

УДК 634.8 + 631.52 + 581.167

UDC 634.8 + 631.52 + 581.167

**НОВАЦИИ ВИНОГРАДАРСТВА РОССИИ.
4. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ КЛОНОВОЙ
СЕЛЕКЦИИ ВИНОГРАДА**

**NOVATION OF VITICULTURE IN RUSSIA
4. DEVELOPMENT OF CLONE SELECTION
IN VITICULTURE**

Трошин Леонид Петрович
д. б. н., профессор

Troshin Leonid Petrovich
Dr. Sci. Biol., professor

Звягин Андрей Сергеевич
к. б. н., старший научный сотрудник

Zvyagin Andrey Sergeevich
Can. Biol. Sci., senior research scientist

*Кубанский государственный аграрный
университет, Краснодар, Россия*

*Kuban State Agrarian University,
Krasnodar, Russia*

Проведенный анализ степени генетического родства или разнообразия между клонами чёрноягодных сортогрупп Каберне-Совиньон и Мерло, как и белоягодных Мускат белый, Рислинг и Пино белый, позволил утверждать об объективности данных, полученных при использовании полиморфизма микросателлитных маркеров. Эти результаты послужили основанием для отбора, размножения и оформления размноженных протоклонов четырех вышеназванных сортогрупп в виде сортов-клонов для передачи их в госиспытание: Кабернек, Каберне фанагорийский, Клерет темрюкский, Мерлок, Пинок белый, Рислиналк, Рислинг анапский, Рислинг фанагорийский, Мускат темрюкский, Шардоне и др. Эти сорта-клоны, принятые Госсорткомиссией РФ, несомненно, будут способствовать обогащению виноградного сортимента Анапо-Таманской зоны Кубани, а, значит, и России

The analyze of the genetic relationship or diversity between clones was made by using the microsatellites in the groups with black berries: Cabernet-Sauvignon and Merlot, and with white berries: Muscat white, Riesling and Pinot. It was possible to approve the objective evidence on the polymorphism between these forms during this analyze. These results become the rationale for the selection, breeding and making registration of these protoclones of four above-named varieties groups in the varieties-clones for state research: Cabernek, Cabernet Fanogoriisky, Cleret temrukskii, Merlok, Pinot white, Rieslinalk, Riesling Anapa, Riesling Fanogoriisky, Muscat Temruk, Shardonek and others. These varieties-clones are accepted by State commission of Russia, they will enrich the viticulture assortment of Anapa-Tamanskay zones of Kuban, therefore Russia too

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ВИНОГРАД, СОРТ, КЛОН, ИЗМЕНЧИВОСТЬ, ПОПУЛЯЦИЯ, ЛИСТ, МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ, МИКРОСАТЕЛЛИТЫ, ДНК-МАРКЕРЫ

KEYWORDS: GRAPE, VARIETY, CLONE, VARIABILITY, POPULATION, LEAVE, MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS, MICROSATELLITIES, DNA-MARKERS

Введение

В настоящее время получение характеристик сортов связано с анализом их по комплексу количественных и качественных морфологических признаков, принятых Международной организацией винограда и вина (окраска цветка и ягоды, форма и тип опушения листовой пластинки, длина побега и др.). Однако полигенное наследование большей части этих признаков затрудняет интерпретацию полученных результатов.

По мнению большинства исследователей, проблема идентификации видов и сортов винограда останется неразрешенной до тех пор, пока не будут применены молекулярно-генетические критерии [9, 20–22, 27-28, 32, 37, 43, 54].

Традиционные методы идентификации сортов и клонов, изучение изменчивости и таксономии винограда, ампелографии и ампелометрии обычно базируются на описании морфологических различий сортов [2, 12, 13, 17]. Однако несколько ограничений накладываются на эти методы.

1. В течение вегетационного периода необходимо использование взрослых неповрежденных листьев.

2. Вызревшие черенки имеют лишь несколько (обычно 4) градаций морфологии.

3. Фенотипы растений очень сильно взаимодействуют с окружающей средой. Различные условия внешней среды могут вызывать морфологические изменения, касающиеся ампелографических признаков, внося свой вклад в ложную идентификацию [35, 48-49].

4. Общее количество сортов винограда в ампелографических коллекциях насчитывается до 42 650, большинство из них является результатом мутационного процесса или рекомбинации, и количество сортов постоянно увеличивается. Если даже сосредоточить все растения в идеальных условиях, будет тяжело дифференцировать все морфологические характеристики [23–24, 46].

5. Использование ампелографических методов требует знания индивидуальных особенностей каждого сорта в отдельности, однако никто не имеет доступа и необходимых знаний о тысячах разных сортов, возделываемых по всему миру, просто из-за того, что не каждая коллекция может содержать полностью все генетические ресурсы своего региона. Ампелографы обычно знают сорта винограда, которые используются в их регионе, и менее знакомы с сортовым составом в других регионах.

Частично недостатки традиционных методов оценки генотипов компенсируются использованием комплекса ампелографических признаков [13, 18, 52].

Вопросы идентификации генотипов винограда не менее важны и в процессе клоновой селекции. Чрезвычайно сложно дифференцировать генотипы, являющиеся модификантами в изогенной популяции сорта, фенотип которого изменчив в зависимости от влияния внешней среды и результатов взаимодействия генотип-среда. При этом ставится задача выявления генотипических вариаций среди массы фенотипически близких высокопродуктивных растений [16].

