

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ДИКИХ РОДИЧЕЙ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ И ПРИКЛАДНЫХ ПРОБЛЕМ

DOI:10.30901/2227-8834-2018-3-224-234

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 634.2 634.7.

**М. М. Агаханов,
В. А. Волков,
П. С. Ульянич,
К. М. Абдуллаев,
Е. Н. Кислин**

Федеральный исследовательский центр
Всероссийский институт генетических
ресурсов растений
имени Н. И. Вавилова,
190000 Россия, г. Санкт-Петербург,
ул. Б. Морская, д. 42, 44
e-mail: kislin@yandex.ru

Ключевые слова:

генетические ресурсы растений,
виноград, *ex situ* коллекции,
генетическая структура коллекции,
микросателлитные маркеры

Поступление:

20.09.2018

Принято:

19.09.2018

ПОЛИМОРФИЗМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ В КОЛЛЕКЦИИ ВИНОГРАДА ДАГЕСТАНСКОГО ФИЛИАЛА ВИР

Актуальность. В ампелографической коллекции на филиале Дагестанская опытная станция ВИР (ДОС ВИР) сохраняются образцы 320 сортов культурного и 25 экотипов дикорастущего винограда, разнообразные по происхождению и морфологическим признакам. Как и для любой коллекции генетических ресурсов, вопрос генетической паспортизации образцов винограда является весьма актуальным. Геном *Vitis vinifera* L. содержит множество полиморфных микросателлитных локусов, аллельное разнообразие которых может быть использовано для выявления генетической структуры коллекции, а также идентификации дублетов. В задачу настоящего исследования входило оценить уровень полиморфизма четырех микросателлитных локусов, ранее рекомендованных для целей сортовой идентификации у винограда, на материале ампелографической коллекции (ДОС ВИР). **Материалы и методы.** Анализ микросателлитных локусов проводился на основе ПЦР с опубликованными праймерами, размеры амплифицированных аллелей оценивали с использованием генетического анализатора НАНОФОР 05 (ИАП РАН, Россия). Результаты анализа обрабатывали с использованием программы Structure 2.3.4. Основные показатели полиморфизма локусов (коэффициент информативности PIC, гетерозиготность) определяли с использованием программы GenAIEx 6.2. **Результаты и заключение.** По результатам анализа полиморфизма четырех микросателлитных локусов VVS2, VVMD27, VVMD31, VVMD28, у 221 образца винограда коллекции ДОС ВИР отмечен высокий уровень гетерозиготности изученных локусов (0,50–0,83), число выявленных аллелей варьировало от 17 до 19, суммарно было выявлено 70 аллелей. Не удалось установить связь между комбинацией аллелей четырех микросателлитных локусов и принадлежностью образца к какой-либо эколого-географической группе или группе сортов. Для выявления генетической структуры коллекции необходимо вовлечение в анализ большего числа микросателлитных локусов.

IDENTIFICATION OF THE DIVERSITY OF CULTIVATED PLANTS AND THEIR WILD RELATIVES FOR SOLVING FUNDAMENTAL AND APPLIED PROBLEMS

DOI:10.30901/2227-8834-2018-3-224-234

ORIGINAL ARTICLE

M. M. Agakhanov,
V. A. Volkov,
P. S. Ulianich,
K. M. Abdullaev,
E. N. Kislin

N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources,
42, 44, Bolshaya Morskaya St.,
St. Petersburg, 190000, Russia,
e-mail: kislin@yandex.ru

Key words:
plant genetic resources, grape, *ex situ* collections, genetic structure, microsatellite markers

Received:
20.09.2018

Accepted:
19.09.2018

POLYMORPHISM OF MICROSATELLITE LOCI WITHIN THE GRAPE GERMPLASM COLLECTION MAINTAINED AT THE DAGESTAN EXPERIMENT STATION OF VIR

Background. Ampelographical collection of the VIR experiment station in Dagestan comprises 320 accessions of grape cultivars and 25 ecotypes of wild grape species, that are highly polymorphic in their morphological traits. As for any other large germplasm collections, the problem of genetic identification of the accessions and their originality is critical for the ampelographical collection. Genome of *Vitis vinifera* L. contains many polymorphic microsatellite loci, their allele diversity could be used to reveal the genetic structure of the ex situ collection as well as for the identification of duplicates. The task of the study was to estimate the level of polymorphism of four microsatellite loci that were previously recommended for the genotyping purposes in grape. The grape collection of Dagestan experiment station of VIR was investigated. **Materials and methods.** The analysis of microsatellite loci was based on PCR with the primers that were published previously. The size of alleles was estimated with Nanophor 05 sequencer (Syntol, Moscow). The results of the collection screening with the microsatellite markers were analyzed with Structure 2.3.4 software. The main characteristics of microsatellite loci (Polymorphic Information Content, heterozygosity) were determined using GenAIEx 6.2 program. **Results and conclusion.** The high level of polymorphism of the microsatellite loci VVS2, VVMD27, VVMD31, VVMD28 were detected when studying 221 accessions of the grape collection at the Dagestan experiment station. Heterozygosity of the loci was 0,50–0,83, the number of alleles per locus varied between 17 and 19, in total 70 alleles was detected. No relationship was detected between the allele combinations of accessions and their eco-geographical origin or any particular cultivar group. To reveal the genetic structure of the grape germplasm collection the larger number of SSR loci should be involved.

