

Особенности идентификации сортов и клонов винограда западно-европейского происхождения

Спотарь Г.Ю.¹, Блинова С.А.², Шварцев А.А.², Алексеев Я.И.^{1,2}, Гориславец С.М.¹

¹ФГБУН «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН», Россия, Республика Крым, 298600, г. Ялта, ул. Кирова, 31;

²ООО «Синтол», Россия, 127434, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42.

Аннотация. С помощью молекулярно-генетических и ампелографических методов проведена идентификация сортов винограда, относящихся к наиболее распространенным в мире техническим сортам западно-европейского происхождения. Генотипирование образцов проводилось с использованием 9-ядерных и 3-хлоропластных микросателлитных маркеров. На основании полученных профилей, по данным базы VVC было установлено, что образец № 2 является сортом Каберне-Совиньон, образец № 4 – сортом Рисланер. Профиль образца № 1 совпадает с профилем сорта Мерло, за исключением разницы в двух парах нуклеотидов (п.н.) в одном аллеле локуса VVMD27, что можно объяснить редким случаем мутации в микросателлитной последовательности и не является достаточным основанием утверждать, что образец № 1 и Мерло являются разными сортами. Генетические профили образцов № 3 и № 6 соответствовали сортам сортогруппы Темпранильо, № 5 – сортам сортогруппы Рислинг рейнский, №7 – сортам сортогруппы Пино черный. Сорта в сортогруппах, полученные в результате соматических мутаций (связанных в основном с окраской ягод), имели одинаковый профиль. Принадлежность образцов к указанным сортам в сортогруппах была подтверждена ампелографическим методом. Использование для идентификации сортов в сортогруппах 6-9-ти SSR-маркеров в сочетании с ампелографическими методами позволяет получить достоверные результаты без удорожания работ. Однако дифференциация клонов и сортов, полученных в результате соматических мутаций, только SSR-маркерами потребует значительного увеличения их количества на 1–2 порядка либо использования высоковариабельных SSR-маркеров, таких как VRG (*Vitis riparia* Götzhof). Таким образом, целесообразен более целенаправленный поиск полиморфизмов непосредственно в генах, отвечающих за определенные хозяйственно ценные признаки. В случае возникновения отличия в окраске ягод для дифференциации возможно использовать полиморфизм локуса гена VvMybA1, при изменении во вкусе и аромате ягод – в локусе гена VviDXS, при изменении лигнификации семян – в локусе гена VviAGL11, при повышении устойчивости к заболеваниям – в локусах соответствующих генов резистентности.

Ключевые слова: молекулярная генетика; сорт; генотипирование; SSR-маркер; сортогруппа; соматическая мутация; дифференциация клонов; фактор транскрипции VvMybA1.

Для цитирования: Спотарь Г.Ю., Блинова С.А., Шварцев А.А., Алексеев Я.И., Гориславец С.М. Особенности идентификации сортов и клонов винограда западно-европейского происхождения // «Магарач». Виноградарство и виноделие, 2021;23(2): 125-133. DOI 10.35547/IM.2021.23.2.004

Features of identification grape varieties and clones of Western European origin

Spotar G.Yu.¹, Blinova S.A.², Shvartsev A.A.², Alekseyev Ya.I.^{1,2}, Gorislavets S.M.¹

¹All-Russian National Research Institute of Viticulture and Winemaking Magarach of the RAS, 31 Kirova str., 298600 Yalta, Republic of Crimea, Russian Federation;

²LLC Sintol, 42 Timiryazevskaya str., 127434 Moscow, Russian Federation

Abstract. The identification of grapes related to the most widespread wine varieties of West-European origin was carried out using molecular-genetic and ampelographic methods. Genotyping of samples was provided using 9- nuclear and 3-chloroplast microsatellite markers. Basing on the profiles obtained according to the VVC database, it was established that Sample No. 2 is a 'Cabernet-Sauvignon' variety, and Sample No. 4 is a 'Rieslaner' variety. The profile of Sample No. 1 coincides with the 'Merlot' profile, except for the difference in 2 base pairs (bp) in one allele of the VVMD27 locus, which can be explained by a rare case of mutation in microsatellite sequence, and is not a sufficient reason to insist that Sample No. 1 and the 'Merlot' are different varieties. The genetic profiles of Samples No. 3 and No. 6 corresponded to the varieties of 'Tempranillo' group, No. 5 - to the varieties of 'Rhein Riesling' group, and No. 7 - to the varieties of 'Pinot Noir' group. The varieties of the groups, obtained as a result of somatic mutations (mainly associated with color of berries), had the same profile. The ampelographic method confirmed the origin of samples in the mentioned groups of varieties. Using of 6-9-SSR-markers in combination with ampelographic methods to identify the varieties of groups allows obtaining reliable results without increasing the cost of work. However, differentiation of clones and varieties in groups with only SSR-markers will require a significant increase in their number by 1–2 orders, or using of highly variable SSR-markers, such as VRG (*Vitis riparia* Götzhof). Thus, a more targeted search for polymorphisms directly in genes responsible for certain economically valuable traits is advisable. In case of occurrence a difference in the color of berries, it is possible to use for differentiation the polymorphism of VvMybA1 gene locus, when flavor and aroma of berries change – to use the VviDXS gene locus, when seed lignification changes - the VviAGL11 gene locus, when disease resistance increases - the loci of the corresponding resistance genes.

Key words: molecular genetics; variety; genotyping; SSR-marker; group of varieties; somatic mutation; differentiation of clones; factor of transcription VvMybA1.

For citation: Spotar G.Yu., Blinova S.A., Shvartsev A.A., Alekseyev Ya.I., Gorislavets S.M. Features of identification grape varieties and clones of Western European origin // Magarach. Viticulture and Winemaking, 2021;23(2): 125-133 (in Russian). DOI 10.35547/IM.2021.23.2.004

Введение

Для получения высококачественных марок вин, которые были бы ценны и востребованы на внутреннем и внешнем рынках, используются строго определенные элитные сорта винограда. Виноделие является классической отраслью, в которой производители и потребители часто предпочитают признанные сорта винограда, традиционно связываемые с качеством вина и являющиеся основой самых известных и дорогих вин. В связи с этим важность достоверной и однозначной идентификации сортов и клонов винограда в винодельческой отрасли трудно переоценить.

К наиболее распространенным элитным техническим сортам винограда в мире относятся сорта западно-европейского происхождения. Более 50% площадей мировых виноградников в винодельческой отрасли занимают 16 сортов, первые 14 из которых французского, испанского и итальянского происхождения [1].

