

ДНК-ПАСПОРТИЗАЦИЯ КАК ИНСТРУМЕНТ СОРТОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИНОГРАДА И УТОЧНЕНИЯ ЕГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

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

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

Реферат. ДНК-маркерный анализ генотипов винограда – основной инструмент для идентификации и уточнения происхождения сортов винограда. Проведено ДНК-профилирование ряда сортов винограда селекции ФГБНУ СКФНЦСВВ и АЗОСВиВ по SSR-локусам (VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 и VrZAG79), сформированы ДНК-паспорта. Уточнено происхождение некоторых сортов. Полученные ДНК-паспорта могут быть успешно использованы для идентификации растений исследованных сортов, проверки посадочного материала на чистосортность, а также в спорных вопросах авторства сорта.

Ключевые слова: ДНК-паспорт, идентификация сортов винограда, уточнение родословной сортов, SSR-маркеры

Summary. DNA-marker analysis of grape genotypes is the main instrument for identifying and clarifying the origin of grape varieties. DNA-profiling of a number of grapevine cultivars of FSBSI NCFSCHVW and AZESV&W breeding by SSR loci (VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 and VrZAG79) was carried out, and DNA passports were formed. The origin of some varieties has been clarified. The obtained DNA-fingerprints can be successfully used to identify plants of the studied varieties, check the planting material for purity, as well as for controversial issues of the variety authorship.

Key words: DNA-passport, identification of grape varieties, refining of the pedigree of grape varieties, SSR-markers

Введение. Виноградная лоза культивируется на протяжении более 5000 лет и имеет широкое распространение по всему миру [1]. Легкость вегетативного размножения способствовала распространению многих сортов в различные регионы мира, где они культивировались многие годы и получали собственные названия, свойственные для определенной местности [2-3]. Как следствие, некоторые сорта теперь имеют до 100 синонимов, а также существуют многочисленые сорта-омонимы [4].

Традиционные методы описания сортов винограда, основанные на вегетативных и репродуктивных признаках растения (ампелография), внесли большой вклад в установление идентичности и взаимосвязей между сортами *Vitis vinifera* [5-7]. За последние два десятилетия число методов классификации и идентификации сортов виноградной лозы стремительно возросло. К таковым относятся системы классификации, разработанные следующими организациями: IBPGR (Международный институт

генетических ресурсов растений), UPOV (Международный союз по охране новых сортов растений) и OIV (Международная организация винограда и вина) [8-9].

Система дескрипторов классификации OIV признана международной и используется для идентификации и ампелографического описания генотипов винограда [10-12]. Для составления ампелографического описания используют признаки, каждому из которых присвоен свой уникальный код, согласно дескрипторам, которые можно условно разбить на основные группы: признаки молодого побега; признаки зрелого побега; признаки сформировавшегося листа; признаки грозди и ягоды; другие признаки (табл. 1). Однако названия сортов часто неоднозначны из-за транслитерации, замены оригинальных названий сортов местными или региональными названиями, наличия вариаций внутри сортов (клонов), а также иногда плохого документирования данных, включающих экогеографическую и этнографическую информацию [14].

Таблица 1 – Ампелографические признаки, согласно системе дескрипторов OIV [13]

Код	Ампелографический дескриптор
1	2
Код OIV	Молодой побег
O-001	Форма (открытость) верхушки побега
O-003	Антоциановая окраска паутинистого опушения верхушки побега
O-004	Паутинистое опушение верхушки побега
O-005	Щетинистое опушение верхушки побега
O-051	Окраска верхней стороны пластинки
O-053	Паутинистое опушение между главными жилками на нижней стороне
O-056	Щетинистое опушение на главных жилках нижней стороны пластинки
	Зрелый побег
O-006	Положение (до образования завязей)
O-007	Окраска спинной стороны междуузлия
O-008	Окраска брюшной стороны междуузлия
O-009	Окраска спинной стороны узла
O-010	Окраска брюшной стороны узла
O-103	Одревесневший побег: основная окраска
O-012	Щетинистое опушение междуузлий
O-017	Длина усиков
	Сформировавшийся лист
O-065	Размер пластинки
O-067	Форма пластинки
O-075	Пузырчатость верхней стороны пластинки
O-068	Число лопастей
O-080	Глубина верхних боковых вырезов
O-079	Расположение лопастей черешковой выемки
O-077	Длина зубчиков
O-078	Отношение длины зубчиков к их ширине
O-076	Форма зубчиков
O-070	Доля главных жилок верхней стороны пластинки с антоциановой окраской
O-084	Опушение между главными жилками на нижней стороне листа
O-087	Опушение главных жилок на нижней стороне пластинки
O-093	Длина черешка по отношению к длине средней жилки