Именно развитие ДНК-маркеров позволило изменить такое состояние и дало возможность легко идентифицировать сорта до такой степени, что можно использовать людей без специальной ампелографической подготовки. Результаты не только объективны, но они также не зависят от условий окружающей среды и болезней, присутствующих в растениях. ДНК-маркеры стали одним из полезных средств, позволяющих решать во многих случаях проблемы, связанные с синонимами и неправильным названием [29, 31, 38-39, 44].

По этой причине требуются альтернативные методы сортовой и клоновой идентификации, которые бы лучше иллюстрировали различия на генетическом уровне [1, 5, 17].

Материал и методы

Среди основных направлений использования молекулярных маркеров при работе с генетическими ресурсами растений можно выделить следующие.

1. Интродукция генетических ресурсов растений: поиск нового разнообразия для привлечения в коллекцию; контроль процесса включения нового образца в коллекцию (для предотвращения дублирования).

2. Структура коллекции: выяснение с использованием молекулярных маркеров внутривидовых связей и межвидовых отношений; анализ родства видов и генотипов для наиболее эффективного подбора родительских пар при гибридизации.

3. Создание коллекций на основе использования молекулярных маркеров: идентификация и регистрация образцов коллекции; формирование стержневых коллекций; контроль генетической стабильности при создании коллекций *in vitro* [8].

4. Охрана авторских прав: идентификация и регистрация источников и доноров ценных признаков, решение спорных вопросов авторства сортов и образцов растений [7]. За последние 20 лет разнообразные методики по молекулярному маркированию использовались для решения многих из этих задач на уровне ДНК [7, 10, 19, 30, 34].

Следует отметить широкое использование молекулярных маркеров для оценки степени генетического родства культурных форм и оценки генетического разнообразия коллекций сортов.

Так, в одной из работ использовались 60 праймерных пар AFLP для поиска генетического разнообразия среди клонов таких сортов как Шардоне, Каберне-Совиньон, Мерло, Пино, в результате только клоны, принадлежащие к сортам Пино блан, Пино нуар, Пино гри показали достоверные отличия от контрольных сортов [25].

Другой группой ученых из Чили были изучены 56 клонов сорта Карменер и 75 клонов сорта Каберне–Совиньон по 91 микросателлиту. Уровень полиморфизма среди исследуемых генотипов группы Каберне-

Совиньон составил 5,9%, к тому же были найдены 17 полиморфных локусов [41].

Использование разнообразных методик (SSR, ISSR, AFLP and RAPD) для охарактеризования 1200 сортов и клонов, возделываемых в Австралии, выявили 10 новых форм сорта Рислинг (белый) [47].

Изучение клоновой популяции сорта Сангвиния, большинство клонов которой официально зарегистрированы в Национальном виноградном регистре, показало, что 28 являются идентичными контрольному клону SG12T. При этом лишь 6 из них (Сан-1, 6, Морелино, Поверина, Сангвинио форте и Брунелоне) являются генетически отличающимися от SG12T и между собой, что дало возможность выделить их в отдельные формы [30].

Также следует выделить работу по определению синонимов греческих генетических ресурсов. В ней использовались 11 SSR-маркеров для идентифицирования 50 генотипов. В результате были найдены две пары синонимов (Fileri Mantineias и Moshofilero; Moschato Mazas и Moschato Kerkyras), по другой паре (Fokiano и Giouroukiko) было выдвинуто предположение, что исследуемые формы являются клонами одного и того же сорта [36].

Учеными Ирана и США была проведена совместная работа по изучению 62 оснований с помощью 9 полиморфных микросателлитных локусов, анализ дендрограммы показал наличие трех клоновых форм (Askari, Vidane и Yaghoti) среди иранских столовых сортов [50].

Важно выделить работы:

– идентификация популяции сорта св. Tannat по 49 микросателлитным маркерам, при этом 8 клонов были разбиты на две группы [33];

– исследование и разбивка на три группы 50 клонов сорта Неббиоло, принадлежащих к пяти биотипам (Lampia, Bolla, Rose3, Michet

and Chiavennasca), с использованием морфологических, биометрических показателей и 5 микросателлитных локусов для создания ДНК-профилей [41];

– анализ 52 крымских, 27 молдавских и 24 российских сортов по 9 ядерным микросателлитным маркерам для изучения интродукции этих сортов. Уровень полиморфизма ядерных микросателлитов оказался хорошим, со средним значением 11,6 аллелей на локус. Большинство из этих сортов были разбиты на кластерные группы согласно их происхождению [29, 35].

Выполнен целый ряд работ по выяснению филогенетических отношений, “кросс-видовая транспортабельность” микросателлитных маркеров является очень привлекательной в определении *Vitis* и “интроспецифических гибридов”, используемым как подвои или первоначальный материал для размножения [45].

Изучение диких видов винограда по 10 нуклеотидным вариациям дало возможность понять, что амплифицированный фрагмент ДНК всегда длиннее у *V. vinifera*, чем у диких видов винограда.

Несомненным подтверждением ценности ДНК-маркеров в исследованиях такого рода также являются следующие работы:

– оценка генетического разнообразия 35 генотипов дикого винограда *Vitis vinifera subsp. sylvestris* (Gmelin) Hegi и 9 сортов, взятых в Восточной Австрии и Германии (долина Рейна), среди этих маркеров 17 были обнаружены только у возделываемых сортов и 7 – у *V. vinifera subsp. sylvestris* [33];

– изучение 406 культиваров в Испании по 8 микросателлитным маркерам, которые затем были разбиты на 46 сортовых групп, из которых 116 оказались интродуцированными генотипами;

– изучение гермоплазмы *Vitis vinifera D.C. El Bierzo* (Испания) – были получены профили 210 неизвестных генотипов, точность идентификации составила 98,6% [41].

