



УДК 634.8 + 631.52 + 581.167

Трошин Леонид Петрович, д.б.н., профессор;

Милованов Александр Валериевич, аспирант;

Звягин Андрей Сергеевич, к.б.н.

Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар, Россия

ЭТЮД СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ КЛОНОВОЙ СЕЛЕКЦИИ ВИНОГРАДА

Совершенствование клоновой селекции винограда ныне осуществляется путем использования молекулярно-генетических методов. Последние данные, собранные нами в процессе работы, были проанализированы комплексным способом, что дало возможность сделать выводы об отличимости сортов винограда. Некоторые клоны были исследованы при помощи праймеров на ретротранспозонные последовательности ДНК.

Ключевые слова: ДНК; виноград; генотип; молекулярный маркер; клоновая селекция.

Troshin Leonid Petrovich, Doctor of Biological sciences, professor;

Milovanov Alexander Valerievich, post-graduate student;

Zviagin Andrey Sergeevich, Candidat of Biological Sciences

Kuban state agrarian university, Krasnodar, Russia

IMPROVEMENT OF CLONAL SELECTION OF GRAPES ETUDE

Improving the clonal selection of grapes today carried out by the use of molecular genetic methods. Last data collected by us in the process, were analyzed by complex method, making it possible make appropriate conclusions about distinctness of grape varieties. Several clones were tested using the primers for retrotransposon DNA sequence.

Keywords: DNA; grape; genotype; molecular marker; SSR; IRAP; clonal selection.



селекция становится необходимым средством улучшения существующих сортов винограда для обеспечения народных потребностей [1, 4].

В последнее время клоновая селекция ведется на молекулярно-генетическом уровне с использованием молекулярных маркеров. Появление SSR (SSR – simple sequence repeats) – tandemные повторы простых последовательностей в структуре ДНК, источником полиморфизма которых являются сайт-специфическое варьирование длины повтора, что, в свою очередь, обусловлено различием в числе единиц повтора SSR, а также IRAP — (англ. Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism) маркеров – дало сильнейший ей толчок [12].

Сортовой состав винограда Краснодарского края имеет огромное разнообразие и широко признан во всем мире, его можно вовлекать в селекционный процесс по поиску лучших протоклонов [5]. Таким образом, в руках у селекционеров имеется огромный генетический фонд, в котором проводится поиск уникальных генотипов для улучшения существующих традиционных сортов [11].

Выделение ДНК проводили СТАБ-методом [6, 7]. Для исследования с использованием SSR-маркеров были взяты 119 генотипов. В работе были задействованы микросателлитные маркеры, рекомендованные для молекулярно-генетической паспортизации генотипов винограда проектом GrapeGen6: VrZag62, VrZag79, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2 [13].

Список исследованных сортов винограда: Форма 342 (Нишмиш венгерский) 3 кл 6 ряд; Академический; Академический К; Алиготе 7-10; Алиготе 7 ряд 7 куст; Антоний Великий; Антоний Великий 30-5; Антоний Великий 30-6; Антоний Великий Ф; Анюта; Анюта 19 куст; Анюта 3 кл 5 ряд; Анюта 5 куст; Анюта 5-5; Анюта 5-7; Анюта Ф; Аркадия розовая 1 кл 2 ряд; Аркадия розовая 10 куст; Аркадия розовая 2-5; Аркадия розовая 2-6; Аркадия розовая 4 куст; Боготяновский 2 кл 2 ряд; Боготяновский 6 куст; Боготяновский 9 куст; Вердо черный 7-2; Вердо черный 7-6; Виктор 3 кл 29 ряд; Виктор 5 куст; Виктор 7 куст; Гелиос 16 куст; Гелиос 3 кл 50 ряд; Гелиос 50-5; Гелиос 50-6; Гелиос 9 куст; Гурман ранний 3 кл 31 ряд; Долгожданный; Долгожданный 3 кл 6 ряд; Долгожданный 6-8; Долгожданный 6-9; Долгожданный Ф; Йоханнитер 79-4; Йоханнитер 80-6; Йоханнитер 10-11; Йоханнитер 11-11; Каберне Карбон 525-4; Каберне Карбон 525-6; Каберне Кортис 271-2; Каберне Кортис 271-7; Каберне-Совиньон 210-4; Каберне-Совиньон 210-8; Каберне-Совиньон 15 (Каберне Мысхако); Каберне-Совиньон 217; Каберне-Совиньон 5а; Ливия; Ливия 14-5; Ливия 14-6; Ливия 3 кл 14 ряд; Ливия Фис; Ливия-Ф; Мерло 10-8; Мерло 10-9; Мерло 14 (Мерло Грамотенко); Мерло 348; Монарх 1 куст; Монарх 13 куст; Монарх 3 кл 2 ряд; Низина 3 кл 2 ряд 1 к; Низина 3 кл 2 ряд 2 к; Первозванный 3 кл 10 ряд; Первозванный 4 куст; Первозванный 6 куст; Пино бел 31; Пино бел 32; Пино белый 6; Пино гри 46 куст 1; Пино гри 46 куст 2; Пино гри 46 куст 3; Пино серый 46; Пино черный 50-11; Пино черный 50-8; Пинофагр; Преобразование 15 куст; Преоб-

