

На правах рукописи

МИЛОВАНОВ АЛЕКСАНДР ВАЛЕРИЕВИЧ

**АМПЕЛО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОРТОВ
И КЛОНОВ
*VITIS VINIFERA L.***

Специальность 06.01.05 – селекция и семеноводство
сельскохозяйственных растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Краснодар – 2016

Диссертационная работа выполнена на кафедре виноградарства Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Кубанский государственный аграрный университет» в 2013–2015 гг.

- Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Трошин Леонид Петрович
- Официальные оппоненты: Коваленко Н.Н., д.б.н., ведущий научный сотрудник
Дубина Е.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник
- Ведущая организация: ФГБНУ «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства»

Защита состоится «__» _____ 2016 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 220.038.03, созданного на базе ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный аграрный университет» по адресу: 350044, г. Краснодар, ул. Калинина, 13 (главный корпус, 1-й этаж, ауд. 106), тел./факс: 8 (861) 221-57-93.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный аграрный университет», 350044, г. Краснодар, ул. Калинина, 13 и на сайте – <http://www.kubsau.ru>; с авторефератом – на сайтах Высшей аттестационной комиссии – <http://www.vak.ed.gov.ru> и ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный аграрный университет» <http://www.kubsau.ru>.

Автореферат разослан «__» _____

2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д _____._____._____,
доктор биологических наук, профессор

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Культурный виноград *Vitis vinifera* subsp. *sativa* D. C. является одной из ценных плодово-ягодных культур в мире по экономической эффективности и площади выращивания.

Сорта винограда, которые возделываются веками в традиционных винодельческих регионах, все чаще заменяются более высокопродуктивными клонами. Генетическое разнообразие, накопившееся за столетия культивирования традиционных сортов, крайне важно для улучшения их генома. Аборигенные сорта, вытесняемые новыми, представляют собой огромный, еще не раскрытый пласт знаний и значительный источник ценных генов для селекционной науки. Поэтому так важна молекулярно-генетическая идентификация коллекции АЗОСВиВ (Анапская зональная опытная станция виноградарства и виноделия), позволяющая не только узнать ее биологическое разнообразие, но также установить сортосоответствие в сравнении с другими известными мировыми коллекциями.

Степень разработанности темы исследования. Обширная исследовательская программа проводится во всех странах развитого виноградарства на распространенных известных сортах для отбора «чистокровных» высокоурожайных и высококачественных генотипов. Целью проведения этих исследований является обеспечение материальной и теоретической базы для обоснования совершенствования клоновой селекции и повышения ее результативности.

Сортовой состав популяций винограда Краснодарского края многообразен. Распространение современной методологии клоновой селекции выявило перспективность использования молекулярно-генетических методов анализа, что повысило ее эффективность, особенно после открытия наличия микросателлитных аллелей, набор которых специфичен для каждого сорта винограда.

Цель диссертационной работы. Целью исследования представленной работы является молекулярно-генетический анализ сортов и клонов *Vitis vinifera sativa* D. C. для обоснованности отбора протоклонов и создание базы молекулярно-генетических данных о дикорастущем винограде Краснодарского края, Республики Адыгея и аборигенных сортах, сохраненных на Анапской зональной опытной станции виноградарства и виноделия (АЗОС ВиВ).

Задачи исследований:

1. Оценить полиморфизм сортов и клонов винограда на основе использования 6 микросателлитных локусов в качестве маркерной системы.
2. Провести кластеризацию клонов методом «Одиночной связи» для определения степени генетического родства среди них.
3. Оценить полиморфизм дикорастущего винограда и аборигенных сортов на основе использования 9 основных и 16 дополнительных микросателлитных локусов в качестве маркерной системы.

4. Осуществить кластеризацию аборигенных сортов и дикорастущего винограда методом «Одиночной связи» для определения степени их генетического родства.

Научная новизна исследований. В данной работе впервые были исследованы дикорастущие формы и аборигенные сорта винограда России по большому набору молекулярно-генетических маркеров, а также исследованы новые группы клонов столовых и технических сортов Антоний Великий, Анюта, Гелиос, Долгожданный и Ливия с использованием микросателлитных маркеров и выполнена оценка внутрипопуляционного молекулярно-генетического родства среди них.

Теоретическая и практическая значимость работы. С помощью усовершенствованной методики оценено молекулярно-генетическое разнообразие исследованных в работе сортов и клонов винограда, отобраны высокопродуктивные протоклоны и переданы лучшие под названиями Пиногрик и Семидесятилетие Победы (приложения А, Б, С и D диссертации) на государственное испытание Российской Федерации. Эти высокопродуктивные генотипы представляют значительный интерес для селекции и сортоулучшения. В соавторстве созданы два сорта, что подтверждено соответствующими справками: Пиногрик / Л. П. Трошин, А. С. Звягин, А. В. Милованов и др. // Заявка на патент № 63160 от 29.11.2013; Семидесятилетие Победы / Л. П. Трошин, А. В. Милованов и др. // Заявка на патент № 6672 от 15.01.2015. Создана база молекулярно-генетических данных об аборигенных сортах и дикорастущем винограде по 24 микросателлитным маркерам, а также оценено их родство, выявлены синонимы и клоны, подтверждена чистосортность материала.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Ампело-генетическая характеристика производственных сортов и клонов винограда Каберне-Совиньон, Рислинг, Пино серый, Алиготе и Мерло.

2. Ампело-генетическая характеристика некоторых интродуцентов и новых селекционных сортов (Виктор, Солярис, Богатыновский, Каберне карбон, Антоний Великий, Преображение, Первозванный, Каберне кортис, Монарх, Аркадия розовая, Гелиос, Анюта, Ливия и Долгожданный).

3. Ампело-генетическая характеристика чистосортных и близкородственных аборигенных сортов винограда, культивируемых в АЗОС ВиВ, по молекулярно-генетическим признакам.

4. Ампело-генетическая характеристика дикорастущих форм винограда *Vitis silvestris* Gmel. Краснодарского края и Республики Адыгея и гибридных генотипов Абинск № 3, № 5, № 7, № 8 и № 9.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты экспериментальных исследований, выводы по диссертации обосновываются выбором современных и точных экспериментальных методов анализа и использованием большого числа молекулярно-генетических маркеров. Результаты исследований доложены на заседаниях кафедры виноградарства аграрного университета, региональных, всероссийских научно-практических, ме-

ждународных конференциях и симпозиумах (2013–2015 гг., включая 2015 г.). Доклад по теме диссертации удостоен 3 места в 3 (финальном) этапе Всероссийского конкурса на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых вузов Минсельхоза РФ в номинации «Биологические науки».

Реализация результатов работы. В Госсорткомиссию РФ передано 4 заявки на технические сорта: Пиногрик, Семидесятилетие Победы, Сенной К и Анри К. Наши сорта используются в производственных условиях и хозяйствах ОАО «Южная» и ОАО АПФ «Фанагория». Создан и внесен в международную базу данных обширный банк молекулярно-генетических фингерпринтов аборигенных сортов и дикорастущих форм винограда.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ в периодических изданиях, рекомендованных ВАК, в том числе 1 на английском языке в журнале *Vitis*, который входит в базу данных статей Scopus.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, включает изложение и обсуждение результатов, выводов, предложений для практической селекции, списка литературы и приложений. Работа изложена на 226 страницах машинописного текста, содержит 50 таблиц, 102 рисунка и 29 приложений. Список литературы включает 183 источника, в том числе 109 – иностранных авторов.