Продолжение таблицы 1

1	2
Грозди и ягоды	
О-204	Гроздь: плотность
О-206	Гроздь: длина гребненожки главной грозди
О-223	Ягода: форма
О-225	Ягода: окраска кожицы (без налета)
О-240	Ягода: отделяемость от плодоножки
О-228	Ягода: толщина кожицы
О-231	Ягода: антоциановая окраска мякоти
О-235	Ягода: твердость мякоти
О-236	Ягода: особенность вкуса
О-241	Ягода: образование семян
Другие признаки	
О-301	Время распускания почек
О-151	Пол цветка
О-303	Время начала созревания ягод

ДНК-маркерный анализ генотипов винограда повсеместно используется для уточнения сортовой принадлежности. Существует довольно много баз данных, включающих в себя ДНК-паспорта сортов винограда. К самым значимым из таких можно отнести Международную базу данных сортов винограда – VIVC (Vitis International Variety Catalogue), созданную немецким Федеральным исследовательским центром культивируемых растений. Это энциклопедическая база данных, содержащая описание около 23000 сортов и линий видов *Vitis*. Данные, содержащиеся в ней, постоянно обновляются [15].

ДНК-профилирование позволяет не только провести точную сортовую идентификацию, но и уточнить происхождение сорта: подтвердить или опровергнуть информацию о родительских формах. ДНК-паспорта сортов винограда представляют собой профили генотипов по набору микросателлитных локусов. В настоящее время SSR маркеры VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 и VrZAG79 составляют минимальный основной набор в работах по ДНК-паспортизации сортов винограда [16]. В случаях, когда этих маркеров недостаточно в работу включают ещё три дополнительных маркера – VVMD25, VVMD28 и VVMD32 [17].

На базе ФГБНУ СКФНЦСВВ планомерно ведутся работы ДНК-паспортизации сортов винограда отечественной селекции [18-22].

Объекты и методы исследований. Объектом исследования являлись растения сортов винограда селекции ФГБНУ СКФНЦСВВ – Дмитрий, Владимир, Гранатовый, Антарис, Литдар, Мицар, Ларни мускатная и Анапской опытной станции (АЗОСВиВ) – Достойный, Филлоксероустойчивый (Ф/У), Джемете, Бархатный, Бригантина, Надежда АЗОС, Красностоп анапский, Красностоп АЗОС, произрастающих на Анапской ампелографической коллекции (г. Анапа). Материал для молекулярно-генетических анализов брали с апикальных частей молодых побегов виноградных растений, соответствующих сортовому описанию.

ДНК выделяли модифицированным ЦТАБ-методом. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили по ранее отработанному протоколу на приборе BioRad (США), с применением минимального набора SSR-маркеров (VS2, VD7, VD27, VD5,

VrZag62, VrZag79), для генотипирования сортов винограда [23, 24]. Фрагментный анализ продуктов амплификации осуществляли с использованием генетического анализатора ABI Prism 3130 и программы GeneMapper 4.1. В качестве контрольных (референсных) генотипов, для уточнения размеров продуктов ПЦР, использовали сорта винограда Каберне Совиньон и Пино Нуар, ДНК-профили которых известны [15].

Обсуждение результатов. Проведено ДНК-профилирование сортов винограда Дмитрий, Владимир, Гранатовый, Антарис, Литдар, Мицар, Ларни мускатная, Достойный, Филлоксероустойчивый (Ф/У) Джемете, Бархатный, Бригантина, Надежда АЗОС, Красностоп анапский, Красностоп АЗОС по микросателлитным локусам VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62, VrZAG79. Получены ДНК-профили представленных сортов, сформированы ДНК-паспорта по 6 SSR-локусам (табл. 2). Полученные ДНК-паспорта могут быть использованы для ДНК-идентификации растений винограда соответствующих сортов.