ражение 3 кл 2 ряд; Преобразование 5 куст; Рислинг 130; Рислинг 143143111; Рислинг 245-5; Рислинг 245-7; Рислинг 31411111; Рислинг 3142092; Рислинг 3144111; Рислинг 3144111 1; Рислинг 314991; Рислинг 3991; Рислинг 492; Рислинг 7111891; Рислинг 7121431; Рислинг 7-12-201 15-1 1-24-15; Рислинг 7151077п; Рислинг 830; Рислинг 964; Рислинг 991; Рислинг Алькадар 34; Рислинг Алькадар 34а; Рислинг Алькадар 34б; Рислинг Алькадар 34г; Рислинг клон; Рошфор-Ф; Совиньон белый 23-11; Совиньон белый 23-8; Солярис 10-11; Солярис 11-11; Солярис 70-16; Солярис 70-21; Супер-Экстра-Ф; Супер-Экстра 21 куст; Супер-Экстра 3 кл 1 ряд; Супер-Экстра 9 куст; Юбилей Новочеркаска 3 кл 7 ряд.

Во второй части работы были исследованы три клона сорта винограда Совиньон белый по 1 генетическому маркеру на ретротранспозонную последовательность ДНК [8, 10].

Список клонов, исследованных при помощи маркера Tvv-1 Forward: Совиньон блан 1, Совиньон блан 2, Совиньон блан 3.

Праймер, используемый в работе по изучению полиморфизма ретро-транспозонных последовательностей ДНК винограда: Tvv-1Forward: TC-CAAGCTTCAGGGGGAGTGT.

Для более точной оценки длины аллелей были использованы такие известные сорта как Каберне-Совиньон, Рислинг, Мерло, Каберне фран и Пино блан. Для каждой праймерной пары были использованы оптимальные условия полимеразной цепной реакции. Электрофорез проводился методом, описанным в статьях [11, 12].

Размер аллелей микросателлитных локусов определяли и идентифицировали с использованием программы Gel-Pro Analyzer 3.1. При подсчете ошибки использовали контрольные (референсные) сорта, аллельный состав которых известен по изучаемым локусам. Для отбраковки «неэффективных» аллелей использовали список существующих аллелей, зарегистрированных в международной базе данных «Eu-Vitis» и любезно предоставленных доктором Эрикой Мауль.

Также принималось во внимание то, что при изменении количества нуклеотидов в одной аллели, должно изменяться их количество и в другой из-за сохранения нуклеотидного расстояния между ними, при этом также учитывался список существующих аллелей. В конце, при сравнении клонов друг с другом, а также с контрольными (референсными) сортами с известным заранее количеством пар нуклеотидов, принималось во внимание то, что визуальная ошибка геля составляет 5 п.н. Поэтому все то, что меньше этого показателя, принималось как несущественное различие. В дальнейшем, чтобы сократить количество неэффективных аллелей, в таблицу вносились следующие изменения: вставлялась аллель контрольного (референсного) сорта, так как считалось, что данные аллели не отличаются. В результате удалось существенно снизить количество неэффективных аллелей, что подтвердилось при дальнейшем анализе на дендрограмме, выявилась эффективность данного метода при кластеризации сортогрупп. При отсут-

ствии данных об аллели, чтобы не вносить путаницу в программу, при наличии референсного сорта, в таблицу вставлялась аллель референсного сорта.