2 ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Исследования проводились на кафедрах виноградарства, биотехнологии, биохимии и биофизики Кубанского государственного аграрного университета, а также в Юлиус-Кюн Институт (*Julius-Kuhn Institute*, Германия, Зибельдинген). Исследования проводились с 2011 по 2015 гг.

2.1 Исходный материал и методы его исследования

Объектами исследований являлись столовые и технические сорта винограда (всего 211 генотипов), а также дикорастущий виноград Краснодарского края и Республики Адыгея *Vitis silvestris* Gmel. (15 генотипов). Отбор протоклонов и сортов проводился профессором Трошиным Л. П., аспирантами Звягиным А. С. и Подваленко П. П.

2.2 Подготовка растительного материала и выделение ДНК

Выделение ДНК проводилось тремя методами: № 1 модифицированный СТАБ-метод, № 2 при помощи набора реагентов для выделения ДНК «Сорб-ГМО-А», компании «Синтол», ВНИИСБ, и № 3 *ReqGOLD Plant DNA mini kit* компании VWR Company.

2.3 Молекулярно-генетические маркеры, использованные в работе по отбору протоклонов винограда

Для изучения сортов и клонов в работе использовались 6 нейтральных микросателлитных маркеров: VrZag62, VrZag79, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2. Они были синтезированы компаниями ЗАО «Синтол» и ЗАО «Бигль».

При генотипировании аборигенных сортов и дикорастущего винограда использовались 24 микросателлитных маркера: VrZag47, VrZag79, VrZag62, VVS2, VVIV67, VVIN16, VMC1B11, VVIP60, VVMD25, VVIN73, VrZag67, VVMD5, VVIB01, VVIN54, VVMD32, VrZag83, VVMD27, VVIQ52, VVIV37, VVIP31, VVMD7, VVMD24, VVMD21 и VVMD28, а также маркер на половую принадлежность, собранные в 6 мультиплексов.

2.4 Проведение полимеразной цепной реакции, электрофореза, визуализации продуктов амплификации и анализ фотографий электрофореграмм

Оценка близости генетического родства при применении микросателлитных маркеров требует определения точной разницы в размерах амплифицированного участка ДНК у исследуемых сортов. В качестве референсных сортов использовались Рислинг, Мерло, Пино блан, Каберне фран, Каберне-Совиньон. Для каждой праймерной пары были использованы оптимальные условия полимеразной цепной реакции, обеспечивающие высокий выход амплифицированного продукта: 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.

В состав ПЦР-смеси входили: 10–40 нг ДНК, 0,05мМ dNTP (дезоксирибонуклеотидтрифосфат), 0,2 мМ каждого праймера, 1–2 единицы Taq-полимеразы, 25 мМ KCl, 60 мМ Tris-HCl, pH = 8,5, 1,5 мМ MgCL₂, в общем объеме реакционной смеси 25 мкл. Амплификация была проведена в амплификаторах Терцик производства НПО «ДНК-технологии», Россия и ДТ-322 «ДНК Технология». Электрофорез продуктов амплификации ДНК с использованием микросателлитных маркеров проводили в 6 % полиакриламидном геле при напряжении 250 V в течение 3–4 часов. В работе был использован аппарат вертикального электрофореза VE-3 фирмы Хеликон. После электрофореза гелевые пластины помещали на 15 минут в раствор бромистого этидия 5 мкг/мл и фотографировали в ультрафиолете.

Размер аллелей микросателлитных локусов определяли с использованием программы Gel-Pro Analyzer 3.1. Как указывалось ранее, при подсчете ошибки количества нуклеотидов в полиакриламидном геле использовались референсные сорта. Для отбраковки «неэффективных» аллелей использовали

*N =: 50 °С для маркеров VrZag62 и VrZag79; 52 °С для маркера VVS2; 55 °С для маркеров VVMD5 и VVMD7; 56 °С для маркера VVMD27.

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 референсными сортами с известным заранее количеством пар нуклеотидов принималось во внимание то, что ошибка геля составляет 5 п. н. (здесь и далее п. н. – это пар нуклеотидов). Поэтому все, что меньше этого показателя принималось как несущественное различие. Далее, чтобы также уменьшить количество неэффективных аллелей, при всём вышесказанном, так как менее 5 п. н. несущественно, в таблицу вносились следующие изменения: вставлялась аллель референсного сорта, так как считалось, что они не отличаются. Таким образом, существенно снизилось количество неэффективных аллелей, более того, как видно далее из построения дендрограммы, показана эффективность данного метода, так как отсутствует перемешивание сортов при кластеризации сортогрупп. При отсутствии данных об аллели, чтобы не вносить путаницу в программу, так как она крайне чувствительна, при наличии референсного сорта, например Алиготе, считалось, что аллель есть и она такая же как и у исходного материала.

2.5 Использование мультиплексов в изучении аборигенных сортов винограда, сохраненных в Анапской зональной опытной станции СКЗНИИСВиВ

Для более удобного и быстрого изучения аборигенных сортов и дикорастущего винограда маркеры были собраны в 6 мультиплексов.

При использовании мультиплекса праймерные пары были подобраны так, чтобы не было перекрытия или наложения пиков. Некоторые праймеры близки по количеству амплифицируемых пар, но легко различимы по цвету пика, отображаемому программой GeneMapper.

Для наиболее эффективного амплифицирования были выбраны следующие параметры ПЦР-реакции для Peqlab-Kit:

1. 3 минуты при 95 °С – начальная денатурация, далее следующие 30 циклов:
2. 15 секунд денатурация при 95 °С;
3. 30 секунд отжиг праймеров при 60 °С;
4. 30 секунд синтез при 72 °С;
5. Последний цикл синтеза 7 минут при 72 °С.

ПЦР смесь включала: 2 × PCR-Master-Mix Y с 1.25 ед. Taq-DNA-Polymerase 25 мкл, 0.4 mM ДНТП, 40 mM Tris-HCl (pH 8.55 при 25 °С), 32 mM (NH₄)₂SO₄, 0.02 % 20 и 4 mM MgCl₂.

Аmplификация проводилась в амплификаторе GenAmp PCR System 9700.

Определение размеров фрагментов ДНК и анализ ПЦР смесей проводили на секвенаторе ABI PRISM 3130 xl sequencer (Applied Biosystems), используя LIZ в качестве маркера молекулярной массы. Размер фрагментов определялся при помощи программы GeneMapper 4.0. В качестве референсных сортов использовались Каберне фран и Мускат белый.

2.6 Статистическая обработка данных

Анализ частот встречаемости аллелей для обоих выборок генотипов проводили в программе-макросе GenAlEx 6.3 для Excel. Из всех возможных методов кластеризации нами был использован метод «Одиночной связи» (от англ. single linkage), известный также как метод «ближайшего соседа», выполненный в программе DARwin 6, специально созданной для анализа молекулярно-генетических данных по микросателлитным аллелям. После кластеризации, для упрощения процесса, полученная картинка интерпретировалась визуально.