Введение

Ампелографическая коллекция на филиале Дагестанская опытная станция ВИР (ДОС ВИР), расположенная вблизи г. Дербента, была заложена в 1975 г. при участии П. М. Пирмагомедова и включала изначально 700 образцов: 300 дикорастущих форм и 400 сортов культурного винограда. Дикорастущие формы *Vitis vinifera* L. subsp. *sylvestris* (Gmelin) Hegi были собраны в ходе экспедиций по Кавказу в период 1970–80 гг. В дальнейшем, к концу 1990-х годов, коллекция сократилась до 350 образцов. Для культуры винограда всех сроков созревания, начиная от сверхранних и до очень поздних сортов, условия ДОС ВИР благоприятны в силу длительного безморозного периода, высоких сумм активных температур и низкой вероятностью снижения минусовых температур в зимнее время до критических значений. Случались исключения в виде холодной зимы 2012 года, когда февральские морозы опускались до -23°C , в результате чего некоторые сорта европейско-азиатского винограда (*V. vinifera*) пострадали в различной степени от низких минусовых температур.

В настоящее время коллекция винограда, поддерживаемая в живом виде на ДОС ВИР, включает 320 сортов культурного и 25 экотипов дикорастущего винограда, отличающихся по морфологическим признакам. Как и для любой коллекции генетических ресурсов, вопрос генетической паспортизации образцов винограда является весьма актуальным. В ампелографии традиционным методом идентификации сортов является анализ морфологических признаков, таких как форма, величина листьев, обеополосность цветка, размер, форма плотность грозди, величина, форма ягод, период их созревания и многие другие.

Новые возможности для сортовой идентификации и организации работы с коллекциями генетических ресурсов винограда появились с развитием технологий молекулярного маркирования и ДНК-секвенирования (Troggio et al., 2007). Первый шаг по внедрению ДНК-маркеров в практику сортовой идентификации был сделан в 2010 году, когда Международным союзом по охране новых сортов растений (UPOV) было разработано руководство по ДНК-профилированию сортов «Подбор молекулярных маркеров и создание баз данных» (Guidelines for DNA-Profiling..., 2010). В нем были сформулированы основные критерии для выбора методологии молекулярного маркирования ДНК: высокий уровень полиморфизма выбранных маркеров, воспроизводимость результатов в любой лаборатории и на любом оборудовании, высокая информативность, возможность документирования в базах данных, и в качестве рекомендаций – известная локализация на хромосомах, позволяющая избежать маркирования сцепленных локусов, а также предпочтение маркеров без «нулевых» аллелей. Микросателлитные маркеры (SSR, Single Simple Repeats) рассматривались в качестве наиболее полиморфных, легко считываемых, стабильных и кодоминантных (Akkaya et al., 1992; Röder et al., 1995; Powell et al., 1996). В настоящее время, согласно UPOV, рекомендуемыми методами молекулярного маркирования для целей сортовой идентификации являются микросателлитные маркеры и одиночные нуклеотидные замены (SNP, Single Nucleotide Polymorphism). Оба метода отличаются воспроизводимыми результатами, независимыми от специфического оборудования или реагентов, которые можно воспроизвести в разных лабораториях, документировать и занести в базу данных.

Геном *V. vinifera* содержит множество микросателлитных локусов, в высшей степени полиморфных (Dokupilová et al., 2013). Исследованиями Thomas et al. (1993a) было показано, что в геноме винограда преобладают микросателлитные

локусы, содержащие дву- и трехнуклеотидные повторы (GT) n , (GA), (CAC), (GACA) n , (GATA) n . При этом установлено, что повторы GA and GT наиболее многочисленны и распространены по всему геному. Позднее те же авторы сообщали, что для разработанных ими микросателлитных маркеров была выявлена высокая (69%–88%) степень гетерозиготности и высокий уровень межсортовой изменчивости (Thomas et al., 1993b). Анализ полиморфизма всего пяти микросателлитных локусов среди 26 сортов *V. vinifera* позволил выявить 13, 12, 8, 5, и 4 аллеля соответственно. Важным обстоятельством является тот факт, что последовательности геномной ДНК, фланкирующие микросателлитные повторы, являются довольно консервативными, позволяя использовать праймеры, разработанные для *V. vinifera*, также и для анализа других видов *Vitis*.

Задача настоящего исследования состояла в том, чтобы оценить уровень полиморфизма четырех микросателлитных локусов, ранее рекомендованных для целей сортовой идентификации у винограда, на материале ампелографической коллекции на филиале Дагестанская опытная станция ВИР.

