

УДК 634.836

**ДНК-ТИПИРОВАНИЕ СОРТОВ ВИНОГРАДА
АМПЕЛОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ «МАГАРАЧ»
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХЛОРОПЛАСТНЫХ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ¹**

**DNA TYPING OF GRAPE VARIETIES OF MAGARACH AMPELOGRAPHIC
COLLECTION USING CHLOROPLASTIC MICROSATELLITE MARKERS**

*Г.В. Корнильев, В.И. Рисованная,
Я.Ю. Рязанкина*

*H.V. Korniliev, V.I. Risovannaya,
Ya.Yu. Ryazankina*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН», Ялта, Россия,
e-mail: guriy-kornilev@yandex.com

Federal State Budgetary Institution of Science «All-Russian National Research Institute of Viticulture and Winemaking "Magarach" RAS», Yalta, Russia,
e-mail: guriy-kornilev@yandex.com

Аннотация. Впервые для 10 изученных сортов винограда ампелографической коллекции «Магарач» различных эколого-географических групп получены микросателлитные профили хлоропластной ДНК по локусам *ccmp3*, *ccmp5*, *ccmp10* и определены их хлоротипы. В качестве референсных использовались западноевропейские сорта Каберне Совиньон и Пино Нуар. В изученных сортах по локусу *ccmp3* идентифицированы аллели 106 и 107 п.н., по локусу *ccmp5* – 104 и 105 п.н., по локусу *ccmp10* – 115 и 116 п.н. Сорт Генуса цибил и межвидовые гибриды Кастор и Мускат де Яловень по локусам *ccmp3*, *ccmp5*, *ccmp10* имели генотип 106 105 115 п.н. и соответствовали хлоротипу В. Сорта Васарга чёрная, Заарма, Мараш червен, Озировка, Плавай, Порси шекерек по данным локусам имели генотип 106 105 116 п.н. и соответствовали хлоротипу С. Сорт Ширван шахи по данным локусам имел генотип 107 104 115 п.н. и соответствовал хлоротипу D. Полученные данные могут быть использованы при изучении родословной сортов в селекционных программах, оценки их взаимосвязей, а также являются вкладом в пополнение базы данных по SSR-профилям сортов винограда.

Summary. For the first time, microsatellite profiles of chloroplast DNA for *ccmp3*, *ccmp5*, *ccmp10* loci for 10 studied grape varieties of the Magarach Ampelographic Collection of various ecological and geographical groups were obtained with determining their chlorotype. Western European varieties ‘Cabernet Sauvignon’ and ‘Pinot Noir’ were used as a reference. Alleles of 106 and 107 bps were identified at the *ccmp3* locus, 104 and 105 bps at the *ccmp5* locus, and 115 and 116 bps at the *ccmp10* locus in the studied varieties. The variety ‘Genusa Tsibil’ and interspecific hybrids ‘Castor’ and ‘Muscat de Yaloven’ had a genotype of 106 105 115 bps at the *ccmp3*, *ccmp5*, *ccmp10* loci, which corresponded to the chlorotype B. The varieties ‘Vasarga Chernaya’, ‘Zaarma’, ‘Marash Cherven’, ‘Ozirovka’, ‘Plavai’, ‘Porsi Shekerek’ according to these loci had a genotype of 106 105 116 bps and corresponded to the chlorotype C. The variety ‘Shirvan Shakhi’ according to these loci had a genotype of 107 104 115 bps, corresponding to the chlorotype D. The data obtained can be used in studying the line of varieties in breeding programs, in assessing their relationships, and also can contribute to replenishing the database of SSR profiles of grapevine cultivars.

¹ Исследование выполнено в рамках государственного задания № FNZM-2022-0008.

Ключевые слова: хлоропластные микросателлитные маркеры, хлоротипы, сорта винограда, эколого-географические группы, ампелографическая коллекция «Магарач»

Keywords: chloroplast microsatellite markers, chlorotypes, grape varieties, ecological and geographical groups, Magarach Ampelographic Collection.