3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 Анализ генетического разнообразия сортов и клонов винограда с использованием микросателлитных маркеров

Применение микросателлитных маркеров даёт возможность оценивать генетические изменения в популяциях исследуемых сортов и клонов винограда. Их идентификация выполнялась на основании данных об аллельном состоянии использованных в работе молекулярных маркеров у каждого отдельно взятого генотипа.

Данные о состояниях аллелей генотипов записывались в таблицы «Excel» и анализировались при помощи программы-макроса GenAlEx 6.3.

Таблица 1 – Полиморфизм микросателлитных маркеров, использованных в работе

Маркер	Количество выявленных аллелей	Ho	He
VrZag62	15	0.417	0.847
VrZag79	19	0.333	0.901
VVMD5	25	0.462	0.934
VVMD7	27	0.412	0.923
VVMD27	16	0.500	0.867
VVS2	20	0.530	0.923
Примечания: 1. Ho – наблюдаемая гетерозиготность 2. He – ожидаемая гетерозиготность			

Из приведенной выше таблицы 1 видно, что микросателлитные маркеры показали различный уровень полиморфизма: от 15 до 27 аллелей на локус. Наименьший уровень полиморфизма показали маркеры VrZag62 и VVMD27 с количеством аллелей 15 и 16 соответственно. Средний уровень продемонстрировал маркер VVS2 с количеством 20 аллелей. Высокий

уровень полиморфизма показали микросателлитные локусы VVMD5 и VVMD7 с 25 и 27 аллелями, соответственно.

Ожидаемая гетерозиготность варьировала в пределах от 0,847 (VrZag62) до 0,934 (VVMD5).

Наблюдаемая гетерозиготность изменялась в диапазоне от 0,333 (VrZag79) до 0,530 (VVS2). Внутри группы фактическая гетерозиготность не превышает ожидаемую, что свидетельствует о низком уровне полиморфизма, который является вполне нормальным при изучении клонов винограда.

На основании данных об аллелях у исследованных сортов для понимания состава изученного генетического пула, был проведен анализ по оценке частот встречаемости аллелей среди всех сортов, также при помощи программы-макроса GenAlEx 6.3.

3.1.1 Анализ частот встречаемости аллелей в популяции КЛОНОВ

При анализе локуса VrZag62 было обнаружено всего 15 аллелей, из которых наиболее часто встречаются 190, 188 и 194 п.н., соответственно 19 %, 22 % и 22 %.

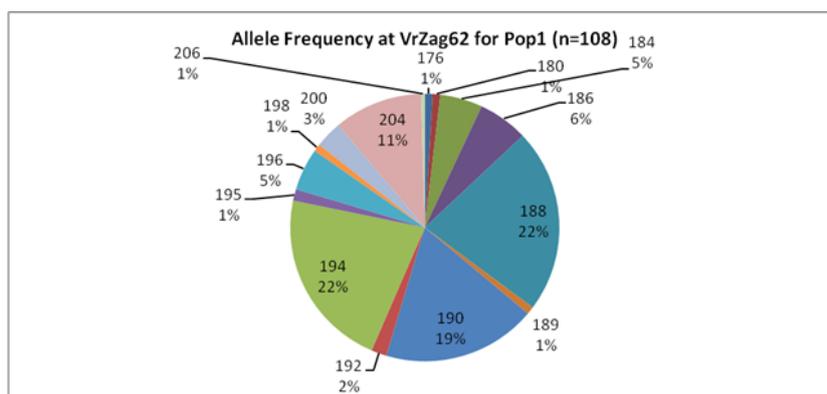


Рисунок 1 – Анализ частот встречаемости в популяции аллелей для локуса VrZag62*

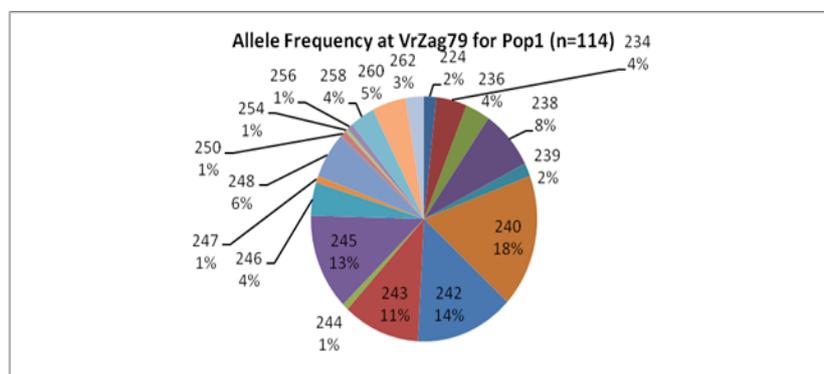


Рисунок 2 – Анализ частот встречаемости в популяции аллелей для локуса VrZag79

* Здесь и далее на картинках указаны найденные в процессе работы аллели (цифры указывают количество пар нуклеотидов), под ними в процентах указана частота их встречаемости среди всех исследованных сортов.

Для локуса VrZag79 обнаружено 19 состояний аллелей, из них наиболее распространены с длиной 243, 245, 242 и 240 п.н., имеющие частоту встречаемости 11 %, 13 %, 14 % и 18 %.

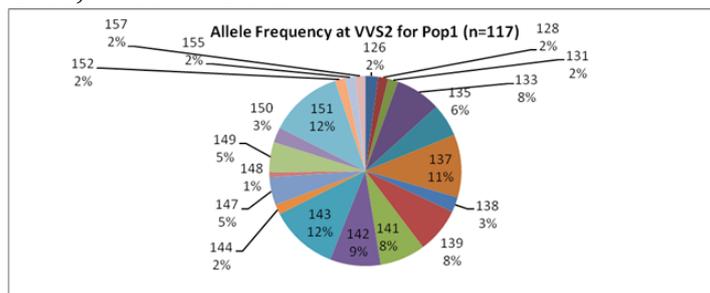


Рисунок 3 – Анализ частот встречаемости в популяции аллелей для локуса VVS2

Данная диаграмма демонстрирует распространение аллелей VVS2. Всего обнаружено 20 состояний на локус. Наиболее распространены 137, 143 и 151 п.н., соответственно 11 %, 12 % и 12 %.

Далее представлены результаты анализа частот встречаемости аллелей, амплифицированных при помощи праймеров локусов VVMD5, VVMD7 и VVMD27 (рисунок 4–6).

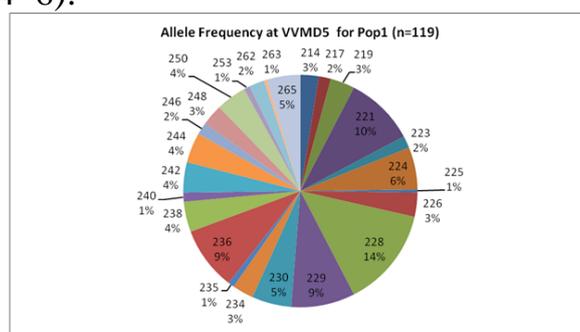


Рисунок 4 – Анализ частот встречаемости в популяции аллелей для локуса VVMD5

Данная диаграмма демонстрирует частоту встречаемости аллелей локуса VVMD5. Всего выявлено 25 состояний на локус. Здесь наиболее распространены аллели с длиной 236, 221 и 228 п.н., имеющие частоты встречаемости 9 %, 10 % и 14 %, соответственно.