При сравнении результатов кластеризации видов, сортов и клонов по признаку генетической близости в этих работах становится очевидным, что можно говорить о высокой степени достоверности информации, получаемой при анализе полиморфизма на уровне ДНК.

Все это показывает, что микросателлитные маркеры в сочетании с выраженностью ампелографических признаков предоставляют огромные возможности для изучения генотипического состава клонов винограда.

Подготовку растительного материала и экстракцию ДНК проводили, используя СТАВ-метод, модифицированный по следующей схеме [42].

Для выделения ДНК использовали листья ранее названных генотипов, которые были собраны с кустов в разных экологических условиях (учхоз «Кубань» Кубанского госагроуниверситета, ООО «Фанагория-Агро» и ЗАО «Победа» Темрюкского района) и помещены в азот при -70°C .

Листья растирали в жидком азоте до состояния светло-зеленой пудры, которую затем вносили в микропробирки с прогретым до 60°C 2хСТАВ буфером, содержащим 2% СТАВ (цетилтриметиламмоний бромид), 1,4 М хлористого натрия, 0,1 М трис-гидрохлорид, 20мМ ЭДТА (этилендиаминотетраацетат). При этом соблюдали соотношение 500 мкл буфера на 0,1 г ткани. Образцы прогревали 3 часа при 60°C , после чего вносили равный объем хлороформа и инкубировали при перемешивании в течение 20 минут.

На следующем этапе образцы центрифугировали 10 минут при 5 тыс.об./мин., отбирали супернатант и добавляли к нему 0,2 V 5хСТАВ буфера, содержащего 5% СТАВ и 350мМ ЭДТА и инкубировали 10 минут

при 60° С. После инкубации в пробирки с образцами вносили равный объем хлороформа и инкубировали при перемешивании 20 минут, центрифугировали 10 минут при 5 тыс. об./мин., отбирали верхнюю фазу в чистую пробирку, добавляли равный объем буфера для преципитации (1% СТАВ, 50мМ Трис-НСI, 10мМ ЭДТА) и оставляли на ночь при комнатной температуре. После преципитации ДНК осадок растворяли в 500 мкл солевого буфера (1М NaCl, 10мМ Трис-НСI, 1мМ ЭДТА), добавляли 1 мл этилового спирта (96%) и ставили при –20° С на 2–3 часа. По истечении этого времени центрифугировали образцы 10 минут при 13 тыс. об./мин., после чего осадок промывали 70% этиловым спиртом, высушивали и растворяли в 100 мкл. стерильной дистиллированной воды.

Концентрацию выделенной ДНК определяли спектрофотометрически по стандартной методике, а также методом разведений полученных препаратов с последующим их электрофорезом в 2% агарозном геле, содержащем 1 мкг/мл бромистого этидия и визуализацией в ультрафиолете. При этом исходили из того, что порог чувствительности бромистого этидия в агарозных гелях составляет 10 нг ДНК [40].

Результаты исследований

Для анализа генетического разнообразия генотипов двух мировой известности сортотипов Рислинг и Пино в ампелографической коллекции учхоза «Кубань» (под гор. Краснодаром) были использованы 6 нейтральных микросателлитных (SSR) маркеров: VRTAG79, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VRZAG62, VVS2 [46, 47]. Праймерные пары, фланкирующие указанные микросателлитные локусы, были синтезированы фирмой ЗАО «Синтол», Россия (табл. 1).

Таблица 1. - Нуклеотидная последовательность использованных в работе праймеров.

Праймер	Нуклеотидная последовательность	
VVS2	Передний	CAG CCC GTA AAT GTA TCC ATC
	Обратный	AAA TT C AAA ATT CTA ATT CAA CTG G
VrZag62	Передний	GGT GAA ATG GGC ACC GAA CAC ACGC
	Обратный	CCA TGT CTC TCC TCA GCT TCT CAG C
VrZag79	Передний	AGA TTG TGG AGG AGG GAA CAA ACC G
	Обратный	TGC CCC CAT TTT CAA ACT CCC TTC C
VVMD5	Передний	CTA GAG CTA CGC CAA TCC AA
	Обратный	TAT ACC AAA AAT CAT ATT CCT AAA
VVMD7	Передний	AGA GTT GCG GAG AAC AGG AT
	Обратный	CGA ACC TTC ACA CGC TTG AT

В ходе работы по отбору микросателлитных маркеров, полиморфных между исследуемыми генотипами для всех маркеров, были использованы одинаковые условия ПЦР, позволяющие получить максимальное количество продукта реакции. Наряду с этим, при таких условиях реакции возможен повышенный выход неспецифически-амплифицированных фрагментов, однако для определения наличия—отсутствия разницы в размерах продуктов реакции, а не ее величины, это не является серьезной помехой.

Ниже приведены параметры ПЦР, использованные в данном эксперименте:

– 9 минут при 94° С – начальная денатурация, затем следующие 35 циклов:

- 30 секунд денатурация при 94° С;
- 1 минута отжиг праймеров при 55° С;
- 2 минуты синтез при 72° С;

– последний цикл синтеза 5 минут при 72° С.

ПЦР смесь включала 10 нг ДНК, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTPs), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9,0, 0,1% Тритон X-100, 0,23 mM каждого праймера, 0,25 единицы Taq-полимеразы, в общем объеме 5 мкл. Амплификация была проведена в амплификаторе Chassis Express фирмы Thermo Hybaid.

Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 3% агарозном геле, на основе 0,5xТрис-боратного буфера (0,045 M Трис, 0,045 M Борной кислоты, 1 mM ЭДТА, pH=8,2) при напряжении 120V в течение 2,5 часов, в камерах для горизонтального электрофореза Sub Cell GT фирмы Bio-Rad.

Для электрофореза использовали весь реакционный объем (5 мкл), который смешивали с 1 мкл неденатурирующего буфера нанесения (40% сахара, 0,025% бромфеноловый синий, 0,025% ксилен цианол) и наносили в лунки геля под слой электродного буфера. В качестве электродного буфера использовали также 0,5xТрис-боратный буфер.

После проведения электрофореза гелевые пластины помещали на 20 минут в раствор бромистого этидия 5 мкг/мл и фотографировали в ультрафиолете.

Определение степени генетического родства с применением микросателлитных маркеров требует определения точной разницы в размерах амплифицированного участка ДНК у исследуемых сортов, поэтому необходим более детальный подход к установке параметров ПЦР, прежде всего это относится к температуре отжига праймерной пары. В связи с этим, экспериментально были подобраны оптимальные условия ПЦР, обеспечивающие высокий выход амплифицированного продукта наряду с минимальным количеством неспецифики:

– 5 минут при 94° С – начальная денатурация, затем следующие 30 циклов:

- 30 секунд денатурация при 94° С,
- 30 секунд отжиг праймеров при N° С,
- 30 секунд синтез при 72° С;
- последний цикл синтеза 3 минуты при 72° С.

Где N = 50° С для маркеров VrZag 62 и VrZag79; 52° С для маркера VVS2; 55° С для маркеров VVMD5 и VVMD7; 56° С для маркера VVMD27. Изначально температура отжига праймеров была рассчитана по формуле Dieffenbach C.W. [25]:

$T = 4^{\circ} \text{C} \text{ Ч} (G + C) + 2^{\circ} \text{C} \text{ Ч} (A + T) - 3$, где G, C, A, T – количество гуанидиновых, цитозиновых, адениновых и тиминовых оснований соответственно. Затем оптимальную температуру для каждой праймерной пары отбирали путем уменьшения или увеличения ее, в зависимости от качества получаемого ПЦР-продукта.

В состав ПЦР смеси входили: 40 нг ДНК, 0,05мМ dNTPs, 0,2мМ каждого праймера, 1 единица Taq-полимеразы, 25 мМ KCl, 60 мМ Tris-HCl, pH 8,5, 0,1% Тритон X-100, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 1,5мМ MgCl₂, в общем объеме реакционной смеси 25 мкл. Амплификация была проведена в амплификаторе Терцик, производства НПО ДНК-технологии, Россия.

Для электрофоретического разделения продуктов ПЦР использовали 8% акриламидный гель на основе 1xТрис-боратного буфера (0,09 М Трис, 0,09 М борной кислоты, 2 мМ ЭДТА, pH = 8,2). Полимеризацию геля проводили при комнатной температуре в течение 1 часа. В качестве катализаторов полимеризации использовали ТЕМЕД и аммония персульфат, из расчета 40 мкл ТЕМЕДа (100% раствор) и 350 мкл аммония персульфата 10%-ного на 40 мл раствора геля.

После окончания полимеризации лунки геля промывали электродным буфером (1xТрис-боратный буфер) и проводили предварительный электрофорез без внесенных образцов, для удаления из геля остатков катализаторов и незаполимеризовавшегося акриламида, при

напряжении 150 V, в течение 1 часа. После чего вносили в лунки геля по 10 мкл продуктов амплификации в неденатурирующем буфере нанесения (40% сахара, 0,025% бромфеноловый синий, 0,025% ксилен цианол), при этом соблюдали соотношение: продукты ПЦР/буфер нанесения = 5/1.

Электрофорез проводили при напряжении 250 V в течение 3–4 ч. В работе был использован аппарат вертикального электрофореза VE-3 фирмы Хеликон. После электрофореза гелевые пластины помещали на 30 минут в раствор бромистого этидия 5 мкг/мл и фотографировали в ультрафиолете.

Для выделения ДНК использовали бесхлорофилльные листья, получаемые путем проращивания черенков в камерах с водой в темноте при температуре 25–27° С.

Идентификацию и определение размеров аллелей микросателлитных локусов проводили с использованием программы Gel-Pro Analyzer 3.1.

Использование микросателлитных маркеров, обладающих высоким уровнем полиморфизма, дало возможность оценить генетические изменения исследуемых популяций винограда, а также получить достоверную и быструю информацию об исследуемых генотипах и выявить присутствие ложных форм винограда (табл. 2).

Идентификация и паспортизация сортов может выполняться на основании данных об аллельных состояниях использованных маркеров у каждого отдельно взятого генотипа, сорта или клона.