Кластерный анализ выполнен методом ближайших соседей, выполненный в программе DARwin 6 [9].

Для амплификации праймера Tvv-1 Forward использовали те же параметры, что описаны выше. Разделение продуктов амплификации проводили в 2%-ном агарозном геле при 70V в течение 5 ч [12].

Анализ продуктов ПЦР и размер фрагментов проводили визуальным способом, а также с использованием Gel-Pro Analyzer 3.1.

В ходе исследований была поставлена следующая задача – выявить степень генетического сходства и различий среди исследуемых клонов с помощью молекулярно-генетических маркеров.

В результате работы были получены фотографии гелей, данные по аллелям с которых были перенесены в таблицы «Excel». Для проведения кластеризации нами был использован метод «одиночной связи» [2-4].

Дендрограмма на рис. 1 демонстрирует сформированные кластеры различных сортов. Здесь следует выделить два больших кластера и 14 подкластеров. Все кластеры и подкластеры сформированы с акцентом сортоспецифичности. По данным, полученным в результате кластеризации, можно сделать следующие выводы.

Клоны сорта Алиготе отличаются друг от друга по локусу VrZag62. В группе клонов сорта Рислинг наиболее отличается от всех остальных клон Рислинг 492. Рислинг 130, Рислинг 247-5, Рислинг 314111 и Рислинг 314111 1, Рислинг 3991, Рислинг 7111891, Рислинг 7121431, Рислинг 7151077п, Рислинг 830, Рислинг 964, Рислинг Алькадар 34, Рислинг Алькадар 34а и Рислинг клон имеют один генотип. К ним же можно отнести Рислинг 245-5 и Рислинг 3142092. Рислинг 143143111, Рислинг 31411111, Рислинг 314991, Рислинг Алькадар 34б и Рислинг Алькадар 34г формируют отдельную ветвь, что указывает на их схожесть, но и на отличия от основной группы клонов. Рислинг 991 и Рислинг 7-12-201 15-1 1-24-15 выявлены как отличающиеся генотипы. Клоны сорта Низина не отличаются друг от друга. Клоны сорта Супер-Экстра также не отличаются друг от друга. Клоны сорта Академический отличаются друг от друга по локусу VVMD7. Клоны сорта Виктор отличаются друг от друга по локусам VVMD5 и VVMD7. Клоны Солярис 10-11 и Солярис 11-11 не отличаются друг от друга. Различия показали клоны Солярис 70-21 и Солярис 70-16 по локусам VrZag62 и VVMD7. Клоны Боготяновский 6 куст и Боготяновский 9 куст не отличаются по ДНК профилям, отличия показал Боготяновский 2 кл 2 ряд по локусу VVMD5. Клоны Каберне Карбон отличаются друг от друга по локусу VrZag79. Клоны Антоний Великий Ф, Антоний Великий 30-6 и Антоний Великий 30-5 не отличаются друг от друга. Отличия найдены у клона Антоний Великий в локусе VVS2. У клонов сорта Преобразование отличия найдены в локусах VVMD5 и VVMD7. Клоны Первозванный 4 куст и Первозванный 6 куст не отличаются,