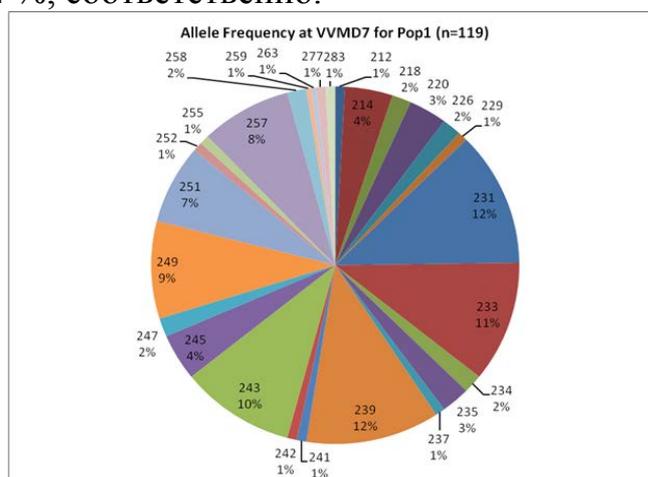


Рисунок 5 – Анализ частот встречаемости в популяции аллелей для локуса VVMD7

Анализ частот встречаемости аллелей для локуса VVMD7 выявил 27 аллелей, наиболее часто встречающиеся с длиной 233, 238 и 231 п.н., что составляет 11 %, 12 % и 12 %, соответственно.

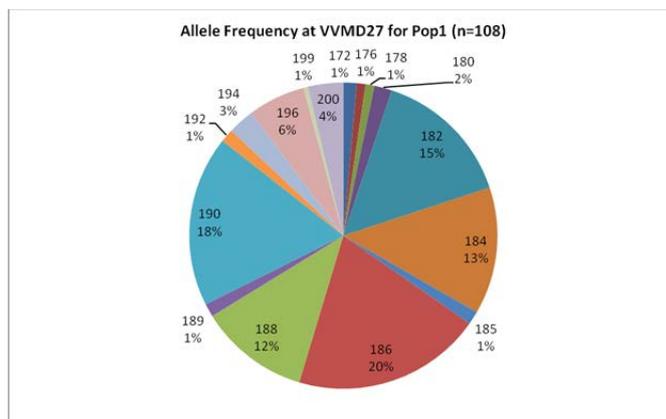


Рисунок 6 – Анализ частот встречаемости в популяции аллелей для локуса VVMD27

Для данного локуса всего было обнаружено 16 аллелей. Частота встречаемости, среди исследуемых сортов и клонов винограда, для локуса VVMD27 распределилась следующим образом: наиболее часто встречаются аллели с длиной в 184 (13 %), 182 (15 %) и 190 (18 %) п.н.

3.1.2 Частота встречаемости всех аллелей изученных SSR-локусов идентифицированных в популяции клонов

Далее представлена общая гистограмма для всех аллелей (рисунок 7).

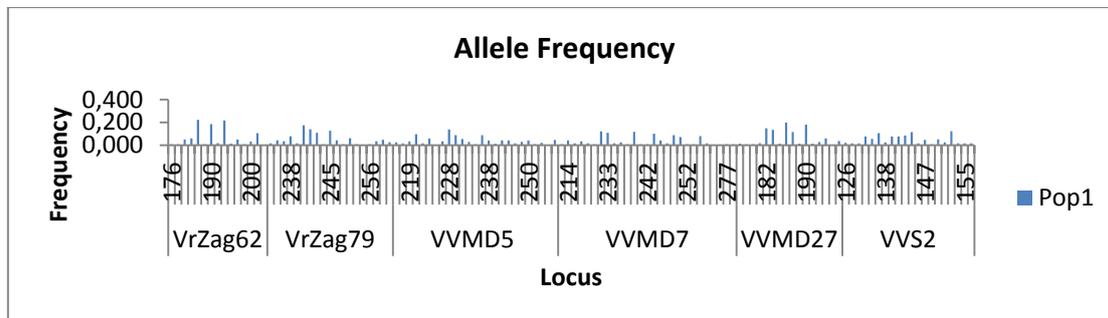


Рисунок 7 – Общая гистограмма по всем аллелям

Из представленной гистограммы мы можем видеть, что всего было обнаружено 122 состояния для 6 локусов в 119 образцах. При этом для локуса VrZag62 было обнаружено 15 аллелей, для локуса VrZag79 – 19, для VVS2 – 20, для VVMD5 – 25, для VVMD7 – 27, для VVMD27 – 16. Таким образом, можно заключить, что наибольший полиморфизм показали локусы VVMD7, VVMD5 и VVS2.

3.1.3 Кластеризация отдельных групп сортов и клонов при помощи программы DARwin 6

Степень генетического родства оценивалась методом «Одиночной связи» (Single linkage), с использованием программы DARwin 6. Сорта и клоны были объединены в общую группу и кластеризованы. По итогам сделаны выводы, приведенные далее после древа (рисунок 8).

Дендрограмма демонстрирует то, как сформировались кластеры различных сортов. Следует выделить два больших кластера и 14 меньших подкластеров. 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 сильно отличается от всех остальных клон Рислинг 492. Клоны Рислинг 130, Рислинг 247-5, Рислинг 314111, Рислинг 314111 1, Рислинг 3991, Рислинг 7111891, Рислинг 7121431, Рислинг 7151077п, Рислинг 830, Рислинг 964, Рислинг Алькадар 34, Рислинг Алькадар 43а и Рислинг клон имеют один генотип. К ним можно отнести клоны Рислинг 245-5 и Рислинг 3142092. Клоны Рислинг 143143111, Рислинг 31411111, Рислинг 314991, Рислинг Алькадар 34б и Рислинг Алькадар 34г формируют отдельную ветвь, что указывает на их схожесть 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 по изученным маркерам. Среди генотипов клона сорта Супер экстра отличий не найдено. 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 друг от друга не отличаются. Различия показали клоны Солярис 70-21 и Солярис 70-16 по локусам VrZag62 и VVMD7. Клоны Богатыновский 6 куст и Богатыновский 9 куст не отличаются по ДНК-профилям, отличия показал Богатыновский 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 друг от друга не отличаются. Отличия найдены у клона Антоний Великий в локусе VVS2. У клонов сорта Преображение отличия найдены в локусах VVMD5 и VVMD7. Клоны Первозванный 4 куст и Первозванный 6 куст не отличаются, 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. Генотипы клонов сорта Йоханитер не отличаются по изученным маркерам. Клоны Аркадия розовая 2-5, Аркадия розовая 2-6 и Аркадия розовая 4 куст не отличимы. 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 Анята, Анята 3 кл 5 ряд, Анята 5-5 не отличаются по изученным маркерам. Клоны Анята Ф и Анята 5-7 показали отличие по локусам VrZag62 и VrZag79. Клоны Ливия, Ливия 14-5 и Ливия 14-6, Ливия Ф 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 5a по локусам VrZag62, VrZag79 и VVMD5.