Правильная идентификация сортов необходима в работе питомниководческих и селекционных центров для определения чистосортности посадочного материала и соответствия его заявленному сорту, для уточнения родительских форм, восстановления автохтонных сортов и сохранения генетического разнообразия винограда.

Традиционно идентификация сортов и клонов винограда производится ампелографическими методами. Однако это затруднено сортовым разнообразием. В настоящее время количество сортов определяется между 6 000 и 10 000 [2]. Существует множество синонимов и омонимов сортов, что осложняет идентификацию на основе фенотипических признаков. Кроме того наблюдается широкая изменчивость различных образцов винограда из-за разных условий произрастания и высокого полиморфизма, проявляемого этим видом.

Надежный метод идентификации и дифференциации сортов появился с разработкой молекулярных ДНК-маркеров, которые позволяют быстро и точно идентифицировать образцы независимо от условий окружающей среды или стадии роста растений. Среди ДНК-маркеров микросателлитные SSR-маркеры являются наиболее полезными при идентификации сортов винограда. SSR-маркеры позволяют точно идентифицировать сорта, изучать и подтверждать их происхождение, выявлять синонимы, омонимы и примеси в ампелографических коллекциях. В настоящее время методы молекулярно-генетической идентификации генотипов винограда на основе SSR-полиморфизма признаны наиболее достоверными [2–4].

Микросателлитные маркеры или SSR-маркеры (повторы простых последовательностей) – это переменные участки ДНК, представляющие собой tandemные повторы коротких (1–6 парой нуклеотидов) единиц, фланкированные консервативными участками. Они часто встречаются и довольно равномерно распределены по всему геному эукариот. Маркеры на основе микросателлитов моноаллельны, мультиаллельны, кодоминантны и благодаря этим характеристикам стали предпочтительными маркерами

для идентификации растений. Микросателлитные последовательности имеют относительно высокую частоту мутаций, что приводит к увеличению числа аллелей и, следовательно, к высокому уровню полиморфизма [5, 6].

Полиморфизм микросателлитных маркеров выражается в различном количестве повторов и проявляется в виде разных длин аллелей локусов. Этот тип полиморфизма обнаруживается путем амплификации фрагмента ДНК с помощью ПЦР и измерения его длины методом электрофореза высокого разрешения.

Совокупность у микросателлитных маркеров аллелей определенной длины, выраженной в парах нуклеотидов (п.н.), специфична для каждого сорта винограда и однозначно идентифицирует сортовую принадлежность образца.

Научными учреждениями европейского проекта «GENRES 081», с целью стандартизации процедуры идентификации сортов винограда, были выбраны 6 наиболее информативных, полиморфных микросателлитных маркеров: VVS2, VVMD5, VVMD7, VVM27, VrZAG62 и VrZAG79, которые можно рассматривать как необходимый минимальный набор в работах по генотипированию сортов винограда [2, 7].

В европейском проекте «GrapeGen06», одной из целей которого было внедрение точной идентификации сортов винограда, количество маркеров было увеличено до 9-ти с добавлением еще трех: VVMD25, VVMD28, VVMD32. Эти 9 ядерных микросателлитных маркеров являются стандартным набором маркеров в международно признанной системе идентификации сортов винограда [2, 3, 6].

Для определения сортовой принадлежности образца по его генотипу используется находящаяся в открытом доступе международная база данных «Vitis International Variety Catalogue» (VIVC), где представлены генетические профили сортов по 9-ти стандартным ядерным SSR-локусам, а также при наличии информации – указан хлоротип сорта [3, 8].

У западно-европейских сортов винограда характерно наличие сортогрупп (Пино, Мерло, Темпранильо и т.д.), в которые входит множество сортов и клонов, полученных в результате соматических мутаций, что затрудняет идентификацию.

В данном исследовании у представителя сорта Мерло был выявлен и рассмотрен редкий, но возможный случай мутации длины аллеля у одного из 9-ти стандартных микросателлитных маркеров. Также впервые комплексно были рассмотрены вопросы по вероятности дифференциации клонов и сортов в сортогруппах с помощью 9-ти микросателлитных маркеров, о необходимом количестве микросателлитных маркеров для частичной и полной дифференциации клонов, а также представлен целенаправленный поиск полиморфизмов с помощью внутривидовых маркеров.

Для исследуемых западно-европейских сортов проведен сравнительный анализ различной степени полиморфизма генетических профилей по 9-ти микросателлитным маркерам у сортов, полученных в результате соматических мутаций, и сортов, выведенных при скрещивании близкородственных форм.

Целью данной работы является рассмотрение особенностей идентификации западно-европейских технических сортов с помощью молекулярно-генетических SSR-маркеров и ампелографических методов и изучение возникающих проблемных вопросов, в том числе поиск решений дифференциации клонов и сортов в сортогруппах путем применения SSR- и внутригенных маркеров.

Объекты и методы исследований

Образцы сортов винограда, предположительно западно-европейского происхождения, были представлены для идентификации винодельческим хозяйством (Бахчисарайский район, Республика Крым).

Выделение ДНК из свежих листьев винограда осуществляли модифицированным СТАБ-методом (2%) [9]. Количество и чистоту выделенной ДНК определяли на спектрофотометре BioPhotometer plus (Eppendorf, США).

Для генотипирования сортов использовали 9 ядерных (nSSR): VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD25, VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62 и VrZAG79 и 3 хлоропластных (cpSSR) микросателлитных локуса: cstr3, cstr5, cstr10 [6, 7, 10]. Каждый прямой праймер SSR-маркеров был помечен на 5'-конце флуоресцентными метками (6-FAM, 6-TAMRA или 5-R6G). Праймеры были синтезированы в ООО «Синтол» (г. Москва).

Мультиплексную ПЦР проводили на амплификаторе T100 (BIO-RAD, США) при следующих условиях: 1) денатурация при 95 °C – 5 мин.; 2) 35 циклов: при 95 °C – 30 с (денатурация); 58,5 °C – 30 с (отжиг); 72 °C – 45 с (элонгация) 3) при 72 °C – 15 мин. (окончательная элонгация). Амплификация была проведена в общем реакционном объеме 15 мкл, с использованием 2,5-кратной реакционной смеси (ООО «Синтол»), в реакцию брали 20 нг ДНК.