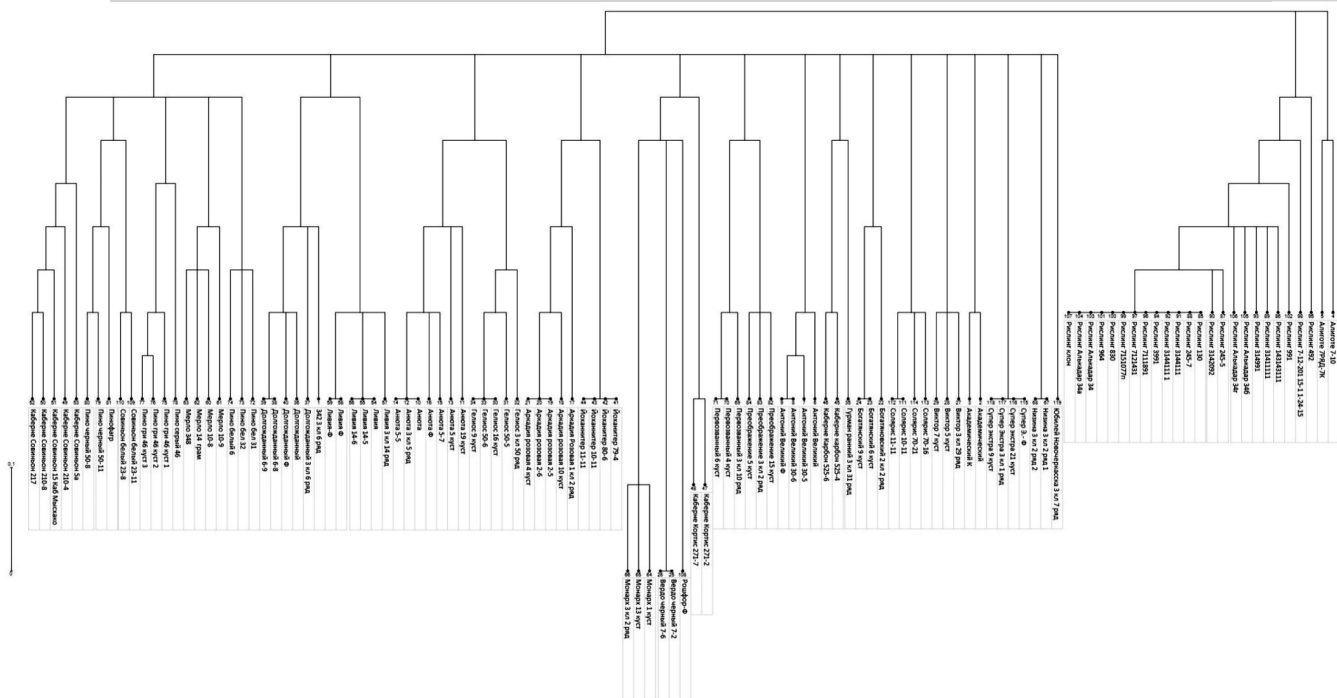


Рис. 1. Дендрограмма 119 образцов, основанная на иерархической кластеризации методом «одиночной связи»

клон Первозванный 3 кл 10 ряд показал отличие по локусу VVS2. Клоны Каберне Кортис показали отличие по локусу VVMD5. Клоны сорта Вердо черный не отличаются по генотипу. Клоны сорта Монарх показали отличия по локусам VVMD7 и VVMD27. Клоны сорта Йоханнитер на отличимы. Клоны Аркадия розовая 2-5, Аркадия розовая 2-6 и Аркадия розовая 4 куст неотличимы. Клон Аркадия розовая 10 куст показал отличие по локусу VVS2. Клон Аркадия розовая 1 кл 2 ряд показал отличие по локусу VrZag79. Клоны Гелиос 16 куст, Гелиос 50-6, Гелиос 50-5 и Гелиос 9 куст не отличаются. Клон Гелиос 3 кл 50 ряд показал отличие по локусу VVMD5. Клоны Анюта, Анюта 3 кл 5 ряд, Анюта 5-5 не отличаются. Клоны Анюта Ф и Анюта 5-7 показали отличие по локусам VrZag62 и VrZag79. Клоны Ливия, Ливия 14-5 и Ливия 14-6, Ливия Фис и Ливия-Ф не отличаются. Клон Ливия 3 кл 5 ряд показал отличие по локусу VVMD5. В группе клонов Долгожданный отличия показали клоны Долгожданный 3 кл 6 ряд и Долгожданный по локусам VrZag62, VVMD7, VrZag79 и VVMD5. Клоны сорта Пино белый показали отличия по локусам VrZag62, VrZag79 и VVMD5. Клоны сорта Мерло также показали отличия по локусам VrZag62, VrZag79 и VVMD5. В группе клонов Пино гри наиболее отличается Пино серый 46, показавший отличия по локусу VrZag79. Остальные отличались по локусам VrZag79, VVMD5 и VVMD27. Клоны Совиньон белый отличались друг от друга по локусу VVMD7. Клоны сорта Пино черный 50-11 и Пино черный 50-8 показали несущественные различия, в то время как клон Пинофагр показал отличия по локусам VrZag62 и VrZag79. В группе клонов Каберне-Совиньон существенные отличия показал Каберне-Совиньон 5а по локусам VrZag62, VrZag79 и VVMD5.