Таким образом, дендрограмма объединила 119 образцов на основе данных о 6 микросателлитных маркерах. В первый кластер вошли сорта Каберне Совиньон, Пино черный, Совиньон блан, Мерло и Пино белый. Эти генотипы принадлежат к западноевропейской группе сортов, среди родителей которых имеются общие предки, такие как Каберне фран, Совиньон блан, Траминер и Пино менье. Сорта Долгожданный, Ливия, Анюта, Гелиос и Аркадия розовая находятся в разных кластерах, но близки по родству, так как являются гибридами, полученными в результате селекции при скрещивании таких сортов как Талисман, Кишмиш лучистый и Аркадия, то есть имеют общих родителей. При анализе родословной генотипов Йоханитер, Монарх, Рошфор и Каберне Кор蒂斯 было выявлено, что у всех у них есть общий предок – Шасла и Шасла северная. В эту же группу были внесены и клоны сорта Вердо чёрный, так как он имеет похожие локусные состояния по изученным маркерам. Такие клоны как Преображение, Антоний Великий, Гурман ранний, Богатыновский, Виктор, Супер Экстра и Низина, также являются гибридами, полученными в результате скрещивания сортов Кишмиш лучистый и Аркадия, и поэтому находятся рядом. Среди них были такие генотипы как Каберне карбон и Солярис. Каберне карбон по некоторым молекулярным маркерам похож на Гурман ранний, также они оба не имеют данных по аллели VVMD27. Клоны сорта Солярис выделены в отдельную группу, хотя также и похожи по аллельным состояниям на другие генотипы. Отдельным сортом выделен Юбилей Новочеркаска, так как является сложным межвидовым гибридом неизвестного происхождения. Клоны сорта Рислинг и Алиготе объединены в отдельный кластер, так как среди родителей, предположительно, имеют общего предка – Gouais Blanc, которого нет у всех других сортов.

Анализируя все вышеперечисленное, можно сделать заключение не только об описанных выше отличиях среди клонов, но и об эффективности выбранных методов изучения, так как все генотипы были сгруппированы по сортовым кластерам. По результатам анализа программой DARWin 6 можно сделать вывод, что некоторые образцы, несмотря на наличие сильного сходства, отличаются генетическими профилями. Это же утверждение подтверждено и агробиологическими и ампелографическими исследованиями, проведенными нами и аспирантами Звягиным А. С. и Подваленко П. П., а также при изучении на Государственном сортоиспытании (приложения В – Щ, С и D диссертации).

3.1.4 Анализ генетического разнообразия аборигенных сортов винограда с использованием микросателлитных маркеров

Для исследования генетического разнообразия аборигенных сортов были использованы 25 микросателлитных маркеров. В ходе использования микросателлитных маркеров было выявлено, что они обладают разным уровнем полиморфизма и гетерозиготности.

Таблица 2 – Полиморфизм локусов, выявленный с помощью микросателлитных маркеров

Маркер	Количество выявленных аллелей	Ho	He
VrZAG47	14	0.832	0.865
VVS2	16	0.868	0.832
VVMD7	14	0.676	0.773
VVMD5	15	0.800	0.855
VrZag62	13	0.800	0.858
VrZag79	13	0.854	0.809
VVMD28	20	0.874	0.842
VVMD32	15	0.804	0.866
VVMD25	10	0.788	0.785
VVIP60	13	0.642	0.767
VVIB01	12	0.581	0.679
VrZag83	6	0.980	0.694
VVMD27	16	0.817	0.879
VVMD21	10	0.575	0.807
VMC1B11	14	0.755	0.819
VVIQ52	9	0.684	0.730
VrZag67	19	0.854	0.881
VVIV37	18	0.717	0.894
VVIN54	14	0.707	0.755
VVMD24	8	0.663	0.685
VVIV67	29	0.744	0.898
VVIN73	6	0.450	0.443
VMC4f3.1	20	0.806	0.900
VVIN16	8	0.567	0.704
VVIP31	17	0.840	0.883
Примечания: 1. Ho – наблюдаемая гетерозиготность 2. He – ожидаемая гетерозиготность			

Согласно таблице 2, исследованные локусы показали различный уровень полиморфизма. Наблюдалось от 6 до 29 аллелей на локус. В представленной группе маркеров наиболее низкий полиморфизм показали VrZag83 и VVIN73. Средний уровень полиморфизма был у маркеров VVMD24, VVIN16, VVIQ52, VVMD25, VVMD21, VVIB01, VrZag62, VrZag79, VVIP60, VrZAG47, VVMD7, VMC1B11 и VVIN54. Наибольшее аллельное разнообразие показали VVMD5, VVMD32, VVS2, VVMD27, VVIP31, VVIV37, VrZag67, VVMD28, VMC4f3.1 и VVIV67.

Ожидаемая гетерозиготность варьировала от 0,443 (VVIN73) до 0,9 (VMC4f3.1).

Наблюдаемая гетерозиготность была в пределах от 0,45 (VVIN73) до 0,98 (VrZag83). Для локусов VrZag79, VrZag83, VVIN73, VVMD25,

VVMD28 и VVS2 фактическая гетерозиготность превышает ожидаемую, что указывает на высокую полиморфность данных микросателлитов внутри изученной группы генотипов.

По результатам фрагментарного анализа в секвенаторе ABI 3130x1, все сорта, кроме Гок ала и Кок ала обладали уникальным набором аллелей, позволяющим идентифицировать их как уникальные генотипы. Для подтверждения, они были сравнены с Международным банком данных, в результате чего каждый генотип был определён как чистосортный.

Пики, полученные в ходе работы генетического анализатора, были исследованы в программе GeneMapper 4.0. Полученные данные были занесены в таблицы «Excel» для создания базы молекулярно-генетических данных паспортизации коллекции АЗОС СКЗНИИСиВ и дикорастущего винограда Краснодарского края и Республики Адыгея и проанализированы с помощью программы GenAIEх 6.3.

На рисунках 9–10 представлено аллельное разнообразие для локусов VrZag62 и VrZag79.

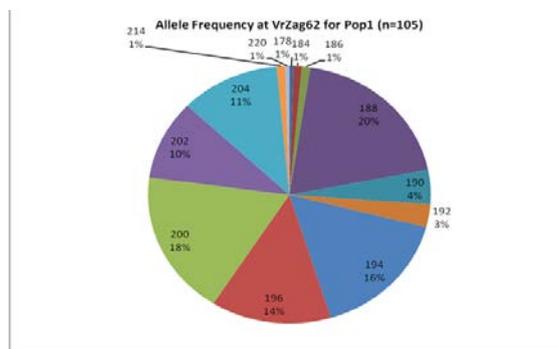


Рисунок 9 – Анализ частот встречаемости в популяции аллелей для локуса VrZag62

Рисунок 9 демонстрирует, что для данного локуса всего было обнаружено 13 аллельных состояний. Частота встречаемости, среди исследуемых сортов и клонов винограда, для маркера VrZag62 распределилась следующим образом: наиболее часто встречаются аллели с длиной в 194 (16 %), 200 (18 %) и 188 (20 %) п.н.