Таблица 2 – ДНК-паспорта сортов винограда по 6 SSR-локусам

Сорт	ДНК-паспорт
Дмитрий	VVS2 _{133 145} VVMD7 _{239 251} VVMD27 _{190 190} VVMD5 _{234 234} VrZAG62 _{194 194} VrZAG79 _{243 261}
Владимир	VVS2 _{129 143} VVMD7 _{239 239} VVMD27 _{182 190} VVMD5 _{238 242} VrZAG62 _{200 202} VrZAG79 _{247 255}
Гранатовый	VVS2 _{139 145} VVMD7 _{239 239} VVMD27 _{190 190} VVMD5 _{234 242} VrZAG62 _{194 200} VrZAG79 _{243 247}
Антарис	VVS2 _{133 145} VVMD7 _{239 249} VVMD27 _{193 195} VVMD5 _{230 242} VrZAG62 _{188 200} VrZAG79 _{251 261}
Литдар	VVS2 _{133 135} VVMD7 _{249 249} VVMD27 _{180 195} VVMD5 _{236 240} VrZAG62 _{186 204} VrZAG79 _{247 255}
Мицар	VVS2 _{139 143} VVMD7 _{239 249} VVMD27 _{182 190} VVMD5 _{238 242} VrZAG62 _{194 202} VrZAG79 _{247 259}
Ларни мускатная	VVS2 _{133 143} VVMD7 _{247 249} VVMD27 _{182 186} VVMD5 _{238 242} VrZAG62 _{204 204} VrZAG79 _{251 259}
Достойный	VVS2 _{125 133} VVMD7 _{239 253} VVMD27 _{182 190} VVMD5 _{224 242} VrZAG62 _{188 200} VrZAG79 _{243 247}
Ф/У Джемете	VVS2 _{125 143} VVMD7 _{239 253} VVMD27 _{176 182} VVMD5 _{238 242} VrZAG62 _{200 200} VrZAG79 _{237 247}
Бархатный	VVS2 _{135 151} VVMD7 _{247 249} VVMD27 _{180 184} VVMD5 _{230 240} VrZAG62 _{186 186} VrZAG79 _{247 255}
Бригантина	VVS2 _{135 135} VVMD7 _{243 249} VVMD27 _{182 186} VVMD5 _{228 242} VrZAG62 _{186 188} VrZAG79 _{255 255}
Надежда АЗОС	VVS2 _{135 135} VVMD7 _{249 251} VVMD27 _{186 195} VVMD5 _{228 242} VrZAG62 _{186 194} VrZAG79 _{251 257}
Красностоп АЗОС	VVS2 _{125 145} VVMD7 _{239 253} VVMD27 _{176 190} VVMD5 _{224 238} VrZAG62 _{188 200} VrZAG79 _{237 243}
Красностоп анапский	VVS2 _{133 145} VVMD7 _{239 265} VVMD27 _{190 190} VVMD5 _{224 248} VrZAG62 _{188 196} VrZAG79 _{243 255}

Данные ДНК-паспортов успешно используются для уточнения происхождения сортов, если известны ДНК профили родительских форм. Так, ранее нами было подтверждено происхождение сортов винограда Дмитрий (Варуссет x Гра-

натовый), Антарис (Саперави х Цимлянский черный), Литдар (Хиндогны х Мускат гамбургский), Мицар (Серексия х Каберне Совиньон), Красностоп АЗОС (Ф/У Джемете х Красностоп анапский) от заявленных родительских форм [19-22]. И опровергнуто общеизвестное происхождение сорта винограда Достойный (Ф/У Джемете х Мускат гамбургский): ДНК-анализ показал, что Ф/У Джемете является одной из родительских форм данного сорта, а Мускат гамбургский не может быть вторым родителем, так как в генотипе сорта Достойный ни в одном из шести изученных SSR-локусов не было выявлено аллелей, идентифицированных в генотипе сорта Мускат гамбургский [19].

Также с помощью ДНК-профилирования можно проследить наследование аллелей от родителей потомкам в одной гибридной семье (табл. 3).