Материал и методы исследования

ДНК выделялась из свежих листьев модифицированным СТАВ-методом с добавлением 2-меркаптоэтанола (Rahimah et al., 2006).

Навеску 0,16 г листьев, замороженных в жидким азоте, гомогенизировали с использованием вибрационной мельницы (Retsch MM 400, Германия) в стерильных центрифужных пробирках объемом 2 мл (Axygen, США). После измельчения к гомогенату добавляли 800 мкл СТАВ буфера (2% СТАВ w/v, 20 мМ EDTA, pH 8,0, 1,4 М NaCl, 100 мМ трис-HCl, pH 8,0, 5 мМ аскорбиновой кислоты, 4 мМ диэтилдитиокарбаминовой кислоты и 2% поливинилпирролидон-40) и 3,2 мкл 2-меркаптоэтанола. Смесь перемешивали и инкубировали в течение 30 мин в твердотельном термостате (Термит ДНК-технологии, Россия) при 60°C. После инкубации к смеси добавляли 800 мкл хлороформ-изоамиловой смеси (24 : 1), перемешивали на вортексе (Biosan, Латвия) и центрифугировали в течение 15 мин при температуре 20°C и 10000 об/мин. После центрифугирования верхнюю водную фазу переносили в стерильные пробирки объемом 2 мл. ДНК осаждалась из водной фазы добавлением 200 мкл ледяного изопропанола. Затем пробирки охлаждались при –20°C в морозильной камере в течение 1 ч и центрифугировались при 4°C и 12000 об/мин в течение 15 мин. Полученный осадок ДНК промывали в 200 мкл промывочного буфера (76% этанола, 10 мМ ацетата аммония). Осадок высушивали от остатков спирта и промывочного буфера и растворяли в 160 мкл TE буфера – 10 мМ трис-HCl (pH 8,0) и 1 мМ ЭДТА (pH 8,0). В раствор ДНК добавляли 0,2 мкл РНКазы (10 мг/мл) и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Далее в раствор добавляли 80 мкл 7,5M ацетата аммония (pH 7,7) и охлаждали на льду в течение 20 мин. Смесь центрифугировали в течение 15 мин при 12000 об/мин и 4°C. После центрифугирования супернатант переносили в стерильные микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл и ДНК повторно осаждалась добавлением 600 мкл этанола. Раствор охлаждали в морозильной камере 1 ч при –20°C, центрифугировали при 12000 об/мин и 4°C в течение 15 мин. Супернатант удаляли, осадок промывали в 400 мкл 70% этанола. Осадок высушивали от остатков спирта и растворяли в 60 мкл TE буфера. Полученная ДНК оценивалась на нано-спектрофотометре Implen N60 (Германия) и в 1% агарозном геле.

Для амплификации микросателлитных локусов использовали опубликованные праймеры (табл. 1) с флуоресцентными метками на 5' концах прямых праймеров.

Таблица 1. Праймеры микросателлитных локусов, использованные для генотипирования образцов винограда коллекции ДОС ВИР
Table 1. Primers of the microsatellite loci used for genotyping of grape accessions maintained at Dagestan Experiment Station of VIR

SSR локус	Праймер прямой	Праймер обратный	Литературный источник
VVS2	/FAM/-CAGCCCGTAAATGTATCCATC	AAATTCAAAATTCTAATTCAACTGG	Thomas et al., 1993b
VVMD 27	/ROX/-GTACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT	ACGGGTATAGAGCAAACGGTGT	Bowers et al., 1999
VVMD 31	/R6G/-CAGTGTTCCTAAAGTTCAAGG	CTCTGTGAAAGAGGAAGAGACGC	Bowers et al., 1999
VVMD 28	/TAMRA/-AACAAATTCAATGAAAAGAGAGAGAGA	TCATCAATTTCGTATCTCTATTGCTG	Bowers et al., 1999

Полимеразно-цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 (США). Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 1xПЦР буфера, 1,5 ммоль MgCl₂, 200 мкмоль каждого dNTPs, 2,5 пмоль каждого из праймеров, одну единицу Та^q ДНК-полимеразы (Силекс, Москва) и 30–60 нг исследуемой ДНК. Амплификация проводилась в режиме touchdown: 5 мин при 94°C, далее 5 циклов (50 сек при 94°C, 50 сек при 62–57°C с понижением температуры отжига на 1°C за каждый цикл, 50 сек при 72°C), далее 32 цикла (50 сек при 94°C, 50 сек при 57°C, 50 сек при 72°C) с последующим охлаждением до 4°C.

Анализ размеров амплифицированных фрагментов проводили на генетическом анализаторе НАНОФОР 05 (ИАП РАН, Россия). Продукты амплификации, полученные для каждого растения с праймерами для четырех исследуемых локусов, смешивали и разводили в 100 раз. Детекционная смесь состояла из 1 мкл смеси разведенных продуктов амплификации, 1 мкл размерного стандарта (СД-450, Синтол, Россия) и 9 мкл Hi-Di формамида (Thermo Fisher, США). Смесь денатурировали при 95°C 5 мин и охлаждали во льду.