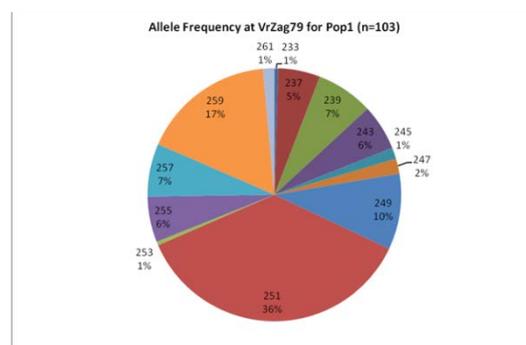


Рисунок 10 – Анализ частот встречаемости в популяции аллелей для локуса VrZag79

Из представленной гистограммы видно, что частота встречаемости аллелей локуса VrZag79 среди исследуемых сортов и клонов винограда распределилась следующим образом: наиболее часто встречаются аллели с длиной в 249 (10 %), 259 (17 %) и 251 (36 %) п.н. Всего для данного локуса было обнаружено 13 аллельных состояний.

На рисунке 11 представлено разнообразие аллелей локуса VVS2.

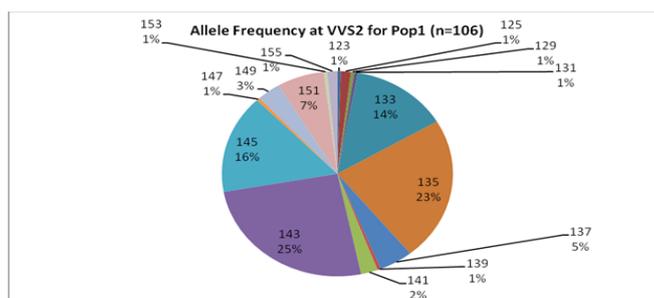


Рисунок 11 – Анализ частот встречаемости в популяции аллелей для локуса VVS2

Для локуса VVS2 всего было обнаружено 16 аллельных состояний. Частота встречаемости аллелей среди исследуемых сортов и клонов винограда распределилась следующим образом: наиболее часто встречаются аллели с длиной в 145 (16 %), 135 (23 %) и 143 (25 %) п.н.

На рисунках 12–14 представлено разнообразие обнаруженных аллелей для маркеров VVMD5, VVMD7 и VVMD27.

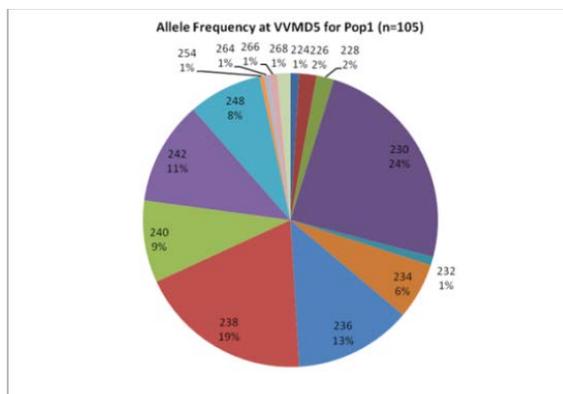


Рисунок 12 – Анализ частот встречаемости в популяции аллелей для локуса VVMD5

Представленная диаграмма демонстрирует, что для данного локуса всего было обнаружено 15 аллельных состояний. Частота встречаемости среди исследуемых сортов и клонов винограда для локуса VVMD5 распределилась следующим образом: наиболее часто встречаются аллели с длиной в 236 (13 %), 238 (19 %) и 230 (24 %) п.н.

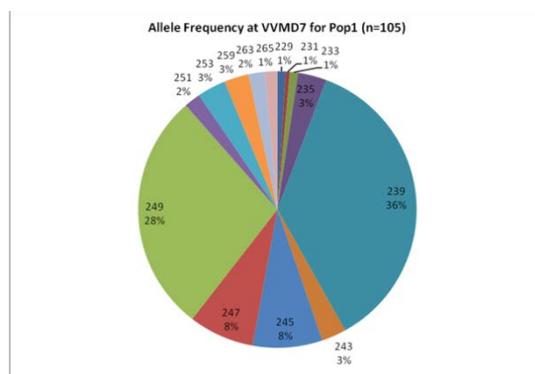


Рисунок 13 – Анализ частот встречаемости в популяции аллелей для локуса VVMD7

Для данного локуса всего было обнаружено 14 состояний аллелей. Частота встречаемости среди исследуемых сортов и клонов винограда для локуса VVMD7 распределилась следующим образом: наиболее часто встречаются аллели с длиной в 247 и 245 (8 %), 249 (19 %) и 239 (24 %) п.н.

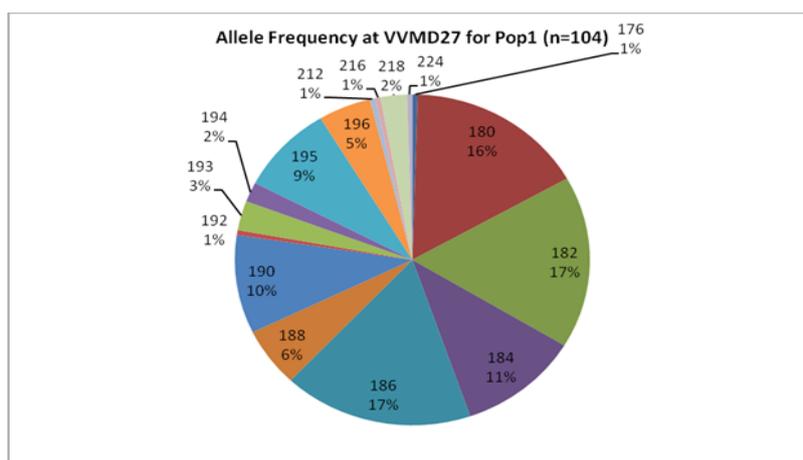


Рисунок 14 – Анализ частот встречаемости в популяции аллелей для локуса VVMD27

Из рисунка 14 видно, что для данного локуса всего было обнаружено 16 аллельных состояний. Частота встречаемости среди исследуемых сортов и клонов винограда для локуса VVMD27 распределилась следующим образом: наиболее часто встречаются аллели с длиной в 180 (16 %), 182 и 186 (17 %) п.н.

3.1.5 Частота встречаемости всех идентифицированных аллелей изученных SSR-локусов среди аборигенных сортов и дикорастущего винограда

На рисунке 15 представлена гистограмма по всем изученным 25 аллелям.