По результатам кластерного анализа можно сделать вывод, что выбранные образцы, несмотря на наличие сильного сходства, отличаются генетическими про-

филями. Это же утверждение подтверждено и агробиологическими исследованиями, проведенными аспирантами Звягиным А.С. и Подваленко П.П. и опубликованными в научных статьях, а также Государственным сортоиспытанием [2-3].

Исследование клонов сортов с использованием ретротранспозонных маркеров. Так же, как и в предыдущей части работы, в результате исследования были получены фореграммы, по которым визуальным способом находили генетические различия между клонами.

На рис. 2 можно выявить следующие различия между тремя клонами сорта Совиньон белый, отобранных на виноградниках АФ «Южная» Темрюкского района Краснодарского края. Анализ фореграммы показывает разницу продуктов амплификации, часть полос более тяжелые и часть содержит более легкие нуклеотидные последовательности, а у других – нет.

Можно сделать вывод, что среди трех клонов сорта Совиньон белый произошло несколько уникальных мутаций при перемещении ретротранспозона по цепи их ДНК. При этом часть из них является сортовыми, то есть общими для всех, признаками (одинаковые бенды). Вопросом остается по-

Таблица
Молекулярный вес бендов, полученных в ходе разделения продуктов амплификации ДНК трех клонов сорта Совиньон белый

	Номер клона								
	1	2	1	2	3	3	3	3	2
Молекулярный вес						1506	1506	1506	
		1378		1378	1378				
					1179	1179	1179	1179	
		1048		1048		1048	1048	1048	
		989		989					989
		839	839	839	839	839	839	839	839
		783	783	783	783	783	783	783	783
		748		748					
		672	672	672	672	672	672	672	672
		609		609					609
		570	570	570	570	570	570	570	570
	393	393	393	393	393	393	393	393	

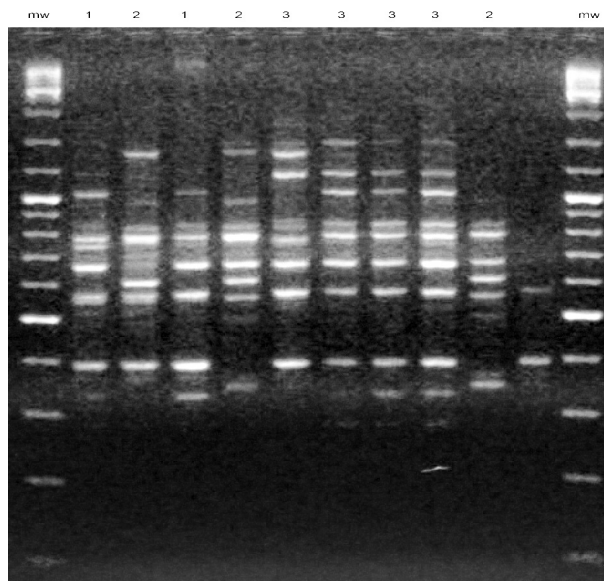


Рис. 2. Разделение продуктов амплификации ДНК трех клонов сорта Совиньон белый



явление дополнительного бенда у первого клона № 3, который требует последующих исследований.

Выводы. Проведен анализ с помощью микросателлитных аллелей: с помощью молекулярно-генетического анализа сортов и клонов *Vitis vinifera sativa* D.C. Подтверждена обоснованность отборов высокопродуктивных протоклонов. Использование в работе микросателлитных локусов для изучения генетического разнообразия виноградных популяций сортов и клонов показало различную степень полиморфизма микросателлитных маркеров. Анализ частот встречаемости аллелей в популяции позволил выявить, что для локуса VrZag62 было обнаружено всего 15 аллелей; для локуса VrZag79 - 19; для локуса VVS2 - 20; для локуса VVMD5 - 25; для локуса VVMD7 - 27; для локуса VVMD27 - 16. Суммарно в анализируемой выборке было обнаружено 122 аллельных состояния для 6 локусов.