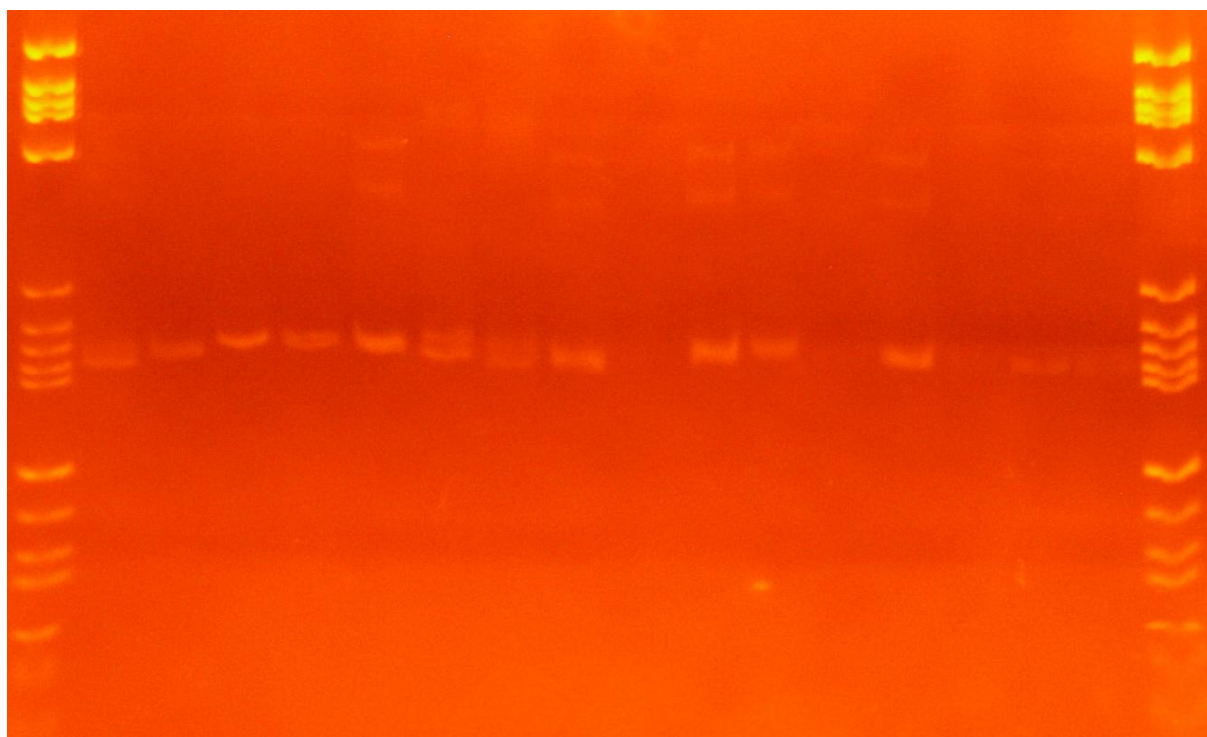
Таблица 2. – SSR-локусы, использованные для идентификации клонов и сортов винограда.

Маркер	Молекулярный вес (п.н.)	Число выявленных аллелей
VrZag79	236-260	9

Как видно из таблицы 2, маркер проявил различный уровень полиморфизма в сортотипах Рислинг и Пино белый: число выявленных аллелей равно 9, что свидетельствует об обоснованности дальнейшего использования этого маркера в клоновой селекции винограда с целью проведения генетической идентификации клонов.

На рисунке 1 представлено аллельное разнообразие маркера VrZag79, выявляемое в ходе электрофореза их продуктов ПЦР, позволяющее в дальнейшем правильно проанализировать исследуемые клоны.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



м.в. сорта

м.в

Рис. 1. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР маркера VrZag79.

Примечание: м.в. - маркер молекулярного веса ДНК; 1 и 17 – электрофоретические позиции продуктов ПЦР различных клонов и сортов винограда: 2 - Пино белый (контроль), 3 - Пино белый-31, 4 - Пино чёрный, 5 - Пино блан, 6 - Пино белый-32, 7 - Рислинг (контроль), 8 - Рислинг Алькадар-34, 9 - Рислинг Алькадар-34А, 11 - Рислинг Алькадар-34Б, 12 - Рислинг анапский, 14 - Рислинг-830, 15 - Рислинг-4-9-2, 16 - Рислинг-9-9-1.

После идентификации аллелей и определения их размеров был проведен учет частоты встречаемости аллелей по каждому маркеру у исследованных сортов.

Нумерацию аллелей по каждому из маркеров проводили следующим образом: аллель с минимальным значением молекулярного веса принимали за нулевой и обозначали как 0, аллели с большим молекулярным весом нумеровали по разнице между ним и нулевым аллелем (табл. 3).

Таблица 3. – Нумерация аллелей.

Маркер	Аллели
VrZag79	240 – 0, 245 – 5, 247 – 7, 251 – 11, 254 – 14, 256 -16, 258 – 18, 260 – 20, 263 - 23.

Примечание: *- размер аллелей указан в парах нуклеотидов (п.н.), ** – после размера аллеля через тире указан номер, ему присвоенный.

Такой способ нумерации аллелей широко применяется в исследованиях по изучению генетического разнообразия [26], это позволяет более наглядно выражать разницу в размерах между аллелями каждого отдельно взятого микросателлитного маркера.

Кроме того, разница в размерах аллелей отображает генетическое сходство сортов, что объясняется путями эволюции микросателлитных последовательностей генома.

По результатам анализа о наличии аллелей исследовавшихся сортов были составлены их ДНК-паспорта, содержащие информацию о номере микросателлитного маркера и его аллельном состоянии у конкретного генотипа (табл. 4-5).

Таблица 4. – ДНК-паспорта клонов и сортов популяции Рислинг, составленные по данным об аллельных комбинациях микросателлитных маркеров.

Маркер	P-A (к)	P-34	P-34A	PA-34Б	P 4-9-2	P 9-1-1
Vrzag79	16	20	18	7	14	5

Анализ данных ДНК-отпечатков группы Рислинг (табл. 14) показал, что исследуемые формы отличаются от контрольного сорта, при этом клон Рислинг Алькадар 34 - 4 аллеля, Рислинг Алькадар 34А - 2 аллеля, Рислинг Алькадар 34Б – 9 аллелей, Рислинг 4-9-2 – 2 аллеля, Рислинг 9-1-1 – 11 аллелей.