Разделение продуктов амплификации выполняли методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, США) в полимере ПДМА-6 (ООО «Синтол»). Определение длин аллелей проводили в программном приложении GeneMapper (Version 4.0), относительно размерного стандарта GS400HD Rox (Applied Biosystems, США). Стандартизация размеров аллелей была выполнена с использованием распространенных референсных сортов согласно рекомендациям VIVC [8].

Идентификацию представленных образцов с помощью ампелографических методов проводили по основным биолого-морфологическим характеристикам согласно методике ампелографического описания [11, 12].

Обсуждение результатов

Полученные результаты генотипирования 7-ми образцов были сопоставлены по размерам аллелей 9-ядерных микросателлитных локусов и хлоротипу с генотипами сортов, содержащимися в международной базе VIVC [8] (табл.).

Образец №1. По результатам генотипирования выяснилось, что все аллели 9-ти SSR-маркеров и хлоротип идентифицируемого образца № 1 соответствуют профилю сорта Merlot noir (№ 7657) базы VIVC

или Мерло, согласно «Государственному реестру селекционных достижений, допущенных к использованию» (далее Гос. реестр), за исключением меньшего аллеля локуса VVMD27 (табл.). У образца №1 его длина составляет 188 п.н., у сорта Merlot noir – 190 п.н. (рис.). Такое различие можно объяснить мутацией в микросателлитной последовательности, которая возникла из-за проскальзывания ДНК-полимеразы во время репликации на один повторяющийся мотив [5]. Локус VVMD27 имеет динуклеотидный мотив (СТ)_n, а его аллели обычно различаются на 2 п.н.

Различие в одном аллеле не является достаточным основанием утверждать, что идентифицируемый образец не принадлежит соответствующему сорту. В работе Ibanez с соавт. при генотипировании двух древних сортов с Кипра и Греции, считающихся синонимами сорта Коринка черная, было выявлено различие на 2 п.н. в одном аллеле локуса VVMD7 [13], что не повлияло на сортоопределение.

Так как данная мутация произошла в некодирующей части генома, то она не может повлечь изменений в фенотипе растения. По ампелографическим признакам образец № 1 полностью соответствует сорту Мерло.

Сорт Merlot gris (№ VIVC 7656) считается соматической мутацией сорта Merlot noir и отличается от данного сорта при сравнении генотипов по 8 SSR-маркерам по одной аллели маркера VVMD27 и по двум аллелям VrZAG79 на 2 п.н. (табл.) [8, 14].

Образец № 2. Выявлено полное совпадение по 9-ти SSR-маркерам и хлоротипу D [10] идентифицируемого образца № 2 с сортом Cabernet Sauvignon (№ VIVC 1929) по данным базы VIVC или Каберне-Совиньон (согласно Гос. реестру).

В базе VIVC отсутствуют данные о микросателлитных профилях сортов, произошедших от Каберне-Совиньон в результате соматических мутаций (клонов), например профиль Malian (№ VIVC 22608). По ампелографическим признакам образец № 2 соответствует сорту Каберне-Совиньон.

Образцы № 3 и № 6. По 9-ти SSR-маркерам идентифицируемых образцов № 3 и № 6 установлено полное совпадение с сортами: Tempranillo tinto (№ VIVC 12350) или Темпранильо (согласно Гос. реестру), Tempranillo gris (№ VIVC 24703) и Tempranillo blanco (№ VIVC 25057). Tempranillo gris и Tempranillo blanco являются соматическими мутациями сорта Tempranillo tinto. Хлоротип А образцов № 3 и № 6 совпадает с указанным в базе VIVC хлоротипом для Tempranillo tinto. По ампелографическим признакам образцы № 3 и № 6 соответствуют сорту Темпранильо.

Образец №4. По 9-ти SSR-маркерам идентифицируемого образца № 4 установлено полное совпадение с сортом Rieslaner (№ VIVC 10073) или Рисланер (согласно Гос. реестру). Хлоротип сорта Рисланер в базе VIVC отсутствует. Генетические профили клонов сорта Рисланер в базе VIVC также отсутствуют. По ампелографическим признакам образец № 4 соответствует сорту Рисланер.

Образец №5. По 9-ти SSR-маркерам идентифицируемого образца № 5 установлено полное совпадение