Анализ с помощью ретротранспозонов делают их привлекательными в качестве системы молекулярного маркирования. Они широко распространены, многочисленны и рассеяны в эукариотических геномах. Ретротранспозоны длинные и могут производить большие генетические изменения в точке вставки. Для клоновой селекции могут быть использованы потому, что показывают высокий процент различий между клонами, особенно в популяциях сортов, возделываемых достаточно длительный период времени. Использование в работе маркера Tvv-1 Forward выявило высокий уровень полиморфизма среди исследуемых клонов сорта винограда Совиньон белый. Всего было обнаружено 12

аллелей, из которых общими для сорта были только 5. Остальные являются уникальными мутациями, характерными для каждого клона в отдельности. Вопросом остается наличие аллели с весом 1378 пар нуклеотидов, которая амплифицировалась только у одного черенка из четырех – клон на № 3 и отсутствие у него же аллели в 1048 пар нуклеотидов.

Выражаем искреннюю признательность Р.Н. Календару и И.И. Супруну, а также сотрудникам лаборатории за помощь и советы в постановке и анализе экспериментов по исследованию ретротранспозонных последовательностей в винограде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Звягин А.С., Трошин Л.П. Паспортизация сортов и клонов винограда молекулярно-генетическим методом // Научное обеспечение агропромышленного комплекса. – Краснодар, 2005. – С. 128-132.
2. Подваленко П.П. Клоновая селекция – современная основа подъема продуктивности виноградников/ П.П. Подваленко, А.С. Звягин, П.Л. Трошин. Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ) [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ. – 2009. – № 51 (7). – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2009/07/pdf/19.pdf>.
3. Трошин Л.П. Использование биометрической оценки морфологических признаков клонов для идентификации генотипов сортогрупп Мерло / Л.П. Трошин, А. С. Звягин. Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ) [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ. – 2008. – № 38 (4). – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2008/04/pdf/10.pdf>.
4. Трошин Л.П. Новации виноградарства России. 4. Совершенствование клоновой селекции винограда / Л.П. Трошин, А.С. Звягин. Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского

государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ) [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ. – 2009. – № 54 (10). – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2009/10/pdf/09.pdf>.

5. Трошин Л.П. Районированные сорта винограда России/ Л.П. Трошин, П.П. Радчевский. – Краснодар: ООО «Вольные мастера», 2004. – 176 с.

6. Bowers J.E. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape/ J.E. Bowers, G.S. Dangl and C.P. Meredith // American Journal of Enology and Viticulture. – 1997. – Vol. 50. – P. 243–246.

7. Bowers J.E. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.)/ J.E. Bowers, G.S. Dangl, R. Vignani and C.P. Meredith // Genome. – 1996. – Vol. 39. – P. 628–633.

8. D'Onofrio C. Retrotransposon - based molecular markers for grapevine species and cultivars identification/ C. D'Onofrio, G. De Lorenzis, T. Giordani, et. al. // Tree Genetics & Genomes. – 2010. – Vol. 6. – P. 451–466.

9. DARwin 6 website [Электронный ресурс]. – 2014. – Режим доступа: <http://darwin.cirad.fr/>.

10. Kalendar R. IRAP and REMAP for retrotransposon - based genotyping and fingerprinting/ R. Kalendar, A. Schulman // Nature Protocols. – 2006. – Vol. 11. – P. 2478–2484.

11. Muhammad L. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and Ampelopsis/ L. Muhammad, Y. Guang-Ning, F. Norman, et al. // Plant Molecular Biology Reporter. – 1994. – 12 (1). – P. 6–13.

12. Regner F. Highly variable Vitismicrosatellite loci for the identification of Pinot Noir clones/ F. Regner, R. Hack and J. L. Santiago // Vitis. – Vol. 45. – 2006. – P. 85–91.

13. This P. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars/ P. This, A. Jung, P. Boccacci et al. // Theor. Appl. Genet. – 2004. – V. 109. – P. 1448–1458.

Поступила 14.05.2015
©Л.П.Трошин, 2015
©А.В.Милованов, 2015
©А.С.Звягин, 2015