DOI: 10.32904/2712-8245-2023-26-25-30

Введение. *Vitis vinifera* L. ssp. *sativa* (DC) Negi – виноград культурный – одна из древнейших и наиболее экономически важных сельскохозяйственных культур, насчитывающая более 20 тысяч сортов [1]. Актуальной задачей является сохранение и изучение разнообразия генофонда имеющихся сортов, установление их генетических взаимосвязей. Современным подходом для выполнения этой задачи является применение молекулярно-генетического метода SSR-профилирования с использованием микросателлитных маркеров (SSR-маркеров), представляющих собой тандемные повторы некодирующих последовательностей из 2–6 нуклеотидов в структуре ядерной (nSSR) или хлоропластной (cpSSR) ДНК [2–4]. Хлоропластный геном винограда представляет собой последовательность длиной 160928 п.о [5]. В отличие от ядерного, хлоропластный геном характеризуется более низкой скоростью эволюции, низкой частотой мутаций, отсутствием событий рекомбинации и наследованием у покрытосеменных растений по материнской линии [3]. В научных публикациях описаны различные cpSSR-маркеры: cpSSR3, cpSSR5, cpSSR10, NTCP8, NTCP12, ccSSR5, ccSSR9, ccSSR14, ccSSR23 [3, 4, 6]. При этом наиболее полиморфными являются первые 3 локуса – cpSSR3, cpSSR5, cpSSR10 [7]. На основании комбинации размеров аллелей локусов выделены несколько гаплотипов (хлоротипов), которые в работе Arroyo-García [3] предложено обозначать буквами от А до Н, а в статье Imazio [4] – римскими цифрами от I до VI. Установлено, с частотой более 5 % распространены только 4 хлоротипа – А, В, С и D, которые соответствуют гаплотипам IV, II, V и I. При анализе встречаемости хлоротипов, выявлено, что у винограда культурного распространены хлоротипы – А, С и D. При этом хлоротип А больше характерен для западноевропейских сортов, а хлоротип D – для восточных [7–9]. Таким образом, выявление хлоротипа позволяет не только идентифицировать сорт винограда в сочетании с ядерными SSR-маркерами, но и оценить его происхождение, сделать вывод о возможных предках и генетических связях с другими сортами. Наиболее широкой базой данных по микросателлитным профилям nSSR- и cpSSR-локусов генотипов винограда является *Vitis International Variety Catalogue* (VIVC) [10]. Тем не менее, для многих сортов, указанных в этой базе, данные по их хлоротипам отсутствуют. В связи с этим определение хлоротипов сортов винограда в рамках программы идентификации неизвестных образцов, поддерживаемых на Ампелографической коллекции «Магарач» (АК «Магарач»), является актуальным.

Цель исследования – микросателлитное профилирование по cpSSR-локусам и определение хлоротипов некоторых сортов винограда ампелографической коллекции «Магарач».

Объекты и методы исследований. В исследование включены 10 сортов винограда, поддерживаемых на ампелографической коллекции «Магарач», ранее идентифицированных нами согласно базе данных Vitis International Variety Catalogue (VIVC) по ядерным микросателлитным локусам (nSSR). В их числе 2 межвидовых гибрида (Кастор и Мускат де Яловень), а также 3 сорта группы Бассейна Чёрного моря (*Convarietas pontica* Negr. – Мараш червен, Озировка, Плавай) и 5 сортов восточной группы (*Convarietas orientalis* Negr. – Васарга чёрная, Генуса цибил, Заарма, Порси шекерек, ширван шахи) [8]. Исследования выполнены в лаборатории молекулярно-генетических исследований ФГБУН ВНИИВиВ «Магарач».

Экстрагирование геномной ДНК из листьев и камбиальной ткани побегов проводили с помощью ЦТАБ-буфера [11]. Чистоту и количество ДНК оценивали методом спектрофотометрирования на приборе «Biophotometer plus». Генотипирование проводили по 3 хлоропластным локусам (cpSSR): *sscp3*, *sscp5*, *sscp10*, как наиболее полиморфным. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) выполнена на амплификаторе «T100 Thermal Cycler» (BioRad) по ранее отработанному протоколу [7, 12]. В работе использованы реакционная смесь 2.5x для ПЦР и праймеры с флуоресцентными метками FAM, TAMRA, R6G производства компании «Синтол». Фрагментный анализ ПЦР-продуктов выполнен на генетическом анализаторе ABI Prism 3130 с использованием программного обеспечения «Gene Mapper 4.0». В качестве референсных сортов использовались сорта винограда Каберне Совиньон и Пино Нуар с известным аллельным составом cpSSR-локусов *sscp3*, *sscp5*, *sscp10*.