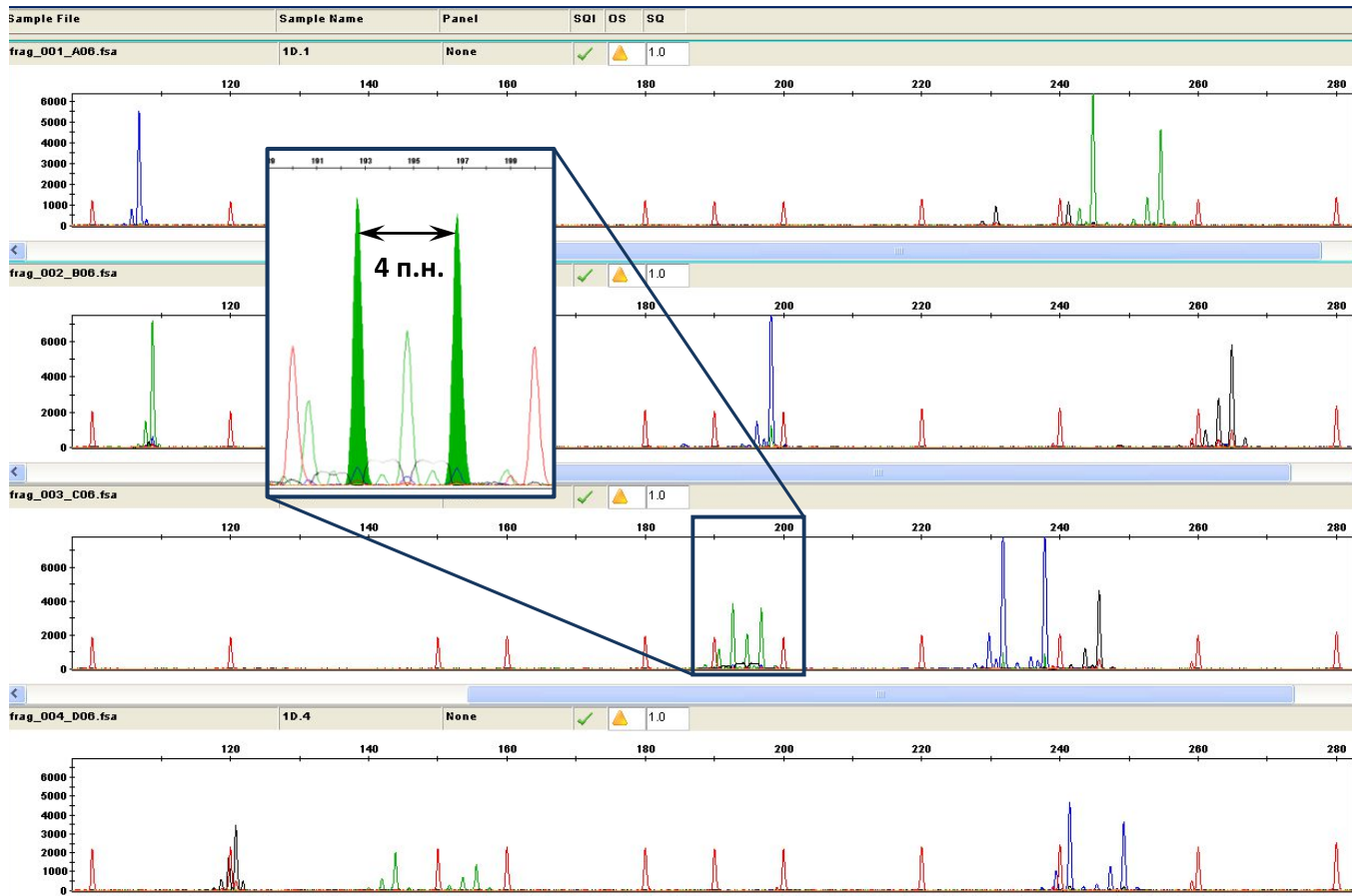


Рис. Микросателлитный профиль по 9-ядерным и 3-хлоропластным SSR-маркерам идентифицируемого образца № 1, соответствующего профилю сорта Мерло за исключением первого аллеля маркера VVMD27 (меньше на 2 п.н.). На выноске – увеличенное изображение аллелей маркера VVMD27.

Fig. Microsatellite profile for 9-nuclear and 3-chloroplast SSR-markers of the identified Sample No. 1, corresponding to the profile of the 'Merlot' variety, with the exception of the first allele of the VVMD27 marker (by 2 bp less). The leader shows enlarged image of the VVMD27 marker alleles.

с сортами Riesling rot (№ VIVC 10076) и Riesling weiss (№ VIVC 10077) или Рислинг рейнский (согласно Гос. реестру). Идентифицированный хлоротип А совпадает с указанным в базе VIVC хлоротипом сорта Riesling weiss. Riesling rot является соматической мутацией окраски кожицы ягод Riesling weiss. По ампелографическим признакам образец № 5 соответствует сорту Рислинг рейнский.

Сорт Geilweilerhof R.S. 276-2 (№ VIVC 4593) получен скрещиванием Riesling weiss x Riesling weiss и отличается от родительской формы по двум аллелям: одной аллелью в VVMD27 и одной аллелью в VrZAG79 (табл., выделено жирным шрифтом). По этим локусам, в отличие от родителей, сорт Geilweilerhof R.S. 276-2 гомозиготен.

Образец №7. По 9-ти SSR-маркерам идентифицируемого образца № 7 установлено полное совпадение профилей в базе VIVC с 10-ю сортами: Pinot blanc (№ 9272) или Пино белый (согласно Гос. реестру), Pinot cioutat (№ 9274), Pinot gris (№ 9275) или Пино серый (согласно Гос. реестру), Pinot meunier (№ 9278), Pinot presocse noir (№ 9280), Pinot teinturier (№ 9283), Pinot violet (№ 9285), Pinot noir (№ 9279) или Пино черный (согласно Гос. реестру), Meunier court maille (№ 17489), Samtrot (№ 22292). Наиболее известные и далее рассмотренные сорта представлены в таблице. Идентифицированный хлоротип А совпадает с указанными в базе VIVC хлоротипами этих сортов. По

ампелографическим признакам образец № 7 соответствует сорту Пино черный.

Первые семь сортов, в том числе и Pinot meunier, считаются соматической мутацией Pinot noir, последние два сорта (Meunier court maille и Samtrot) – мутацией Pinot meunier. Существуют и другие производные сорта, такие как Pinot a fleurs doubles (№ 15082), Pinot rouge (№ 17341), однако их микросателлитный профиль не указан.

Некоторые широко распространенные традиционные сорта, такие как сорта группы Пино, демонстрируют высокую степень изменчивости [15]. Более чем 50 клонов Пино черный официально признаны во Франции по сравнению только с 25-ю из более широко культивируемого сорта Каберне-Совиньон.

Для сравнения наиболее возможной близости генотипов сортов, полученных в результате скрещивания, и сортов, полученных в результате соматических мутаций, в таблице ниже приведены максимально приближенные по генетическому профилю сорта к Пино черный. Это его потомки, полученные в результате скрещивания сортов Пино с сортами, близкими к нему по генетическому профилю: Deckrot (Pinot gris x Teinturier), Carminoir (Pinot noir x Cabernet sauvignon) и Pinot salomon (Pinot x Elbling). Микросателлитный профиль сорта Deckrot отличается от Pinot noir в трех SSR-маркерах по одной аллели, сорта Carminoir и Pinot salomon – в четырех SSR-маркерах по одной

аллели при полной идентичности профиля у сортов, полученных в результате соматических мутаций.

Сорта с изменившейся окраской кожицы ягод в результате соматической мутации хорошо различаются фенотипически от своих исходных сортов, но показывают идентичный молекулярный профиль при анализе с помощью микросателлитных маркеров.

Для дифференциации в базе VIVC сорта Каберне-Совиньон от всех остальных сортов винограда достаточно было значений аллелей двух SSR-маркеров (VVS2, VVMD5), сорта Рисланер – значений аллелей трех SSR-маркеров (VVS2, VVMD5, VVMD7), для дифференциации сортогруппы Мерло достаточно значений аллелей только двух SSR-маркеров (VVS2, VVMD5), сортогруппы Темпранильо и Рислинг – значений аллелей трех SSR-маркеров (VVS2, VVMD5, VVMD7), сортогруппы Пино – значений аллелей четырех SSR-маркеров (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27). Таким образом, идентификация сортов, полученных в результате скрещиваний, с помощью девяти SSR-маркеров не вызывала затруднений. В нашей работе для идентификации сортов и сортогрупп достаточно было использовать от двух до четырех SSR-маркеров (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27).