Полиморфизм микросателлитных локусов анализировали с помощью программы Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Анализ в Structure 2.3.4 проводился с использованием следующих параметров: burn-in period 100 000, MCMC 600 000, admixture model, вероятное количество кластеров указывалось от 2 до 15.

Для каждого микросателлитного маркера был рассчитан коэффициент информативности (PIC, Polymorphic Information Content) по формуле $PIC = 1 - \sum(P_j)^2$, где P_j это частота встречаемости j-той аллели, суммированная для всех аллелей этого локуса у всех проанализированных генотипов в выборке. Показатели полиморфизма локусов в выборке определяли с использованием программы GenAlEx 6.2 (Peakall, Smouse, 2006).

Результаты и обсуждение

Генетическое разнообразие коллекции винограда филиала Дагестанская опытная станция ВИР

Изначально коллекция ДОС ВИР была заложена старинными дагестанскими аборигенными сортами, которые выращивались в Дагестане в течение нескольких столетий. Сейчас в коллекции насчитывается более 80 таких сортов, в том числе сорта народной селекции: ‘Хатми’, ‘Эмчек изюм’ («Козы соски»), ‘Гезен даи’,

‘Сарах’, ‘Гюлле изюм’, ‘Баят капы’ («Старые ворота»), ‘Шавраны’, ‘Беневш чакрак’, ‘Хадисиль цибил’, ‘Марагинский черный’, ‘Риш баба черный’ и другие. К новым сортам местной дагестанской селекции относятся сорта, выведенные на Дербентской опытной станции садоводства, виноградарства и виноделия, такие как ‘Гимра новый’, ‘Мускат южнодагестанский’, ‘Самур’. Доля дагестанских сортов, аборигенных и выведенных недавно, составляет более 30% от общего числа всей коллекции. В основном они принадлежат к группе восточных сортов (*convar orientalis* Negr.), также как и сорта, полученные из Азербайджана, Узбекистана, Таджикистана, Туркмении, Ирана, число которых превышает 60 (Kislin, 2015).

Следует отметить, что местные дагестанские сорта неоднородны по своему происхождению и принадлежат трем известным группам сортов: западноевропейской, бассейна Черного моря и восточной. (Negril', 1946)

Среди новых сортов, выведенных в Дагестане, есть гибриды, полученные в результате внутривидового скрещивания *V. vinifera*, например, сорт ‘Слава Дербента’, полученный в Северокавказском федеральном научном центре садоводства, виноградарства, виноделия.

В 1980-х годах коллекция пополнилась сортами европейского происхождения, которые относятся к группе западноевропейских сортов (*convar occidentalis* Negr.) и достаточно широко распространены во Франции, Испании, Португалии, Германии и Молдавии. В частности, в коллекции имеются сорта, полученные из Франции: ‘Шасла мускатная’, ‘Алиготе’, ‘Мозак белый’, ‘Пино серый’, ‘Пино черный’. Имеются в коллекции малораспространенные сорта, например, винный поздносозревающий сорт ‘Донзелино’, интродуцированный из Португалии, а также сорт универсального назначения ‘Гран нуар де ля Кальмет’ – из Франции.

Достаточно широко в коллекции представлены образцы европейско-азиатского винограда восточной группы сортов, полученных еще в советское время из бывших среднеазиатских республик СССР: Узбекистана, Туркмении, Таджикистана и Киргизии. В частности, из Узбекистана были интродуцированы 27 сортов, среди которых ‘Мускат узбекистанский’, ‘Кишмиш ВИРа’, ‘Волго-Дон’, ‘Ранний ВИРа’, а также ‘Кишмиш Хишрау’, автором которого был известный специалист в области ампелографии К. В. Смирнов. Генофонд винограда Туркмении, Азербайджана, Ирана и Таджикистана представлен 24 сортами преимущественно восточной группы, среди которых некогда популярные и широко возделываемые на территории СССР: ‘Тагоби’, ‘Нимранг’, ‘Баян Ширей’, ‘Матраса’.

В ампелографической коллекции станции присутствуют и крымские сорта из коллекции Института вина и винограда «Магарач». Среди них аборигенные сорта Крыма ‘Мускат черный’ и ‘Сафта Дурмаз’, а также сверххранний сорт ‘Ранний Магарача’, получивший самое широкое распространение не только в южных, но и в более северных районах виноградарства благодаря своему очень раннему созреванию. В коллекции присутствует новый сорт ‘Шоколадный’ крымской селекции, который отличается не только повышенной устойчивостью к болезням, но и способностью к длительному хранению урожая (Troshin et al., 2010).