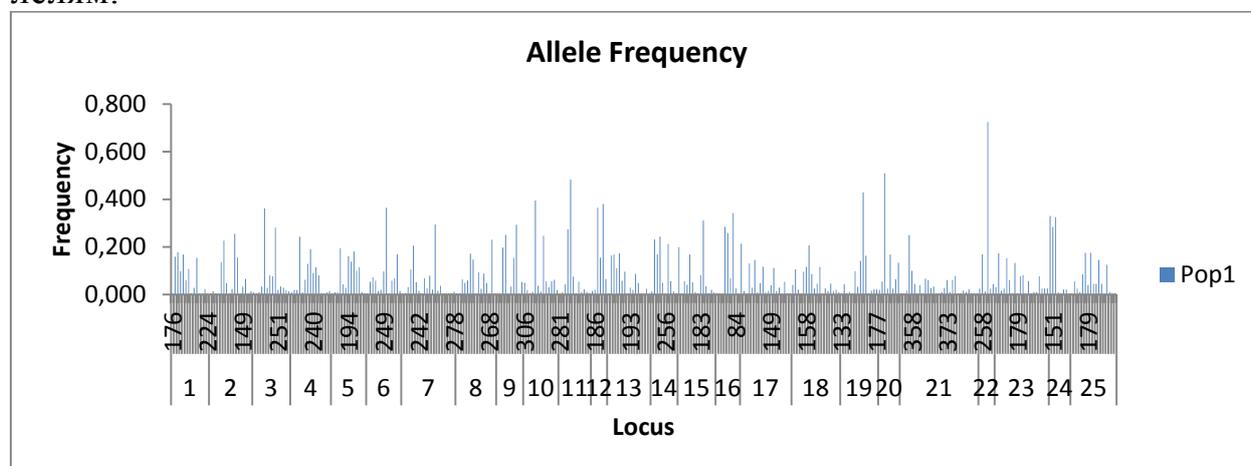
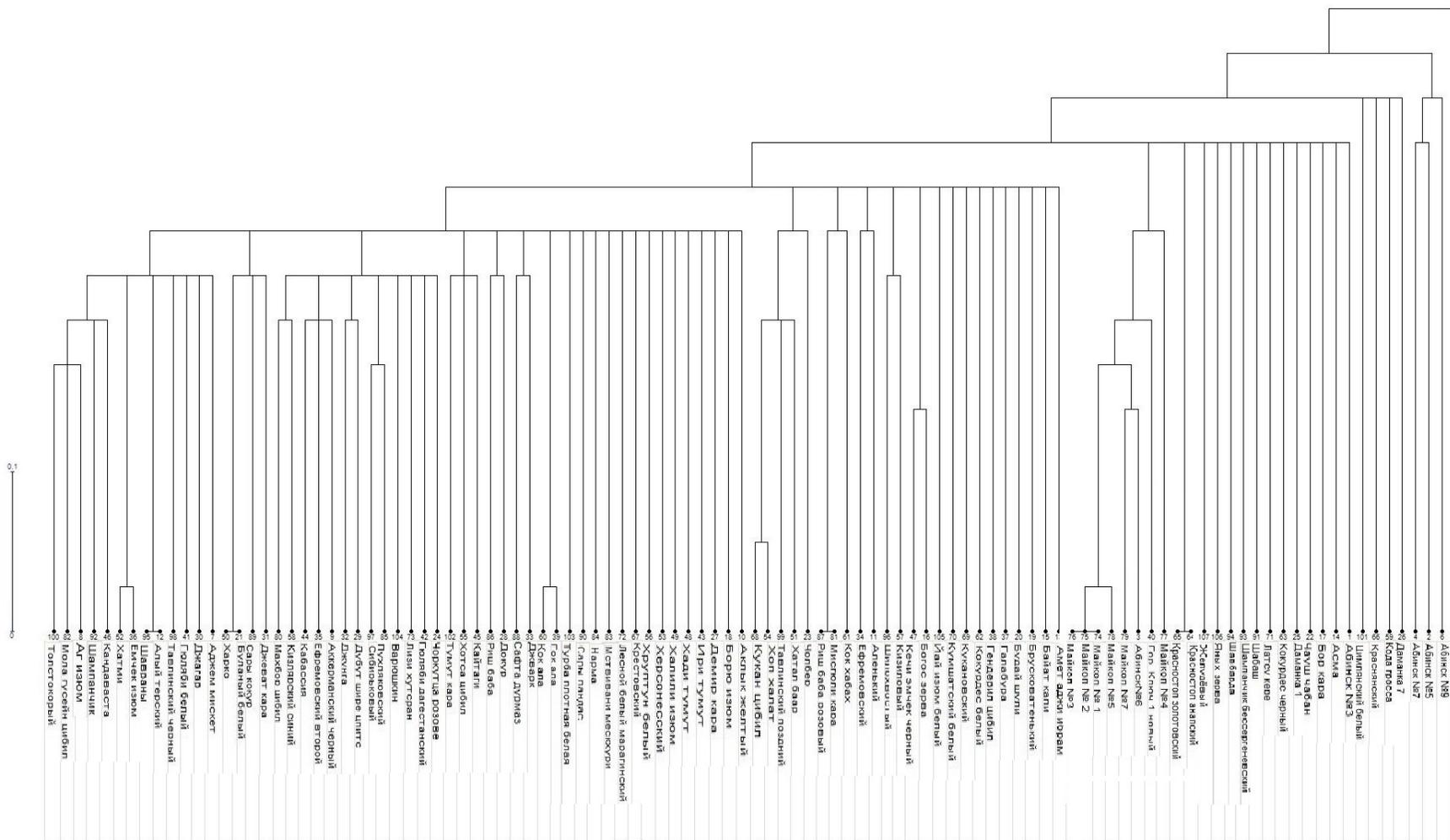


Рисунок 15 – Общая гистограмма по всем аллелям для аборигенных сортов

На гистограмме (рисунок 15) указана частота встречаемости всех аллелей вместе. Она показывает, что всего было обнаружено 349 состояний для 25 локусов в 107 образцах. При это выявлено, что для локуса VrZag47 (1) обнаружено 14 аллельных состояний, для локуса VVS2 (2) – 16, для VVMD7 (3) – 14, для VVMD5 (4) – 15, для VrZag62 (5) – 13, для VrZag79 (6) – 13, для VVMD28 (7) – 20, для VVMD32 (8) – 15, для VVMD25 (9) – 10, для VVIP60 (10) – 13, для VVIB01 (11) – 12, для VrZag83 (12) – 6, для VVMD27 (13) – 16, для VVMD21 (14) – 10, для VMC1B11 (15) – 14, для VVIQ52 (16) – 9, для VrZag67 (17) – 19, для VVIV37 (18) – 18, для VVIN54 (19) – 14, для VVMD24 (20) – 8, для VVIV67 (21) – 29, для VVIN73 (22) – 6, для VMC4f3.1 (23) – 20, для VVIN16 (24) – 8, для VVIP31 (25) – 17.

3.1.6 Кластеризация аборигенных сортов винограда при помощи программы DARwin 6

Далее представлен рисунок 16, демонстрирующий результаты кластеризации аборигенных сортов и дикорастущего винограда.