Обсуждение результатов. В результате проведённых исследований впервые для изученных 10 сортов получены SSR-профили хлоропластных генотипов по локусам *sscp3*, *sscp5*, *sscp10*. Пример полученного профиля сорта Ширван шахи представлен на рисунке. Пики соответствующих cpSSR-локусов отмечены стрелками. Интересно отметить, что 9 изученных сортов по двум локусам *sscp3* и *sscp5* имеют аналогичный генотип 106 105 п.н и только у сорта Ширван шахи выявлен генотип 107 и 104 п.н., что соответствует генотипам референсных сортов Пино Нуар и Каберне Совиньон. По локусу *sscp10* у 6 сортов выявлен аллель 116 п.н.; у 4 сортов – 115 п.н., что соответствует референсному генотипу Каберне Совиньон (таблица). Полученные микросателлитные профили срДНК показывают, что изученные сорта имеют один из трёх хлоротипов: В, С, D (согласно классификации Arroyo-García [3]). Хлоротип А, соответствующий референсному сорту Пино Нуар и характерный для многих западноевропейских сортов, в изученных сортах нами не выявлен. Известно, что хлоротип В не является распространённым среди винограда культурного и характерным для какого-либо конкретного региона происхождения сорта [7].

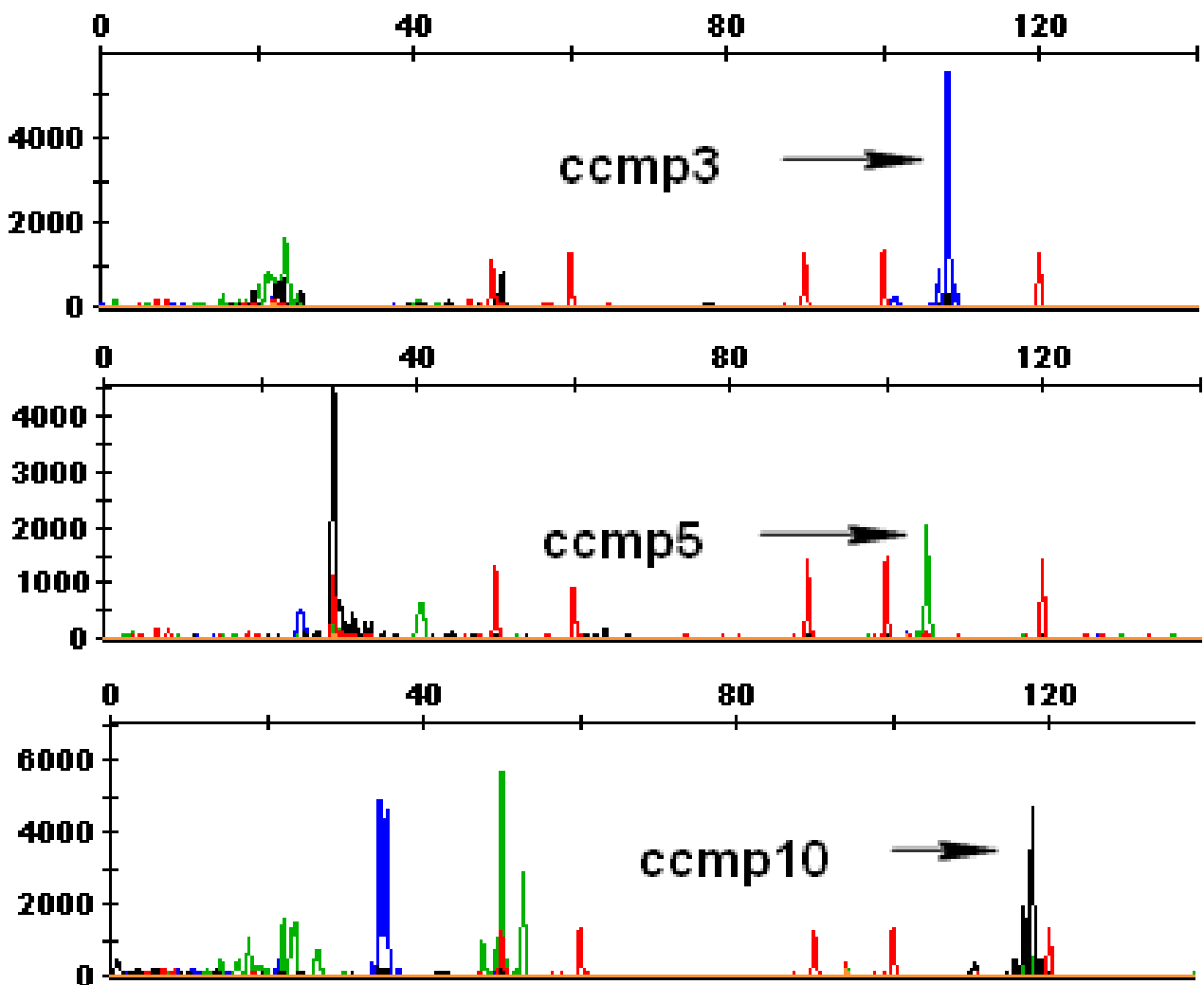


Рисунок. Микросателлитные профили по локусам cstr3, cstr5, cstr10 хлоропластной ДНК (на примере сорта Ширван шахи)

Действительно, по результатам нашего исследования, хлоротип В выявлен у сорта Генуса цибил, а также у двух межвидовых гибридов – Кастор и Мускат де Яловень, которые имеют различное происхождение (таблица). Идентифицированные у 7 исследованных сортов хлоротипы С и D