Однако необходимо учитывать редкую возможность различия в одном из аллелей какого-либо из девяти локусов на 2 п.н. в результате мутации, как в случае с идентификацией образца № 1. Даже близкородственные сорта с наиболее близкими генетическими профилями, в отличие от клонов, различаются в одном аллеле по 3–4-м SSR-локусам из девяти более чем на 2 п.н. (табл.). Использование хлоротипа для идентификации оказалось излишним. Разделение сортов (клонов), полученных в результате соматических мутаций, девятью SSR-маркерами не дало положительных результатов, кроме исключения в случае с сортами Мерло и Мерло серый (табл.).

Потребность в идентификации и дифференциации клонов возрастает из-за необходимости правовой защиты достижений селекционеров [16]. Первое доказательство полиморфизма клонов винограда было получено с использованием мультилокусного метода AFLP (Cervera et al.) [5]. Некоторые исследования с использованием SSR-маркеров по дифференциации сортов, полученных в результате соматических мутаций, а также клонов не дали удовлетворительных результатов, на основании чего был сделан вывод, что микросателлитные маркеры не подходят для клоновой дифференциации [16, 17, 18].

Применение SSR-маркеров для дифференциации сортов и клонов сортогруппы Пино было малоэффективным. Так в работе Regner с соавт. при помощи 34-х SSR-маркеров не удалось различить сорта Пино белый, Пино серый, Пино черный, а также Пино нуар прэкок и их клоны, кроме сорта Самтрот. Полиморфизм между клонами Пино был выявлен при помощи 118 маркеров RAPD. [15, 16]

В исследованиях Nacquigny S. с соавт. с использованием 49-ти микросателлитных маркеров (VVS, VVMD, VMC, VRZAG) для оценки генетического разнообразия в коллекции из 145 образцов, принад-

лежащих сортам Пино серый, Пино черный, Пино белый, Пино Менье и Пино Моур – 95 клонов (65%) имели один и тот же генотип. В оставшихся 45 клонов проявлением полиморфизма было появление третьего и четвертого аллелей, отражающего химерное состояние растений. И только у 5 клонов одна из аллелей была увеличена на 2 п.н. [5].

Согласно результатам Regner с соавт., при помощи 35-ти SSR-маркеров (VVS, VVMD и VRZAG) не удалось обнаружить полиморфизм у 13 клонов Пино черный, которые имели морфологические и агрономические различия [19].

В ряде работ, где для дифференциации сортов в сортогруппах и клонов других западно-европейских сортов применялось небольшое количество SSR-маркеров, были получены отрицательные результаты. Так с помощью 9 микросателлитных маркеров (VVS, VVMD) не удалось выявить полиморфизм у 24 клонов сорта Траминер, в отличие от методов AFLP и MSAP [20]. В сортогруппах Мерло, Шасла, Траминер, Пино, содержащих по 2–3 сорта, различающихся окраской ягод, при использовании 14 SSR-маркеров (VVS, VVMD, VRZAG) различий в размере аллелей внутри сортогрупп также выявлено не было [21].

В исследовании Meneghetti с соавт. была изучена генетическая изменчивость 53 генотипов (клонов) Гренаш (Гарнач), происходящих из разных районов Италии, Франции и Испании с различными местными названиями, где этот сорт культивировался на протяжении нескольких веков. При использовании 14-ти SSR-маркеров (VVS, VVMD, VMC, VRZAG, ISV), был установлен общий генетический профиль без изменений в аллельном составе с выявлением в четырех образцах дополнительного аллеля в одном из маркеров (химерное состояние). Помимо микросателлитного анализа, было проведено исследование с использованием молекулярных маркеров AFLP, SAMPL и M-AFLP. Только с помощью маркеров M-AFLP удалось дифференцировать все образцы, при этом было получено 2391 продукт амплификации с тремя системами молекулярных маркеров: 795 – AFLP, 608 – SAMPL и 988 – M-AFLP. [22].

Только в нескольких работах микросателлитные локусы позволили различить клоны одного и того же сорта (Ibanez и др.; Merdinoglu и др. 2000; Regner и др.) [5, 13, 15]. В работе Ibanez и др. по генотипированию двух древних сортов с Кипра и Греции, считающихся синонимами сорта Коринка черная, 16-ю SSR-маркерами (VVS, VVMD, VRZAG) было выявлено различие в одном аллеле одного локуса. При использовании RAPD-анализа с 11 праймерами полиморфизма генотипов не выявлено [13].

При использовании малого количества SSR-маркеров (9–14 шт.), полиморфизм, за некоторым исключением, выявить не удастся, при увеличении числа локусов возможна частичная дифференциация клонов.

Таким образом, дифференциация клонов и сортов, полученных в результате соматических мутаций, ограничена не применяемым типом ДНК-маркера, а количеством используемых локусов. В случае ис-

Таблица. Генотипы идентифицируемых образцов и соответствующих им сортов, содержащихся в международной базе VIVC**Table.** Genotypes of the identified samples and the corresponding varieties contained in the international VIVC database