В коллекции ДОС ВИР представлен также генофонд винограда, полученный советскими селекционерами К. П. Скуиня, Я. И. Потапенко, А. Я. Кузьминым, И. М. Филиппенко и другими, работавшими в ТСХА, ВНИИВиВ (Новочеркасск), ЦГЛ им. И. В. Мичурина. В частности, в коллекции присутствует редкий для российских ампелографических коллекций сорт ‘Тамбовский ранний’, а также широко распространенные европейско-амурские гибриды, например, ‘Платовский’, ‘Муромец’, ‘Агат донской’. Пополняют список коллекции стародавние аборигенные сорта, завезенные из Аравии, к которым относятся

широко известные ‘Тайфи розовый’ и ‘Мускатalexандрийский’ (Kats, 1955; Negru!, 1954).

В коллекции сохранились мичуринские сорта ‘Русский Конкорд’ и ‘Сеянец Маленгра’, которые в 1930-50-х годах использовались последователями И. В. Мичурина в качестве доноров устойчивости к низким температурам при выведении новых сверхранних сортов для районов северного виноградарства. Также имеются 24 сорта, полученные из Грузии и Армении. Это знаменитый грузинский сорт ‘Мцване кахетинский’, относящийся к сортам бассейна Черного моря, а также поздносозревающий армянский сорт ‘Мсхали’, относящийся в группе восточных сортов (Sesiashvili, Tabidze, 1954; Azizian, Mkrtchan, 1954).

Результаты микросателлитного анализа

В проведенном исследовании 221 образец винограда коллекции ДОС ВИР был проанализирован на предмет полиморфизма четырех микросателлитных локусов VVS2, VVMD27, VVMD31, VVMD28, ранее рекомендованных для целей сортовой идентификации у винограда (Thomas et al., 1993b; Bowers et al., 1999). Число выявленных аллелей, гетерозиготность (процент выявленных гетерозигот к общему числу проанализированных растений) для каждого микросателлитного локуса представлены в таблице 2.

Таблица 2. Изменчивость микросателлитных локусов по результатам генотипирования 221 образца винограда коллекции ДОС ВИР
Table 2. Variability of the microsatellite loci revealed by genotyping of 221 grape accessions maintained at Dagestan Experiment Station of VIR

Локус	VVS2	VVMD27	VVMD31	VVMD28
Число аллелей	17	17	17	19
Гетерозиготность	0,836	0,675	0,723	0,503
Размер фрагментов (пн)	121-169	172-212	196-250	218-276
PIC, Polymorphic Information Content	0,87	0,85	0,80	0,87

Как следует из таблицы 2, в общей сложности для четырех проанализированных микросателлитных локусов было выявлено 70 аллелей. Для каждого маркера был рассчитан коэффициент информативности PIC, значения которого были достаточно высоки и варьировали в пределах 0,80–0,87. Частота встречаемости аллелей каждого локуса среди 221 образца винограда представлена на рисунке 1.

Генетическая структура коллекции винограда ДОС ВИР по данным полиморфизма микросателлитных локусов была проанализирована с помощью программы Structure 2.3.4, основанной на вероятностной модели Бейса (Bayesian method). Метод позволяет обнаружить генетическую структуру популяции, размещая отдельные индивидуумы в наиболее вероятное число кластеров (K), в пределах которых отклонение от равновесия Харди-Вайнберга было бы минимальным. Вероятность числа кластеров в изучаемой выборке (K) оценивалась в диапазоне от 1 до 15, для каждого значения K выполнялось 10 повторов анализа. Наиболее вероятное число кластеров (K), то есть объективно обоснованных генетических групп в изучаемой выборке, определялось согласно алгоритму, предложенному Evanno et al. (2005) и оказалось равным двум (рис. 2).