считаются распространёнными среди сортов винограда культурного [8]. При этом данные хлоротипы особенно характерны для сортов, происходящих из регионов Ближнего Востока и Балкан [8, 11]. Так, по результатам нашего исследования, хлоротипу С имеют сорта Васарга чёрная, Заарма, Порси шекерек (представители восточной группы), а также болгарские сорта Мараш червен, Озировка и румынский сорт Плавай, происходящие из Балканского и соседних регионов (группа сортов Бассейна Чёрного моря). Хлоротип D также выявлен у сорта восточной группы – Ширван шахи.

Таблица. Генотипы изученных сортов винограда по *ср*SSR-локусам

Сорт	Хлоро-тип	Локусы <i>ср</i> SSR			Эколого-географическая группа
		<i>ссmp3</i>	<i>ссmp5</i>	<i>ссmp10</i>	
Васарга чёрная	С	106	105	116	<i>Convarietas orientalis</i> Negr.
Генуса цибил	В	106	105	115	<i>Convarietas orientalis</i> Negr.
Заарма	С	106	105	116	<i>Convarietas orientalis</i> Negr.
Кастор	В	106	105	115	<i>Vitis L. Interspecific cross.</i>
Мараш червен	С	106	105	116	<i>Convarietas pontica</i> Negr.
Мускат де Яловень	В	106	105	115	<i>Vitis L. Interspecific cross.</i>
Озировка	С	106	105	116	<i>Convarietas pontica</i> Negr.
Плавай	С	106	105	116	<i>Convarietas pontica</i> Negr.
Порси шекерек	С	106	105	116	<i>Convarietas orientalis</i> Negr.
Ширван шахи	Д	107	104	115	<i>Convarietas orientalis</i> Negr.
Референсные сорта					
Каберне Совиньон	Д	107	104	115	<i>Convarietas occidentalis</i> Negr.
Пино Нуар	А	106	105	114	<i>Convarietas occidentalis</i> Negr.

Таким образом, выявленные нами хлоротипы изученных сортов могут быть связаны с регионами их происхождения.