Генотип идентифицируемой формы/ Генотип базы VIVC	VVS2		VVMD5		VVMD7		VVMD25		VVMD27		VVMD28		VVMD32		VtZAG62		VtZAG79		Хло-ротип
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
Образец №1	139	151	228	238	239	247	239	249	188	192	228	234	240	240	194	194	259	259	C
MERLOT NOIR	139	151	228	238	239	247	239	249	190	192	228	234	240	240	194	194	259	259	C
MERLOT GRIS (m)	139	151	228	238	239	247	239	251	190	192	228	234	-	-	194	194	257	257	-
Образец №2	139	151	234	242	239	239	239	249	176	190	234	236	240	240	188	194	247	247	D
SABERNET SAUVIGNON	139	151	234	242	239	239	239	249	176	190	234	236	240	240	188	194	247	247	D
Образец №3	143	145	238	238	239	253	241	255	184	184	258	258	250	252	196	200	247	251	A
Образец №6	143	145	238	238	239	253	241	255	184	184	258	258	250	252	196	200	247	251	A
TEMPRANILLO TINTO	143	145	238	238	239	253	241	255	184	184	258	258	250	252	196	200	247	251	A
TEMPRANILLO GRIS (m)	143	145	238	238	239	253	241	255	184	184	258	258	250	252	196	200	247	251	-
TEMPRANILLO BLANCO (m)	143	145	238	238	239	253	241	255	184	184	258	258	250	252	196	200	247	251	-
Образец №4	151	151	228	228	243	249	249	249	182	195	228	236	272	272	188	204	243	249	D
RIESLANER	151	151	228	228	243	249	249	249	182	195	228	236	272	272	188	204	243	249	-
Образец №5	143	151	228	236	249	257	249	255	182	190	228	234	252	272	194	204	243	245	A
RIESLING WEISS	143	151	228	236	249	257	249	255	182	190	228	234	252	272	194	204	243	245	A
RIESLING ROT (m)	143	151	228	236	249	257	249	255	182	190	228	234	252	272	194	204	243	245	-
GEILWEILERHOF R.S. 276-2 (RxR)	143	151	228	236	249	257	249	255	190	190	228	234	252	272	194	204	245	245	-
Образец №7	137	151	230	240	239	243	239	249	186	190	218	236	240	272	188	194	239	245	A
PINOT NOIR	137	151	230	240	239	243	239	249	186	190	218	236	240	272	188	194	239	245	A
PINOT BLANC (m)	137	151	230	240	239	243	239	249	186	190	218	236	240	272	188	194	239	245	A
PINOT GRIS (m)	137	151	230	240	239	243	239	249	186	190	218	236	240	272	188	194	239	245	A
PINOT PRECOCE NOIR (m)	137	151	230	240	239	243	239	249	186	190	218	236	240	272	188	194	239	245	A
PINOT MEUNIER (m)	137	151	230	240	239	243	239	249	186	190	218	236	240	272	188	194	239	245	A
MEUNIER COURT MAILLE (m/m)	137	151	230	240	239	243	239	249	186	190	218	236	240	272	188	194	239	245	A
SAMTROT (m/m)	137	151	230	240	239	243	239	249	186	190	218	236	240	272	188	194	239	245	A
DECKROT (PxX)	137	151	230	240	239	243	249	249	190	190	218	236	240	272	188	194	245	245	-
PINOT SALOMON (PxX)	137	151	230	240	239	249	239	249	186	190	228	236	240	240	194	204	239	245	-
CARMINOIR (PxX)	137	151	230	234	239	243	239	249	176	186	236	236	240	272	188	194	239	247	-

Примечания:

m – считается соматической мутацией сорта, указанного выше.

m/m – соматическая мутация сорта Pinot Meunier.

RxR – сорт, полученный в результате скрещивания Riesling weiss x Riesling weiss.

PxX – сорта, полученные в результате скрещивания Pinot с сортами, наиболее близкими по генетическому профилю к Pinot.

пользования только SSR-маркеров, по-видимому, их количество, за редким исключением, должно достигать от 50-ти до нескольких сотен, что ведет к увеличению трудоемкости и стоимости анализа. Применение более вариабельных локусов VRG (*Vitis Riparia Götzhof*), по сравнению с другими SSR-маркерами винограда, должно сократить трудозатратность [19].

При помощи 11-ти VRG-маркеров были успешно дифференцированы 13 клонов Пино черный. Маркеры VRG дали разные аллельные профили и позволили провести клональную идентификацию. Полиморфизмы SSR- локусов проявлялись в образовании новых аллелей разного размера, нулевых аллелей, в добавлении третьего или четвертого аллеля из-за химеризма. Для клональной идентификации будет очень полезно использование SSR-маркеров, таких как VRG, которые маркируют более высоковариабельные области в

геноме [19].

Рассмотренные случаи (Ibanez и др.; Hocquigny S. и др.; Meneghetti с соавт.) были связаны с сортами (клонами), изолированно культивировавшимися продолжительное время, иногда столетиями, что приводило к накоплению у них мутаций, которые позволяют их дифференцировать [5, 13, 22]. Фактически, большинство традиционных технических западно-европейских сортов, используемых сейчас, были получены несколько столетий назад и с тех пор вегетативно размножаются. Если говорить о выделении клона на винограднике в результате селекции в настоящее время, период расхождения для накопления мутаций с соседним растением будет минимальным, что значительно усложнит процесс дифференциации.

Рассмотренные в данном исследовании сорта групп Мерло, Темпранильо, Рислинг и Пино, полу-

ченные в результате соматических мутаций и демонстрировавшие одинаковый генетический профиль, отличались в основном окраской кожицы ягод. В связи с чем, для их дифференциации считаем целесообразным искать геномные различия между этими сортами (клонами) не в случайных мутациях во всем геноме, а в кодирующей части генома – генах, отвечающих непосредственно за проявление определенных хозяйственно ценных признаков, в данном случае – окраски ягод.

В этом направлении был проведен ряд исследований, направленных на изучение изменения в промоторной области гена фактора транскрипции *VvMybA1*, регулирующего окраску ягод винограда. Встраивание ретротранспозона *Gret1* в промотор *VvMybA1* блокирует транскрипцию гена *ufgt*, кодирующего ключевого фермента в пути биосинтеза антоцианов, что приводит к фенотипу белой окраски ягод [1, 23, 24].

Для дифференциации сортов, полученных в результате соматических мутаций и имеющих разную окраску ягод, в работе Vodor и др. использовались три олигонуклеотидных праймера для обнаружения вставки ретротранспозона *Gret1*. Сорта в сортогруппе Шасла удалось дифференцировать по наличию или отсутствию ретротранспозона *Gret1*, в то время как сорта в сортогруппах Мерло, Траминер оставались неотличимы. Также удалось отделить сорт Пино белый от остальных сортов сортогруппы Пино [21].

В работе Giannetto и др. был предложен простой, недорогой и быстрый диагностический инструмент для распознавания соматических вариаций окраски кожицы ягод, на основе трех пар праймеров для анализа промоторной области *VvMybA1*. Удалось распознать не только белые сорта в сортогруппах, но и дифференцировать сорта с черной окраской ягод от менее окрашенных с помощью количественных методов анализа, в частности Пино черный от Пино серый, Канайоло nero от Канайоло розе, Мерло от Мерло серый и Мерло розе [23].

В работе (Migliaro D. и др.) был предложен набор из 11-ти SSR-маркеров для идентификации сортов винограда с измененной окраской кожицы ягод в результате мутации, который подходит для сортов группы Пино [25].

В данной статье рассмотрена идентификация наиболее распространенных в мире технических сортов винограда западно-европейского происхождения, для которых характерно наличие сортогрупп и клонов, затрудняющих идентификацию. При изучении менее известных сортов, например среднеазиатских, возникает иное затруднение в связи с отсутствием генетических профилей данных сортов в базах данных.