Таблица 5. – ДНК-паспорта клонов и сортов группы Пино, составленные по данным об аллельных комбинациях микросателлитных маркеров.

Маркер	Пино белый (к)	Пино Блан	Пино черный	Пино белый 31	Пино белый 32
Vrzag79	23	18	18	11	0

**Примечание: для каждого генотипа указаны аллели, выявленные по каждому отдельному маркеру.*

Анализ данных ДНК отпечатков группы Пино (табл. 13) показал, что исследуемые нами генотипы группы Пино имеют отличающиеся наборы аллелей: генотип Пино блан отличается от контрольного сорта на 5 аллелей, клон Пино черный – 5 аллелей, Пино белый-31 – 12 аллелей, Пино белый-32 - 23 аллелей.

При рассмотрении ДНК-отпечатков видно, что исследуемые клоны групп Рислинг и Пино белый имеют отличающиеся наборы аллелей, несмотря на высокую степень внутрисортного генетического родства. Это служит основанием рекомендовать организаторам производства размножить ускоренными способами прежде всего **клон Рислинг-9-99-1, переданный на госиспытание под названием Рислинг анапский, и**

клон Пино белый-31, ранее переданный в Госсорткомиссию РФ под названием Пинок белый (рис. 2-3).

Использование вышеизложенной новационной методики отбора, оценки и тестирования высокопродуктивных протоклонов позволило обоснованно выделить лучшие, размножить и оформить их в качестве сортов-клонов: Кабернек, Мерлок, Рислиналк, Рислинг Джемете, Шардонек и другие (перечень новационных сортов приведен в предисловии этого издания).

Такая же работа по отбору высокопродуктивных протоклонов, как сказано в предыдущей статье, проведена в ООО «Фанагория-Агро» и ЗАО «Победа» Темрюкского района и на других сортах, что позволило отобрать, тестировать и размножить, а затем оформить и передать на госиспытание сорта-клоны Каберне фанагорийский, Клерет темрюкский, Рислинг фанагорийский, Мускат темрюкский и др.

Возможность различать генетически близкие клоны на основе полиморфизма микросателлитных маркеров подтверждает перспективность их использования в идентификации клоновых популяций. Помимо этого, высокий уровень полиморфизма микросателлитных маркеров может быть применим для поиска ложных сортов – омонимов и дуплет-клонов при затруднительности проведения этой процедуры по фенотипу.



Рис. 2. Технический сорт-клон винограда Пинок белый.



Рис. 3. Технический сорт-клон винограда Рислинг анапский.

Выводы

Проведенный анализ степени генетического родства или разнообразия между клонами чернойгодных сортогрупп Каберне-Совиньон и Мерло, как и предыдущих белоягодных Мускат белый, Рислинг и Пино белый, позволил говорить об объективности данных, полученных при использовании полиморфизма микросателлитных маркеров.

Полученные результаты послужили основанием для размножения и оформления размноженных протоклонов четырех вышеназванных сортогрупп в виде сортов-клонов для передачи их в госиспытание. Эти сорта-клоны, принятые Госсорткомиссией РФ, несомненно, будут способствовать обогащению виноградного сортимента Анапо-Таманской зоны Кубани, а, значит, и России.

Информация о генетическом маркировании и генетических различиях исследуемых генотипов используется как для совершенствования самого сортимента винограда Кубани, ускорения процесса клоновой селекции ценных для производства сортов винограда, так и получения информации о максимальном спектре изменчивости исследуемых популяций, что позволит повысить эффективность селекционного процесса.

Литература

1. Барышева И.А., Тулаева М.И., Чисников В.С. Исследование внутрисортовой изменчивости ДНК винограда ПДРФ и ПЦР методами // Цитология и генетика. – 2003. – Т. 37, № 6. – С. 31-38.
2. Биометрическая оценка морфологических признаков популяции Каберне-Совиньон / А.С. Звягин, Л.П. Трошин, П.П. Подваленко, В.И. Вернигоров // Критерии и принципы формирования высокопродуктивного виноградарства. – Анапа, 2007. – С. 201–172.
3. Звягин А.С., Подваленко П.П., Трошин Л.П. Исследование интродуцированных из Крыма клоновых популяций винограда // Труды КубГАУ. – Краснодар, 2009. - № 5 (20). – С. 189-192.

4. Звягин А.С., Трошин Л.П., Подваленко П.П. Использование молекулярно-генетических маркеров для виноградной культуры // Нанобиотехнологии в сельском хозяйстве. – М., 2008. – С. 32-33.

5. Звягин А.С., Трошин Л.П. Паспортизация сортов и клонов винограда молекулярно-генетическим методом // Научное обеспечение агропромышленного комплекса. – Краснодар, 2005. – С. 128–132.

6. Итоги изучения сортов и клонов винограда в разных зонах Краснодарского края / Л.П. Трошин, Д.Е. Хлевный, А.С. Звягин, П.П. Подваленко, Т.И. Гугучкина, А.И. Мисливский // Технологии производства элитного посадочного материала и виноградной продукции, отбора лучших протоклонов. – Краснодар: АлВи-Дизайн, 2005. – С. 96-107.

7. Конарев В.Г. Морфогенез и молекулярно-биологический анализ растений. – Санкт-Петербург: ВИР, 1998. – 370 с.

