отдельный подкластер, в котором является единственным представителем (с достоверностью 63%), что свидетельствует об отличных аллелях, идентифицированных в этом образце, по сравнению с другими образцами группы.

2-ая глобальная иерархическая группа включает в себя 8 самых генетически разнообразных образцов, среди которых не зафиксировано близкого генетического сходства. По трем проанализированным нами аллелям самыми оригинальными генотипами в этой подгруппе обладают Мускат сверхранний и ГФ 2-7-2.

Так же стоит обратить особое внимание на образцы ГФ 1-9-2 и ГФ 4-8-9-2, которые демонстрируют достаточно высокую степень генетического сходства (с достоверностью более 70%).

Выводы. В общей сложности по трём анализируемым микросателлитным локусам (GF09-46, UDV343 и UDV360) при анализе 21-ого образца гибридных форм, полученных с использованием *V. amurensis* было определено 26 типов аллелей.

При кластерном анализе данных генотипирования образцов все изучаемые нами гибридные формы удалось разделить на 2 глобальных иерархических группы. Стоит отметить, что разница между ними достоверна (100%). Хотя в работе было использовано генотипирование всего по 3 микросателлитным локусам, удалось выделить генетически близкие и генетически далекие образцы.

Нами было выявлено 3 группы образцов с высокой степенью генетического родства и 3 образца, проявивших минимальную степень родства по отношению к остальным изучаемым гибридным формам, что говорит о достаточно высоком генетическом разнообразии гибридных форм, полученных с использованием *V. amurensis*. Более полные исследования могут быть продолжены с большим количеством анализируемых микросателлитных локусов.

Литература

1. Xin H., Zhu W., Wang L., Xiang Y., Fang L., Li S. Genome wide transcriptional profile analysis of *Vitis amurensis* and *Vitis vinifera* in response to cold stress // PloS one. 2013 № 8 (3) p. 58740.
2. Blasi P., Blanc S., Wiedemann-Merdinoglu S., Prado E., Rühl E.H., Mestre P., Merdinoglu D. Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of Rpv8, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew // Theoretical and applied genetics. 2011 №123(1) P. 43-53.
3. Li D, Wan Y, Wang Y, He P (2008) Relatedness of resistance to anthracnose and to white rot in Chinese wild grapes. *Vitis* 47:213–215
4. Wang J., Chen Y., Hano Y., Nomura T., Tan R. Antioxidant activity of polyphenols from seeds of *Vitis amurensis* in vitro // ActaPharmacol Sin 2000 №21 P. 633–636
5. Yim N., Ha T., Trung T.N., Kim J.P., Lee S., Na M. The antimicrobial activity of compounds from the leaf and stem of *Vitis amurensis* against two oral pathogens // Bioorg Med Chem Lett №20 2010 C. 1165–1168
6. Бабайцева, Т.А. Творческий путь Н.И. Вавилова и его вклад в развитие аграрной науки / Т.А. Бабайцева // Вестник ИГСХА. -2007. -№4. - С. 5-8.
7. Смирнов, К.В. Виноградарство: учебное пособие / К.С. Смирнов, Л.М. Малтабар, А.К. Раджабов, Н.В. Матузок ; Издательство МСХА. - Москва, 1998. -499с.
8. Немытов, А.Ю. Виноград Шатилова / А. Ю. Немытов; НПО «Сады России»: Челябинский дом печати. - Челябинск, 2016. -С. 51-53. ISBN 978-5-87184-652-0
9. Ильницкая Е. Т., Макаркина М. В., Токмаков С. В., Котляр В. К., Немытов А. Ю. ДНК-маркерное изучение генетического потенциала устойчивости к милдью в гибридных формах от *Vitis amurensis* [Электронный ресурс] // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2020. № 61(1). С. 44–53. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/20/01/04.pdf>. DOI: 10.30679/2219-5335-2020-1-61-44-53 (дата обращения: 24.07.2020).
10. Schwander, F. Rpv10: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine / F. Schwander, R. Eibach, I. Fechter, L. Hausmann, E. Zyprian, R. Töpfer // Theor. App. Genet. – 2012. – V.124, № 1. – P. 163-176
11. Rogers S. O., Bendich A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Molecular Biology – 1985. –Vol. 19, No. 1. P. 69–76.