Выводы

1. Выявление при идентификации сортов различия в 2 п.н. в одной из аллелей любого SSR-маркера между генотипом исследуемого образца и генотипом из базы сортов не является достаточным основанием утверждать, что идентифицируемый образец не принадлежит соответствующему сорту, и объясняется довольно редким для стандартных 9-ти SSR-маркеров случаем мутации в микросателлитной последователь-

ности.

2. Использование для идентификации сортов 6–9-ти SSR-маркеров, в сочетании с ампелографическими методами является наиболее оптимальным вариантом, позволяющим получить достаточно точные результаты без удорожания работ. В случае совпадения генетического профиля идентифицируемого образца с профилем нескольких сортов, полученных в результате соматических мутаций, как в сортогруппах западно-европейских сортов, образец идентифицируется по фенотипическому признаку окраски ягод, так как большинство таких сортов в группах различается вариабельностью этого признака.

3. Дифференциация клонов и сортов, полученных в результате соматических мутаций, только SSR-маркерами потребует значительного увеличения их количества предположительно от 50-ти до нескольких сотен либо использования для анализа высоковариабельных SSR-маркеров, таких как VRG.

4. Для дифференциации клонов и сортов, полученных в результате соматических мутаций, целесообразен более целенаправленный поиск полиморфизма непосредственно в генах, отвечающих за возникновение у клона или сорта определенных хозяйственно ценных признаков. В случае отличия клона или сорта окраской ягод для дифференциации возможно использовать полиморфизм локуса гена *VvMybA1*, при изменении во вкусе и аромате ягод – в локусе гена *VviDXS*, при изменении лигнификации семян – в локусе гена *VviAGL11*, при повышении устойчивости к заболеваниям – в локусах соответствующих генов резистентности.

Источник финансирования

Исследования выполнены в рамках государственного задания № 0833-2019-0016.

Financing source

The work was conducted under public assignment No. 0833-2019-0016.

Конфликт интересов

Не заявлен.

Conflict of interests

Not declared.

Список литературы

1. Carbonell-Bejerano P., Royo C., Mauri N., Ibáñez J. Somatic variation and cultivar innovation in grapevine. *Advances in Grape and Wine Biotechnology*. Intech Open. 2019.
2. Laucou V., Lacombe T., Dechesne F. et al. High through put analysis of grape genetic diversity as a tool for germ plasm collection management. *Theoretical and Applied Genetics*. 2011;122(6):1233-1245.
3. Maul E., Töpfer R. *Vitis International Variety Catalogue (VIVC): A cultivar database referenced by genetic profiles and morphology*. BIO Web of Conferences. EDP Sciences. 2015;5:01009.
4. Maul E., Töpfer R., Carka F. et al. Identification and characterization of grapevine genetic resources maintained in Eastern European Collections. *Vitis*. 2015;54:5-12.
5. Hocquigny S., Pelsy F., Dumas V., Kindt S., Heloir M.-C., Merdinoglu D. Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states. *Genome*. 2004;47(3):579-589.
6. Гориславец С. М., Володин В. А., Спотарь Г. Ю., Рисованная В. И., Алексеев Я. И. Генотипирование сортов ви-

- нограда селекции Института Магарач на основе анализа аллельного полиморфизма SSR-локусов. Магарач. Виноградарство и виноделие. 2019;21(4):289-293..
- This P., Jung A., Boccacci P. et al. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivar. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004;109(7):1448-1458.
 - Vitis International Variety Catalogue VIVC. Julius Kuhn-Institut. [Electronic resource]. <http://www.vivc.de/index.php> (Date of application: 15.04.2021).
 - Rogers S. O., Bendich A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant molecular biology*. 1985;5 (2):69-76.
 - Arroyo García R., Ruiz Garcia L., Bolling L. et al. Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Molecular ecology*. 2006;15(12):3707-3714.
 - Codes des caracteres descriptifs des varietes et especes de Vitis. OIV, 2009. Website <https://www.oiv.int/en/>.
 - Мелконян М.В., Волынкин В.А. Методика ампелографического описания и агроботанической оценки винограда. Ялта: ИВиВ "Магарач". 2002:27 с.
 - Ibanez J., Andres M., Borrego J. Allelic variation observed at one microsatellite locus between the two synonym grape cultivars Black Currant and Mavri Corinthiaki. *Vitis*. 2000;39(4):173-174.
 - D'Onofrio C., Scalabrelli G. Merlot. 2015. CINECA IRIS Institutional Research Information System. <https://arpi.unipi.it>
 - Regner F., Stadlbauer A. Eisenheld C. et al. Genetic relationships among Pinots and related cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2000; 51(1):7-14.
 - Forneck A. Plant breeding: clonality – a concept for stability and variability during vegetative propagation. *Progress in Botany*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2005;164-183.
 - Lisek A., Lisek J. Assessment of genetic diversity and relationships among grapevine cultivars originating in Central and Eastern Europe and North America using ISSR-markers. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*. 2019;18(5).
 - Pelsy F., Hocquigny S., Moncada X., Barbeau G., Forget D., Hinrichsen P., Merdinoglu D. An extensive study of the genetic diversity within seven French wine grape variety collections. *Theoretical and Applied Genetics*. 2010;120(6):1219-1231.
 - Regner F., Hack R., Santiago J. L. Highly variable Vitis microsatellite loci for the identification of Pinot Noir clones HBLA u. BA für Wein und Obstbau, Klosterneuburg, Austria. *Vitis*. 2006;45(2):85-91.
 - Imazio S. et al. Molecular tools for clone identification: the case of the grapevine cultivar 'Traminer'. *Plant Breeding*. 2002;121(6):531-535.
 - Bodor P. Szoke A., Toth-Lencses K. et al. Differentiation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) conculata members based on molecular tools. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2014;28(1):14-20.
 - Meneghetti S., Costacurta A., Frare E. et al. Clones identification and genetic characterization of Garnacha grapevine by means of different PCR-derived marker systems. *Molecular biotechnology*. 2011;48(3):244-254.
 - Giannetto S., Velasco R., Troglio M. et al. A PCR-based diagnostic tool for distinguishing grape skin color mutants. *Plant Science*. 2008;175(3):402-409.
 - Klimenko V.P., Studennikova N.L., Kotolovets Z.V. Biotypes of grape varieties common in Crimea. Yalta: FSBSI Institute Magarach of the RAS. 2020:65 p. (in Russian).
 - Migliaro D., Nardi B., Vezzulli S., Crespan M. An upgraded core set of 11 SSR markers for grapevine cultivar identification: the case of berry-color mutants. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2017;68(4):496-498.
- ### References
- Carbonell-Bejerano P. Royo C., Mauri N., Ibáñez J. Somatic variation and cultivar innovation in grapevine. *Advances in Grape and Wine Biotechnology*. Intech Open. 2019.
 - Laucou V., Lacombe T., Dechesne F. et al. High through put analysis of grape genetic diversity as a tool for germ plasm collection management. *Theoretical and Applied Genetics*. 2011;122(6):1233-1245.
 - Maul E., Töpfer R. Vitis International Variety Catalogue (VIVC): A cultivar database referenced by genetic profiles and morphology. *BIO Web of Conferences*. EDP Sciences. 2015;5:01009.
 - Maul E., Töpfer R., Carka F. et al. Identification and characterization of grapevine genetic resources maintained in Eastern European Collections. *Vitis*. 2015;54:5-12.
 - Hocquigny S., Pelsy F., Dumas V., Kindt S., Heloir M-C., Merdinoglu D. Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states. *Genome*. 2004;47(3):579-589.
 - Gorislavets S.V., Volodin V.A., Spotar G.Yu. Risovannaya V.I., Alekseev Ya.I. Genotyping of grape varieties released by the Institute Magarach based on analysis of allelic polymorphism of SSR-loci. *Viticulture and Winemaking*. 2019;21(4):289-293 (in Russian).
 - This P., Jung A., Boccacci P. et al. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivar. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004;109(7):1448-1458.
 - Vitis International Variety Catalogue VIVC. Julius Kuhn-Institut. [Electronic resource]. <http://www.vivc.de/index.php> (Date of application: 15.04.2021).
 - Rogers S. O., Bendich A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant molecular biology*. 1985;5 (2):69-76.
 - Arroyo García R., Ruiz Garcia L., Bolling L. et al. Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Molecular ecology*. 2006;15(12):3707-3714.
 - Codes des caracteres descriptifs des varietes et especes de Vitis. OIV, 2009. Website <https://www.oiv.int/en/>.
 - Melkonyan M.V., Volynkin V.A. Methods of ampelographic description and agrobiological evaluation of grapes. Yalta: IV&W Magarach. 2002: 27 p. (in Russian)
 - Ibanez J., Andres M., Borrego J. Allelic variation observed at one microsatellite locus between the two synonym grape cultivars Black Currant and Mavri Corinthiaki. *Vitis*. 2000;39(4):173-174.
 - D'Onofrio C., Scalabrelli G. Merlot. 2015. CINECA IRIS Institutional Research Information System. <https://arpi.unipi.it>
 - Regner F., Stadlbauer A. Eisenheld C. et al. Genetic relationships among Pinots and related cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2000; 51(1):7-14.
 - Forneck A. Plant breeding: clonality – a concept for stability and variability during vegetative propagation. *Progress in Botany*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2005;164-183.
 - Lisek A., Lisek J. Assessment of genetic diversity and relationships among grapevine cultivars originating in Central and Eastern Europe and North America using ISSR-markers. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*. 2019;18(5).
 - Pelsy F., Hocquigny S., Moncada X., Barbeau G., Forget D., Hinrichsen P., Merdinoglu D. An extensive study of the genetic diversity within seven French wine grape variety collections.