8. Медведева Н.И., Поливарова Н.В., Трошин Л.П. Особенности микроклонального размножения интродуцентов и клонов винограда // Научный журнал КубГАУ. – 2008. – № 40 (6). – 18 с. <http://ej.kubagro.ru/2008/06/>.

9. Остерман Л.А. Методы исследования нуклеиновых кислот. – Москва: Наука, 1981. – 288 с.

10. Перспективы исследования сортотипа Каберне-Совиньон / А.С. Звягин, Л.П. Трошин, П.П. Подваленко, С.В. Копыльцов // Роль молодых ученых в реализации национального проекта “Развитие АПК”. Сборник материалов Международной научно-практической конференции. Часть 1. – М.: ФГОУ ВПО МГАУ, 2007. – С. 35.

11. Подваленко П.П., Звягин А.С., Трошин Л.П. Клоновая селекция – современная основа подъема продуктивности виноградников // Научный журнал КубГАУ. – 2009. - № 51 (07). – 25 с. <http://ej.kubagro.ru/2009/07/>.

12. Подваленко П.П., Трошин Л.П., Звягин А.С. Ампелографическое исследование сортогруппы Рислинг // Роль молодых ученых в реализации национального проекта “Развитие АПК”. Сборник материалов Международной научно-практической конференции. Часть 1. – М.: ФГОУ ВПО МГАУ, 2007. – С. 74.

13. Трошин Л.П. Ампелография и селекция винограда. – Краснодар: РИЦ «Вольные мастера», 1999. – 138 с.: цв. вкладка.

14. Трошин Л.П. Биометрическая оценка полиморфизма сортогрупп винограда Пино и Рислинг по морфологическим признакам листьев среднего яруса кроны / Л.П. Трошин, Е.В. Луценко, П.П. Подваленко, А.С. Звягин // Научный журнал КубГАУ. – 2009. - № 52 (08). – 14 с. <http://ej.kubagro.ru/2009/08/>.

15. Трошин Л.П., Звягин А.С., Подваленко П.П. Анализ генетического разнообразия клонов сортогрупп Пино и Рислинг с использованием микросателлитных маркеров // Материалы XVIII Международного научного симпозиума «Нетрадиционное растениеводство. Селекция и генетика. Эниология. Экология и здоровье». 17-26 сентября 2009 г. – Симферополь, 2009. – С. 308-313.

16. Трошин Л.П., Звягин А.С., Подваленко П.П. Проблемы идентификации винограда // Виноделие и виноградарство. – 2008. - № 1. - С. 34-35.

17. Трошин Л.П., Рисованная В.И., Полулях А.И. Ампелографические признаки в изучении таксономических отношений сортов *Vitis vinifera sativa pontica* Negr. // Труды Научного центра виноградарства и виноделия. – 1999. – С. 10-12.

18. Трошин Л.П., Цурканенко Н.Г. Новые технические сорта винограда // Садоводство и виноградарство. – 2007. – № 4. – С. 24-25.

19. Энциклопедия виноградарства. – Кишинев: МСЭ, 1986-1987. – Т. 1-3. 7

20. Alleveldt G., Dettweiler E. A model to differentiate grapevine cultivars with the aid of morphological characteristics // *Rivista di Viticoltura e di Enologia*. – 1989. – V. 1. – P. 59-63.
21. Alleveldt G., Dettweiler E. The genetic resources of *Vitis*. – Siebeldingen / FRG, 1994. – 74 s.
22. Alleveldt G., Spiegel-Roy P. and Reisch B. Grapes (*Vitis*). In: Moore J. N. and J. R. Ballington (Eds.): *Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops* // *Acta Hort.* – 1990. – V. 290. – P. 291-337.
23. Bellin D., Velasco R. and Grando M. S. Intravarietal DNA polymorphisms in grapevine (*Vitis vinifera* L.) // *Acta horticultrae*. – 2001. – V. 546. – P. 343-349.
24. Botta R., Scott N.S., Eynard I., Thomas M.R. Evaluation of microsatellite sequence-tagged site markers for characterizing *Vitis vinifera* cultivars // *Vitis*. – 1995. – V. 34. – P. 99-102.
25. Bowers J.E., Dangl G.S. and Meredith C.P. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape // *Am. J. Enol. Vitic.* – 1999. – V. 50, № 30. – P. 243-246.
26. Bowers J.E., Dangl G.S., Vignani R. and Meredith C.P. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.) // *Genome*. – 1996. – V. 39. – P. 628-633.
27. Fatahi R., Ebadi A., Bassil N., Mehlenbacher S.A. and Zamani Z. Characterization of Iranian grapevine cultivars using microsatellite markers // *Vitis*. – 2003. – V. 42, № 4. – P. 185-192.
28. Filippetti I., Intrieri C., Ceminari M., Bucchetti B. and Pastore C. Molecular characterization of officially registered Sangiovese clones and of other Sangiovese-like biotypes in Tuscany, Corsica and Emilia-Romagna // *Vitis*. – 2005. – V. 44, № 4. – P. 167-172.
29. Francois L., Marianna M., Gorislavets S.S, Risovannaya V. and Troshin L. Genetic profiling of Moldavian, Crimean and Russian cultivars of *Vitis Vinifera* L. with nuclear microsatellite markers // *Тезисы IV международной конференции*. – 2003. – С. 25.
30. Gonzalez A., Jubany S., Ponce I. De Leon., Dellacassa E., Carrau F.M., Hinrichsen P. and Gaggero C.A. Molecular diversity within clones of cv. Tannat (*Vitis vinifera*) // *Vitis*. – 2004. – V. 43, № 4. – P. 179-185.
31. <http://www.drmed.rus/s.php/377> html.
32. Karp A., Ingram. D.S. and Isaac P. *Molecular Tools for Screening Biodiversity* // Chapman and Hall. – 1998. – P. 195-201.
33. Lamboy W.F. and Alpha C.G. Using simple sequence repeats (SSRs) for DNA fingerprinting germplasm accessions of grape (*Vitis* L.) species // *J. Am. Soc. Hort. Sci.* – 1998. – V. 123. – P. 182-188.
34. Lefort F. and Roubelakis-Angelakis K.A. Genetic Comparison of Greek Cultivars of *Vitis vinifera* L. by Nuclear Microsatellite Profiling // *Am. J. Enol. Vitic.* – 2001. – V. 52, № 2. – P. 101-108.
35. Lefort F., Risovannaya V., Gorislavets S., Massa V. and Troshin L. Genetic profiling of Moldavian, Crimean and Russian cultivars of *Vitis Vinifera* with nuclear microsatellite markers // *Геном растений. Сборник тезисов IV Международной конференции*. – Одесса, 2003. – С. 25.
36. Lopes M.S., Sefc K.M., Eiras D.E., Steinkellner H., Laimer da Svmara Machado M. and A. da Svmara Machado. The use of microsatellites for germplasm management in a Portuguese grapevine collection // *Theor. Appl. Genet.* – 1999. – V. 99. – P. 733-799.