Выводы. В результате проведённого исследования впервые для 10 сортов, отобранных на ампелографической коллекции «Магарач», идентифицированы микросателлитные профили хлоропластных SSR-локусов и определены хлоротипы, информация о которых отсутствует в базе данных *Vitis International Variety Catalogue (VIVC)*. Сравнительный анализ микросателлитных профилей *ср*ДНК позволил установить, что сорт Генуса цибил, а также межвидовые гибриды Кастор, Мускат де Яловень имеют хлоротип В; Васарга чёрная, Заарма, Мараш червен, Озировка, Плавай, Порси шекерек – хлоротип С; Ширван шахи – хлоротип Д. Полученные данные могут быть использованы при изучении родословной сортов в селекционных программах, оценки их взаимосвязей, а также являются вкладом в пополнение базы данных по SSR-профилям сортов винограда. Работа по SSR-профилированию сортов и форм ампелографической коллекции «Магарач» продолжается.

Авторы выражают благодарность младшему научному сотруднику Г.Ю. Спотарю за техническую поддержку.

Литература

1. Distribution of the World's Grapevine Varieties/Focus OIV2017 - International Organization of Vine and Wine, 2017. 58 p. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.oiv.int/public/medias/5888/en-distribution-of-the-worlds-grapevine-varieties.pdf>. (дата обращения 2.09.2023г.)
2. Development of standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars / P. This, A. Jung, P. Voccacci, J. Borrego, R. Botta, L. Constantini, M. Crespan, G. Dangl, C. Eisenheld, F. Ferreira-Monteiro, S. Grando, J. Ibanez, T. Lacombe, V. Luacou,

R. Magalhaes, C.P. Meredith, N. Milani, E. Peterlunger, F. Regner, L. Zulini, E. Maul // *Theor. appl. genet.* Vol. 109. 2004. P. 1448–1458. DOI: 10.1007/s00122-004-1760-3.

3. Chloroplast microsatellite polymorphisms in *Vitis* species / R. Arroyo-Garcia, F. Lefort, M.T. de Andres, J. Ibanez, J. Borrego, N. Jouve, F. Cabello, J.M. Martinez-Zapater // *Genome.* 2002. Vol. 45. P. 1142–1149. DOI: 10.1139/G02-087.

4. Chloroplast microsatellites to investigate the origin of grapevine / S. Imazio, M. Labra, F. Grassi, A. Scienza, O. Failla // *Genetic Resources and Crop Evolution.* 2006. Vol. 53. P. 1003–1011. DOI: 10.1007/s10722-004-6896-0.

5. Plastid DNA sequence diversity in wild grapevine samples (*Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*) from the Caucasus region / I. Pipia, M. Gogniashvili, V. Tabidze, T. Beridze, M. Gamkreli-dze, V. Gotsiridze, G. Melyan, M. Musayev, V. Salimov, J. Beck, B. Schaal // *Vitis.* Vol. 51(3). 2012. P. 119–124.

6. Assessment of wild grapevine (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*) chlorotypes and accompanying woody species in the Eastern Adriatic region / L. Butorac, K. Hančević, K. Lukšić, Ž. Škvorc, M. Leko, E. Maul, G. Zdunić // *PloS one.* Vol. 13(6). 2018. DOI: [10.1371/journal.pone.0199495](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199495).

7. Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms / R. Arroyo-Garcia, L. Ruiz-Garcia, L. Bolling, R. Ocete, et al. // *Molecular Ecology.* 2006. Vol. 15. P. 3707–3714. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2006.03049.x.

8. Негруль А.М. Происхождение культурного винограда и его классификация // *Ампе-логграфия СССР.* М.: Пищепромиздат, 1946. Т.1. С. 159–216.

9. Recovering old grapevine varieties / J. Garcia, R. Peiro, F. Martinez-Gil, J.X. Soler, C. Jimenez, A. Juste, C. Xirivella, C. Gisbert // *Vitis.* Vol. 59. 2020. P. 101–103. DOI: 10.5073/vitis.2020.59.101-103.

10. Vitis International Variety Catalogue VIVC [Электронный ресурс]. URL: <https://www.vivc.de/>. (дата обращения 2.09.2023г.)

11. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // *Plant Molecular Biology.* 1985. P. 69–76.

12. Рисованная В.И., Гориславец С.М., Dr. Francois Lefort. Оценка уровня аллельного полиморфизма SSR-маркеров и генетических дистанций некоторых сортов винограда Юга России разных эколого-географических групп // «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2021. № 23(4). С. 330–335. DOI: 10.35547/IM.2021.23.4.004.