- Theoretical and Applied Genetics. 2010;120(6):1219-1231.
19. Regner F., Hack R., Santiago J. L. Highly variable *Vitis* microsatellite loci for the identification of Pinot Noir clones HBLA u. BA für Wein und Obstbau, Klosterneuburg, Austria. *Vitis*. 2006;45(2):85-91.
20. Imazio S. et al. Molecular tools for clone identification: the case of the grapevine cultivar 'Traminer'. *Plant Breeding*. 2002;121(6):531-535.
21. Bodor P., Szoke A., Toth-Lencses K. et al. Differentiation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) *conculta* members based on molecular tools. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2014;28(1):14-20.
22. Meneghetti S., Costacurta A., Frare E. et al. Clones identification and genetic characterization of Garnacha grapevine by means of different PCR-derived marker systems. *Molecular biotechnology*. 2011;48(3):244-254.
23. Giannetto S., Velasco R., Troglio M. et al. A PCR-based diagnostic tool for distinguishing grape skin color mutants. *Plant Science*. 2008;175(3):402-409.
24. Klimenko V.P., Studennikova N.L., Kotolovets Z.V. Biotypes of grape varieties common in Crimea. Yalta: FSBSI Institute Magarach of the RAS. 2020:65 p. (*in Russian*).
25. Migliaro D., Nardi B., Vezzulli S., Crespan M. An upgraded core set of 11 SSR markers for grapevine cultivar identification: the case of berry-color mutants. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2017;68(4):496-498.

Информация об авторах

Геннадий Юрьевич Спотарь, аспирант, мл. науч. сотр. лаборатории молекулярно-генетических исследований, probud@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6725-250X>;

София Алексеевна Блинова, науч. сотр., sofya.blinova@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6782-8353>;

Алексей Анатольевич Шварцев, науч. сотр., alexey.sva@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2786-9860>;

Яков Игоревич Алексеев, канд. биол. наук, директор по науке ООО "Синтол", ст. науч. сотр. лаборатории молекулярно-генетических исследований1, jalex@syntol.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1696-7684>;

Светлана Михайловна Гориславец, канд. биол. наук, зав. лабораторией молекулярно-генетических исследований, goricvet_2@rambler.ru, <http://orcid.org/0000-0002-6749-8048>.

Information about authors

Gennadiy Yu. Spotar, Postgraduate, Junior Staff Scientist of Laboratory of Molecular Genetic Research, probud@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6725-250X>;

Sofya A. Blinova, Staff Scientist, sofya.blinova@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6782-8353>;

Aleksey A. Shvartsev, Staff Scientist, alexey.sva@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2786-9860>;

Yakov I. Alekseyev, Cand.Biol.Sci., Director of Research2, Senior Staff Scientist of Laboratory of Molecular Genetic Research1, jalex@syntol.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1696-7684>;

Svetlana M. Gorislavets, Cand.Biol.Sci., Head of Laboratory of Molecular Genetic Research, goricvet_2@rambler.ru, <http://orcid.org/0000-0002-6749-8048>.

Статья поступила в редакцию 17.04.2021, одобрена после рецензии 17.05.2021, принята к публикации 20.05.2021