37. Maletic E., Sefc K.M., Steinkellner H., Kontic J.K. and Pejic I. Genetic characterization of Croatian grapevine cultivars and detection of synonymous cultivars in neighboring region // *Vitis*. – 1999. – V. 38. – P. 79-83.

38. Meredith C.P., Bowers J.E., Riaz S., Handley V., Bandman E.B. and Dangl G.S. The identity and parentage of the variety known in California as ‘Petite Sirah’ // *Amer. J. Enol. Vitic.* – 1999. – V. 50. – P. 236-242.

39. Moncada X., Munoz L., Merdinoglu D., Castro M.H. and Hinrichsen P. Clonal polymorphism in the red wine cultivars “Carmenere” and “Cabernet Sauvignon” // *ISHS Acta Horticulture: VII International Symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology*. – 2003.

40. Murray M.G. and Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // *Nucleic Acids Research*. – 1980. – V. 10. – P. 4321-4325.

41. Nunez Y., Fresno J. and Gallego F.J. Practical use of microsatellite markers to manage *Vitis vinifera* germplasm: Molecular identification of grapevine samples collected blindly in D.O. El Bierzo (Spain) // *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. – 2004. – V. 79, № 3. – P. 437- 440.

42. Patrick P. and Jean B. Molecular genetic diversity of the French-American grapevine hybrids cultivated in North America // *Genome/Genome*. – 2003. – V. 46, № 6. – P. 1037-1048.

43. Perret M., Arnold C., Gobat J.-M. and Kupfer P. Cultivated grapevines (*Vitis vinifera* L.) in central Europe based on microsatellite markers // In: *Proceedings of VII International symposium on Grapevine Genetics and Breeding*. – 2001. – V. 531. – P. 155-159.

44. Regner F., Sefc K., Stadlbauer A. and Steinkellner H. Genetic markers for the identification of varieties and clones as a guarantee of quality // *Acta Hort.* – 1998. – V. 473. – P. 49-61.

45. Regner F., Stadlbauer A. and Eisenheld C. Molecular markers for genotyping grapevine and for identifying clones of traditional varieties // *ISHS Acta Horticulturae*. – 2000. – I.N. 546.

46. Sefc K.M., Regner F., Tureschek E., Glossl J. and Steinkellner. H. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their application for genotyping of different *Vitis* species // *Genome*. – 1999. – V. 42. – P. 367-373.

47. Sefc K.M., Regner F., Tureschek E., Glossl J. and Steinkellner. H. Genotyping of grapevine and rootstock cultivars using microsatellite markers // *Vitis*. – 1998. – V. 37. – P. 15-20.

48. Smurygin A.S., Nosulchak V.A., Troshin L.P. Creation of the Russian ampelographic collection // *Report of a Working Group on Vitis*. – *Biodiversity International*, 2008. – P. 95-96.

49. Thomas M.R. and Scott N.S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphism when analysed as sequence-tagged sites (STSs) // *Theor. Appl. Genet.* – 1993. – V. 86. – P. 985-990.

50. Thomas M.R., Matsumoto S., Cain P. and Scott N.S. Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification // *Theor. Appl. Genet.* – 1993. – V. 86. – P. 173-180.

51. Troshin L., Nosulchak V., Smurygin A. National ampelographic collection of Russia: creation and use // *Plant Genetic Resources and their Exploitation in the Plant breeding for Food and Agriculture. 18th EUCARPIA Genetic Resources Section Meeting*. – *Piestany, Slovak Republic. 23-26 May 2007*. – P. 108.

52. Troshin L.P., Zvjagin A. Clone identification of four grapevine varieties // 9th International Conference on Grape Genetics and Breeding, 2-6 July 2006. – Udine / Italy. – P. 38.

53. Winkler A.G. Some resposse of vitis Vinifera to pruning // Hylgardia. – 1926. – № 1. – P. 3-4.

54. Zhang Q., Liu K.D., Yang G.P. and Saghai M.M.A. Molekularmarker diversity and hybrid sterility in indica-japonica rice crosses // Theor. Appl. Genet. – 1997. – V. 95. – P. 112-118.