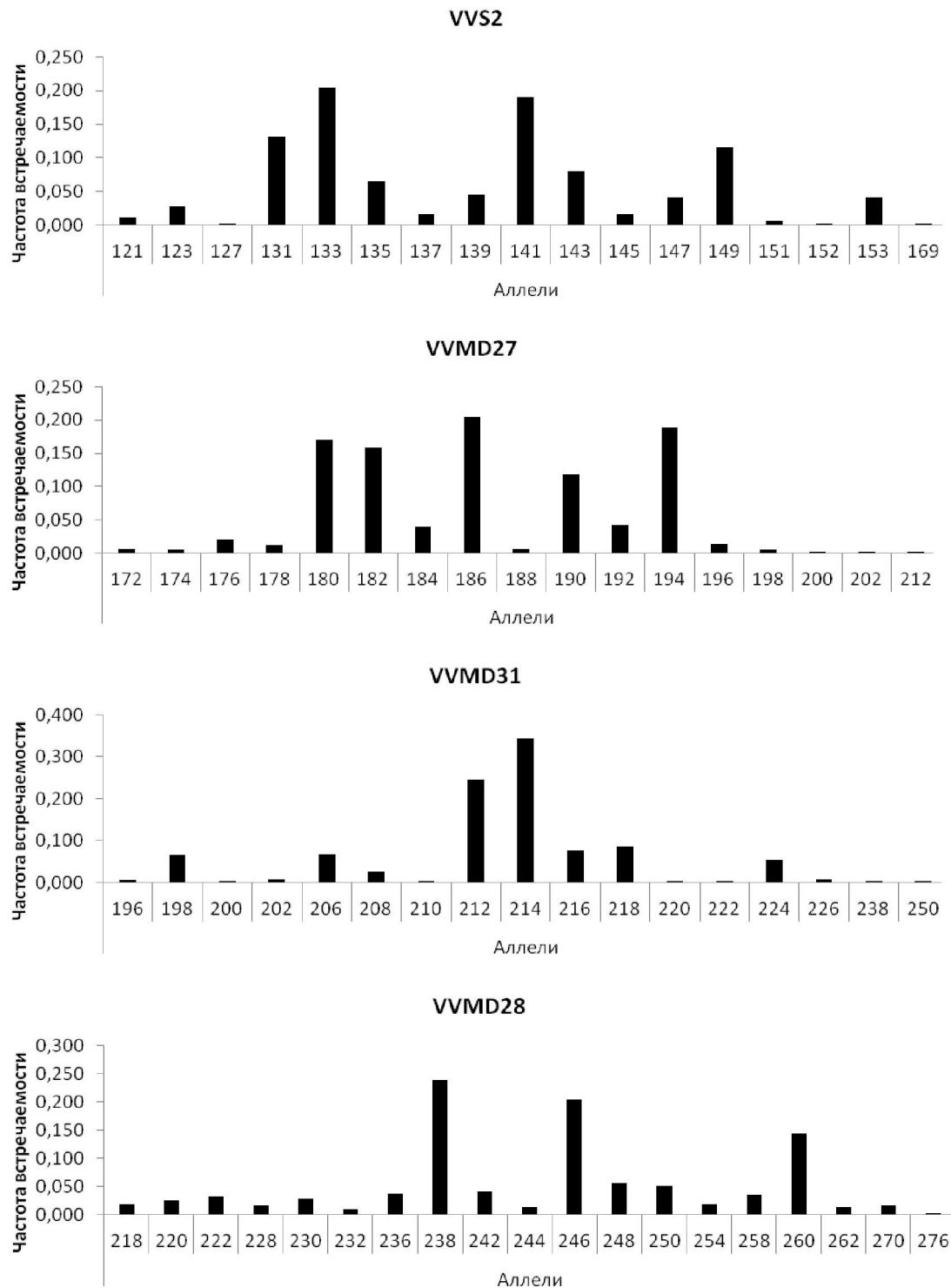


Рис. 1. Частота встречаемости аллелей микросателлитных локусов VVS2, VVMD27, VVMD31, VVMD28 среди образцов винограда коллекции ДОС ВИР

Fig. 1. Allele frequencies of SSR loci among grape accessions maintained at Dagestan Experiment Station of VIR

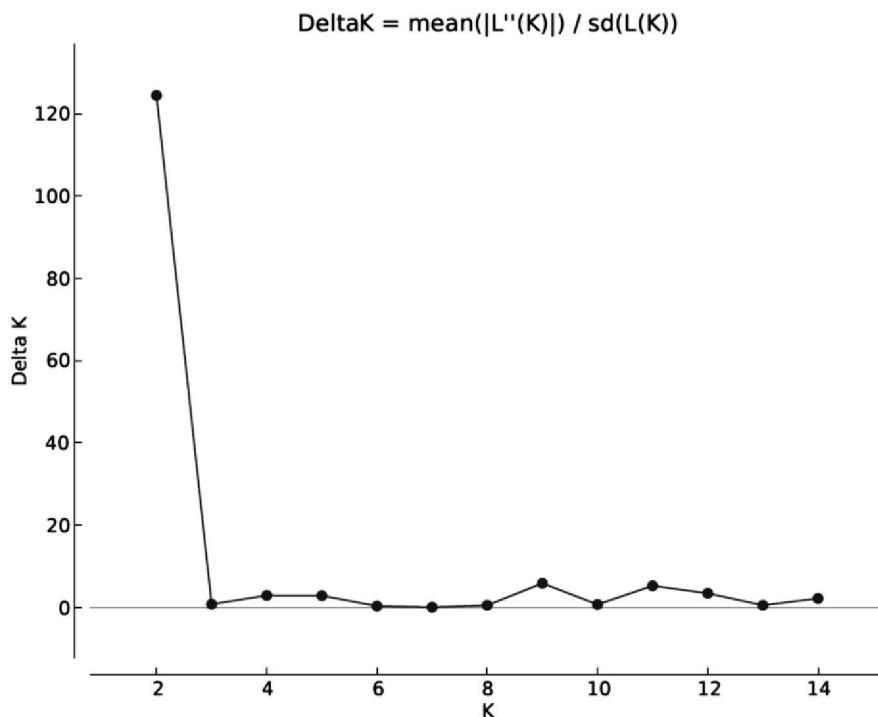


Рис. 2. Вероятность числа кластеров (К) – генетически обособленных групп – среди 221 образца коллекции винограда ДОС ВИР по результатам генотипирования по 4 микросателлитным локусам

Fig. 2. Probability of number of clusters (K), the genetically segregated groups, among 221 grape accessions maintained at the Dagestan Experiment Station of VIR

Таким образом, огромное разнообразие изучаемой коллекции как по происхождению, так и по морфологическим признакам образцов, не отражается в результатах анализа полиморфизма четырех микросателлитных локусов, несмотря на высокую степень их гетерозиготности, и показателей PIC. Это свидетельствует о том, что для культуры винограда степень генетического сходства образцов можно оценить объективно, лишь вовлекая в анализ большое число полиморфных локусов, равномерно распределенных по геному. Анализ изменчивости лишь четырех микросателлитных локусов, даже очень полиморфных, не позволяет выявить генетическую структуру изучаемой ампелографической коллекции.