Нами проведено сравнение ДНК-профилей сортов винограда Бригантина и Надежда АЗОС с ДНК-профилями их родительских форм – Молдова и Кардинал. Подтверждено их происхождение от заявленных форм. По каждому из проанализированных локусов отслеживается кодоминантный тип наследования аллелей: в каждом локусе представлена одна аллель от генотипа «Молдова», а другая – от генотипа «Кардинал».

Таблица 3 – Наследование аллелей от родителей потомкам в сортах «Бригантина» и «Надежда АЗОС» из гибридной семьи «Молдова х Кардинал»

Сорт	Аллели SSR-локусов, п.н.											
	VVS2		VVMD7		VVMD27		VVMD5		VrZAG62		VrZAG79	
Каберне Совиньон	139	151	239	239	176	190	234	242	188	194	247	247
Пино Нуар	137	151	239	243	186	190	230	240	188	194	239	245
<i>Молдова</i>	<i>133</i>	<i>135</i>	<i>243</i>	<i>251</i>	<i>182</i>	<i>195</i>	<i>238</i>	<i>242</i>	<i>188</i>	<i>194</i>	<i>255</i>	<i>257</i>
Бригантина	<i>135</i>	<u>135</u>	<i>243</i>	<u>249</u>	<i>182</i>	<u>186</u>	<u>228</u>	<i>242</i>	<u>186</u>	<i>188</i>	<i>255</i>	<u>255</u>
Надежда АЗОС	<i>135</i>	<u>135</u>	<u>249</u>	<i>251</i>	<u>186</u>	<i>195</i>	<u>228</u>	<i>242</i>	<u>186</u>	<i>194</i>	<u>251</u>	<i>257</i>
<u>Кардинал</u>	<u>135</u>	<u>135</u>	<u>249</u>	<u>249</u>	<u>180</u>	<u>186</u>	<u>228</u>	<u>238</u>	<u>186</u>	<u>186</u>	<u>251</u>	<u>255</u>

В таблице 3 курсивом выделены аллели, унаследованные от сорта Молдова, а подчеркиванием – от Кардинала. Показано, что сорта Бригантина и Надежда АЗОС имеют одинаковое аллельное состояние по микросателлитным локусам VVS2, VVMD5. А по локусам VVMD7, VVMD27, VrZag62 и VrZAG79 наблюдаются различия в наследовании аллелей.

Заключение. Проведено ДНК-профилирование сортов винограда селекции ФГБНУ СКФНЦСВВ и АЗОСВиВ по шести микросателлитным локусам, и сформированы их ДНК-паспорта. Минимального основного набора из шести микросателлитных маркеров для генотипирования сортов винограда оказалось достаточно для формирования уникальных, отличных друг от друга ДНК-профилей, в том числе и сортов, полученных из одной гибридной комбинации, что очередной раз подтверждает высокую эффективность данных SSR-маркеров для сортовой идентификации. Наглядно показано уточнение происхождения сортов по результатам SSR-генотипирования на примере сортов Бригантина и Надежда АЗОС, подтверждено их происхождение от родительских форм «Молдова» и «Кардинал».

Полученные ДНК-паспорта могут быть успешно использованы для идентификации растений прогенотипированных сортов, проверки посадочного материала на чистосортность, при анализе соответствия известных родительских форм идентифицированным генотипам, а также в возможных спорных вопросах авторства сорта.