С другой стороны, в процессе исследования были выявлены случаи явных неточностей в идентификации образцов винограда изучаемой коллекции. Так, например, образец с названием сорт ‘Изабелла’ имел генетический профиль, идентичный выявленному для образцов дикорастущего вида *V. sylvestris* W. Bartram. Сходный с «дикарями» набор аллелей был выявлен и у сортов ‘Тамбовский ранний’, ‘Ливадийский черный’, относящихся к группе европейско-амурских гибридов. Подобные случаи описывались по результатам анализа зарубежных коллекций, так, Labra et al. (2002) сообщали, что среди 19 наиболее распространенных староместных испанских сортов, проанализированных по 12 микросателлитным локусам, были обнаружены «разные» сорта, совершенно идентичные по результатам генотипирования, и, наоборот, под одним и тем же названием сорта обнаруживались совершенно различные генотипы.

В литературе накоплено много примеров попыток провести сортовую идентификацию или установить происхождение сортов винограда

с использованием микросателлитного анализа. Moreno-Sanz et al. (2011) проанализировали 293 образца из виноградников северных районов Испании, задействовав 9 локусов. Все проанализированное разнообразие свелось к 42 различающимся генотипам. Только 27 из них оказались идентичными зарегистрированным сортам, внесенным в национальные базы данных. Возможно, вовлечение в анализ большего числа локусов повысило бы точность анализа и выявило большее разнообразие изученных сортов. Авторы сообщали, что несмотря на явную генетическую эрозию генофонда староместных испанских сортов, изменчивость микросателлитных локусов оказалась гораздо выше ожидаемой.

Заключение

Ампелографическая коллекция на филиале Дагестанская опытная станция ВИР содержит большое разнообразие как староместных дагестанских сортов, так и сортов западноевропейского и азиатского происхождения, а также образцы дикорастущих видов, собранных в экспедициях ВИР по Кавказу. Для полного и объективного описания этого генетического разнообразия на уровне ДНК могут быть использованы микросателлитные маркеры, демонстрирующие высокий уровень полиморфизма, отраженный в показателях гетерозиготности и коэффициента информативности РIC. Несмотря на полиморфизм, число анализируемых микросателлитных локусов является критичным для определения генетической структуры коллекции образцов винограда. Даже если общее число аллелей, по которым проводится анализ, достаточно велико, имеет значение, сколько локусов было проанализировано. В проведенном исследовании анализ 70 аллелей 4 микросателлитных локусов, ранее рекомендованных для сортовой идентификации винограда, не позволил выявить какой-либо связи между генотипом образца и его происхождением согласно паспортным данным. С другой стороны, не исключены ошибки в названиях, присвоенных образцам на основании морфологических признаков.

Работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР по теме № 0662-2018-0012 «Создание теории и методологии оценки генетического разнообразия генетической стабильности и генетической уязвимости сохраняемых в ex situ коллекциях и произрастающих in situ видов, сортов и популяций культурных растений и их диких родичей», номер государственной регистрации ЕГИСУ НИОКР AAAA-A16-116040710364-9.

References/Литература

- Akkaya M. S., Bhagwat A. A., Cregan P. B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean // Genetics, 1992, vol. 132. pp. 1131–1139.
Azizian E. G., Mkrtchan Sh. M. Mskhali // Ampelografiya SSSR (Ampelography of the USSR). Moscow, 1954, vol. 4 : Chastnaya ampelografiya. Standartnye i perspektivnye sorta vinograda [Private ampelography. Standard and perspective grape varieties], pp. 118–127. (Азизян Э. Г., Мкртчан Ш. М. Мсхали // Ампелография СССР. М., 1954. Т. 4 : Частная ампелография. Стандартные и перспективные сорта винограда. С. 118–127).
Bowers J. E., Dangl G. S., Meredith C. P. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape // American Journal of Enology and Viticulture, 1999, vol. 50, no. 3. pp. 243 – 246.
Dokupilová I., Šturdíka E., Mihálík D. Characterization of vine varieties by SSR markers // Acta Chimica Slovaca, 2013, vol. 6, no. 2, pp. 227–234.

- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study // Mol. Ecol., 2005, vol. 14, pp. 2611–2620.
- Guidelines for DNA-Profiling: Molecular Marker Selection and Database Construction (“BMT Guidelines”) UPOV/INF/17/1. http://www.upov.int/en/publications/information_documents_index.htm
- Kats Ya. F. Tayfi rozovyy // Ampelografiya SSSR (Ampelography of the USSR). Moscow, 1955, vol. 5 : Chastnaya ampelografiya. Standartnye i perspektivnye sorta vinograda [Private ampelography. Standard and perspective grape varieties], pp. 414–422 [in Russian] (Кат Я. Ф. Тайфи розовый // Ампелография СССР. М., 1955. Т. 5 : Частная ампелография. Стандартные и перспективные сорта винограда. С. 414–422).
- Kislin E. N., Nosulchak V. A., Dzyubenko N. I. Ampelographic collection of the Vavilov Institute: past, present and future // Magarach. Viticulture and Winemaking. 2015, no. 3, pp. 14–16 [in Russian] (Кислин Е. Н., Носульчак В. А., Дзюбенко Н. И. Ампелографическая коллекция ВИР им. Н. И. Вавилова. Прошлое, настоящее и будущее // Магарач. Виноградарство и виноделие. 2015, № 3, С. 14–16).
- Labra M., Moriondo G., Schneider A., Grassi F., Failla O., Scienza A., Sala F. Biodiversity of grapevines (*Vitis vinifera* L.) grown in the Aosta Valley // Vitis, 2002, vol. 41 (2), pp. 89–92.
- Moreno-Sanz P., Loureiro M. D., Suárez B. Microsatellite characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) genetic diversity in Asturias (Northern Spain) // Sci. Hortic., 2011, vol. 129, pp. 433–440.
- Negrul' A. M. Muskat aleksandriyskiy // Ampelografiya SSSR (Ampelography of the USSR). Moscow, 1954, vol. 4 : Chastnaya ampelografiya. Standartnye i perspektivnye sorta vinograda [Private ampelography. Standard and perspective grape varieties], pp. 149–167 [in Russian] (Негруль А. М. Мускат Александрийский // Ампелография СССР. М. 1954. Т. 4 : Частная ампелография. Стандартные и перспективные сорта винограда. С. 149–167).
- Negrul' A. M. Proiskhozhdenie kulturnogo vinograda i ego klassifikatsiya [Negrul A. M. Origin of cultivated grapevines and their classification] // Ampelografiya SSSR (Ampelography in the USSR). Moscow, 1946, vol. 1 : Obshchaya ampelografiya (General ampelography), pp. 159–216 [in Russian] (Негруль А. М. Происхождение культурного винограда и его классификация // Ампелография СССР. 1946. Т. 1 : Общая ампелография. С. 159–21).
- Peakall R. O. D., Smouse P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Molecular ecology notes. 2006, vol. 6, no. 1, pp. 288–295.
- Powell W., Machray G. C., Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats // Trends Plant. Sci., 1996, vol. 1, pp. 215–221.
- Pritchard J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000, vol. 155, pp. 945–959.
- Rahimah A. B. et all. Freeze-drying of oil palm (*Elaeis guineensis*) leaf and its effect on the quality of extractable DNA // J. Oil Palm Res., 2006, vol. 18, pp. 296–304.
- Röder M. S., Plaschke J., König S. U., Börner A., Sorrells M. E., Tanksley S. D., Ganap M. W. Abundance, variability and chromosome location of microsatellites in wheat // Mol. Gen. Genet., 1995, vol. 246, pp. 327–333.
- Sesiashvili A. L., Tabidze D. I. Mczvane kaxetinskij // Ampelografiya SSSR (Ampelography of the USSR). Moscow, 1954, vol. 4 : Chastnaya ampelografiya. Standartnye i perspektivnye sorta vinograda [Private ampelography. Standard and perspective grape varieties], pp. 302–317 [in Russian] (Сесиашвили А. Л., Табидзе Д. И. Мцване кахетинский // Ампелография СССР. М., 1954. Т. 4 : Частная ампелография. Стандартные и перспективные сорта винограда. С. 302–317).
- Thomas M. R., Matsumoto S., Cain P., Scott N. S. Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification // Theoretical and Applied Genetics, 1993a, vol. 86, pp. 173–180.
- Thomas M. R., Scott N. S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSS) // Theoretical and Applied Genetics, 1993b, vol. 86, no. 8, pp. 985–990.
- Troggio M. et all. A dense single-nucleotide polymorphism based genetic linkage map of grapevine *Vitis vinifera* L. anchoring Pinot Noir bacterial artificial chromosome contig // Genetics, 2007, vol. 176, pp. 2637–2650.
- Troshin L. P., Radchevskiy P. P., Simonova N. L. Innovations of wine growing in Russia. 11. The characteristics of perspective sorts of grapes // Polythematic online scientific journal of Kuban State Agrarian University. 2010, no. 55, pp. 222–227 [in Russian] (Трошин Л. П., Радчевский П. П., Симонова Н. Л. Новации виноградарства России. 11. Характеристики перспективных сортов винограда // Политехнический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2010. № 55. С. 222–227).