Литература

1. Zohary D., Hopf M. Domestication of Plants in the Old World – The Origin and Spread of Domesticated Plants in South-west Asia, Europe, and the Mediterranean Basin, 4rd edn. Oxford University Press, 2012. 264 p.
2. Dion R. Histoire de la vigne et du vin en France des origines au XIX // Graveeme siècle. Flammarion, Paris. 1977. 768 p.
3. Fregoni M. Origines de la vigne et de la viticulture. Musumeci, Quart Italie. 1991. P. 160
4. The Federal Information Centre For Agriculture: официальный сайт. URL: <http://www.genres.de/idb/vitis/> (дата обращения: 14.06.2020).
5. Galet P. A Practical Ampelography: Grapevine Identification (translated by Lucie T. Morton). Ithaca, NY: Cornell University Press. 1979. 248 p.
6. Krimbas V. Greek Ampelography. Vol. 1. Athens, Greece: Ministry of Agriculture. 1943.
7. Boursiquot J.M., Faber M.P., Blachier O., Truel P. Computerization and statistical analysis of ampelographic data // Agronomie. 1987. №7. P 13-20.
8. International Union for the Protection of New Varieties of Plants: официальный сайт. URL: <https://www.upov.int/portal/index.html.en> (дата обращения: 14.06.2020).
9. IBPGR: International Board for Plant Genetic Resources: официальный сайт. URL: www.nzdil.org (дата обращения: 14.06.2020).
10. Prendes L.P., Merín M.G., Fontana A.R., Bottini R.A., Ramirez M.L., Ambrosini V.I.M. Isolation, identification and selection of antagonistic yeast against *Alternaria alternata* infection and tenuazonic acid production in wine grapes from Argentina // International journal of food microbiology. 2018. №266. P. 14-20.
11. Salimov V., Shukurov A., Asadullayev R. Study of diversity of Azerbaijan local grape varieties basing on OIV ampelographic descriptors // Annals of Agrarian Science. 2017. T. 15. № 3. P. 386-395.
12. Popescu C.F., Maul E., Dejeu L.C., Dinu D., Gheorge R.N., Laucou V., Crespan M. Identification and characterization of Romanian grapevine genetic resources // Vitis. 2017. № 56. P. 173-180.

13. 2nd edition of the OIV descriptor list for grape varieties and *Vitis* species. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, Paris, France-International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy 2009: официальный сайт. URL: www.oiv.org (дата обращения: 14.06.2020).

14. El Oualkadi A., Hajjaj B. Characterization of grape berries of same local varieties in Morocco // International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology. 2019. Т. 5. №. 6. P. 1690-1694.

15. Vitis International Variety Catalogue: официальный сайт. URL: <http://www.vivc.de/> (дата обращения: 14.06.2020).

16. 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.

17. This P. Microsatellite markers analysis // Minutes of the First Grape Gen06 Workshop March 22nd and 23rd, INRA, Versailles (France). 2007. P. 3-42.

18. Ильницкая Е.Т., Токмаков С.В., Кайдышева Г.А. ДНК-паспортизация некоторых сортов винограда селекции СКЗНИИСиВ И АЗОСВиВ [Электронный ресурс] // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2016. № 38(2). С. 47-53. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/16/02/04.pdf>. (дата обращения: 02.11.2020).

19. Ильницкая Е.Т., Макаркина М.В., Лободина Е.В. Базы данных анализа ДНК для целей селекции и питомниководства винограда // Научные труды СКФНЦСВВ. Т. 24. Краснодар: СКФНЦСВ, 2019. 32-37.

20. Ильницкая Е.Т., Макаркина М.А., Токмаков С.В. Уточнение происхождения некоторых сортов винограда отечественной селекции по микросателлитным профилям [Электронный ресурс] // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2019. № 59(5). С. 12-20. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/19/05/02.pdf>. DOI: 10.30679/2219-5335-2019-5-59-12-20 (дата обращения: 02.11.2020).

21. Ильницкая Е.Т., Макаркина М.В., Васильева О.Ю. Подтверждение родословной сорта винограда «Гранатовый» методом SSR-профилирования // Научные труды СКФНЦСВВ. Т. 28. Краснодар: СКФНЦСВ, 2020. С. 101-104.

22. Ильницкая Е.Т., Макаркина М.В., Токмаков С.В. ДНК-профилирование и уточнение родословной некоторых сортов винограда селекции СКФНЦСВВ [Электронный ресурс] // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2020. № 64(4). С. 219-228. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/20/04/18.pdf>. DOI: 10.30679/2219-5335-2020-4-64-219-228 (дата обращения: 02.11.2020).

23. Ильницкая Е.Т. Идентификация генотипов винограда методом микросателлитного профилирования // Современные методология, инструментарий оценки и отбора селекционного материала садовых культур и винограда монография. Краснодар, 2017. С. 240-247.

24. Характеристика некоторых аборигенных дагестанских сортов винограда методом SSR-анализа и по основным ампелографическим признакам листьев / Е.Т. Ильницкая [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21. № 6. С. 617-622.