Дикорастущие лозы Абинск № 3, Абинск № 5 и Абинск № 7, Абинск № 8 и Абинск № 9 произрастают в лесном массиве на берегу реки Кубань у поселка Нечаевский Абинского района. Эти лозы являются фенотипически схожими и напоминают по форме, рассеченности, опушению листовых пластинок и наличию листовых галлов сорт Кобера 5ББ и представляют собой, вероятнее всего, филлоксероустойчивые подвои. Лозы Абинск № 6, Гор. Ключ 1 новый и майкопские № 1–7, в общей кластерограмме образовали иерархические подкластеры генотипов в качестве центра дикорастущих лоз *Vitis silvestris* Gmel., что подтверждается соответствующими фотоиллюстрациями типичных листовых пластинок (приложение А диссертации, рисунки А1–А8). Рядом расположенный аборигенный донской черно-ягодный сорт Красностоп золотовский и его высокопродуктивный клон Красностоп анапский – свидетельство не только их генетической близкородственности, но и феногенетической близости с представителями *Vitis silvestris*. К этому подвиду мы относим также рядом расположенные родственные генотипы Даманка 7, Кода гросса, Краснянский и Цимлянский белый, причем последние два сорта являются донскими аборигенами. Субкластеры близкородственных сортов Богос зерва и Кечи эмчек черный, Кизилковый и Шилохвостый, Аленький и Ефремовский, Кок хабах и Мисгюли кара, Риш баба розовый, Хоп халат и Кукан цибил с Хатал баар и Тавлинским поздним с Чолбером объединены вместе как генотипы северокавказского происхождения, которые содержат в себе не только структурные гены *Vitis silvestris*, но и его эпигены. Сорт Кок ала – синоним дагестанского Гок ала. В кластерограмме взаимосвязанные сорта Джварк и Сафта дурмаз, Докур и Риш баба, Кайтаги, Хотса цибил и Тумут кара, Пухляковский и Сибирьковый, Дубут шире цпитс и Джунга, Аккерманский черный, Ефремовский второй и Кабассия, Кизлярский синий и Махбор цибил, Буланный белый, сорт Харко с Сары кокур и Джеват кара, Алы терский, сорт Шавраны, Эмчек изюм и Хатми, Аг изюм, Мола гусейн цибил и Толстокорый с Кандаваста и Шампанчиком оказались родственными по структуре ДНК.

Результаты кластеризации аборигенных сортов и дикорастущего винограда мы рекомендуем использовать в селекционной работе при подборе скрещиваемых пар. Для получения гибридов с наибольшей изменчивостью следует использовать сорта, вошедшие в разные кластеры и группы географического происхождения. Помимо этого данные, полученные в результате молекулярно-генетического маркирования коллекции, могут быть использованы для изучения генеалогии сортов и при возникновении спорных вопросов. Наши результаты имеют практическое значение, так как выделенные высокопродуктивные клоны Пиногрик и Семьдесятiletие Победы (приложения А и Б диссертации), отличаются от материнских форм улучшенными агробиологическими показателями (приложения С и D диссертации). Эти протоклоны представляют большой интерес для повышения продуктивности и экономической эффективности виноградных насаждений

Краснодарского края, путём внедрения в промышленное виноградарство, фермерские хозяйства и приусадебное садоводство.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью молекулярно-генетического анализа подтверждена обоснованность отбора протоклонов. В процессе работы создана база данных о дикорастущем винограде Краснодарского края и Республики Адыгея и аборигенных сортах, сохраненных на АЗОС СКЗНИИСВиВ.

1. В результате анализа полиморфизма 6 микросателлитных маркеров в представленной выборке сортов и клонов винограда возделываемых на территории Краснодарского края выявлено от 15 до 27 аллелей на локус. Наиболее высоким уровнем изменчивости обладает локус VVMD7, а наиболее низким VrZag62. Всего было обнаружено 122 аллельных состояния по всем микросателлитным маркерам.

2. В изученной выборке клонов ожидаемая гетерозиготность для каждого локуса выше наблюдаемой, что говорит о низком уровне полиморфизма.

3. Молекулярно-генетическим маркированием и кластеризацией изученных генотипов подтверждено отличие сортов Пиногрик и Семидесятилетие Победы от материнских форм и остальных протоклонов.

4. Изучение полиморфизма 25 локусов в 107 образцах аборигенного и дикорастущего винограда выявило 349 состояний. При этом наибольший полиморфизм показал маркер VVIV67 (29 аллелей), а наименьший VrZag83 и VVIN73 (6 аллелей).

5. Для маркеров VrZag79, VrZag83, VVIN73, VVMD25, VVMD28 и VVS2 наблюдаемая гетерозиготность превышает ожидаемую, что указывает на высокую полиморфность данных микросателлитов в изученной группе генотипов.

6. На основании данных SSR-анализа для всех генотипов аборигенных сортов и дикорастущего винограда построены генетические карты, позволяющие идентифицировать их среди других сортов.

7. По данным ДНК-фингерпринтингов и кластеризации, среди изученных генотипов аборигенных сортов Северного Кавказа найдены синонимы: Гок ала и Кок ала, а среди дикорастущего винограда обнаружен *Vitis silvestris* Gmel.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

Для повышения эффективности отбора клонов винограда и испытания их в государственной комиссии РФ рекомендуется:

1. Отобранные клоны (Пиногрик и Семидесятилетие Победы) использовать в практической селекции и внедрять в производство для повышения эффективности и продуктивности насаждений виноградников Краснодарского края.

2. Активно использовать в качестве селекционного материала исследованные аборигенные сорта для раскрытия их потенциала как ценных носителей генов устойчивости к вредителям, болезням и общей адаптивности к условиям Северного Кавказа.

3. Все отобранные протоклоны проанализировать методами ISSR, REMAP и IRAP для расширения познания о структуре строения их ДНК.

4. Дикорастущий виноград Краснодарского края и Республики Адыгея передать на сохранение в коллекцию гермплазмы АЗОС СКНИИСВиВ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ИССЛЕДОВАНИЙ В ЖУРНАЛАХ, РЕКОМЕНДОВАННЫХ ВАК РФ

1. Звягин, А. С. Исследование аборигенных сортов винограда России с использованием микросателлитных маркеров [Электронный ресурс] / А. С. Звягин, **А. В. Милованов**, Л. П. Трошин // Политематический сетевой электронный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Журнал КубГАУ). – Краснодар : КубГАУ, 2013. – № 88(04). – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2013/04/pdf/13.pdf>. – авт. 0.18

2. Трошин, Л. П. Три сибса современного приватного виноградарства России и Украины [Электронный ресурс] / Л. П. Трошин, **А. В. Милованов**, Б. А. Маховицкий // Политематический сетевой электронный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Журнал КубГАУ). – Краснодар : КубГАУ, 2013. – №89(05). – Режим доступа : <http://ej.kubagro.ru/2013/05/pdf/32.pdf>. – авт. 0.37

3. **Милованов, А. В.** Выделение ДНК при помощи reqgold plant dna mini kit [Электронный ресурс] / А. В. Милованов, Л. П. Трошин // Политематический сетевой электронный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Журнал КубГАУ). – Краснодар : КубГАУ, 2013. – № 90(06). – Режим доступа : <http://ej.kubagro.ru/2013/06/pdf/11.pdf>. – авт. 0.27

4. Трошин, Л. П. Идентификация и генотипирование зародышевой плазмы трех столовых сортов винограда [Электронный ресурс] / Л. П. Трошин, **А. В. Милованов**, Б. А. Маховицкий // Политематический сетевой электронный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Журнал КубГАУ). – Краснодар : КубГАУ, 2013. – № 90(06). – Режим доступа : <http://ej.kubagro.ru/2013/06/pdf/49.pdf>. – авт. 0.35

5. **Милованов, А. В.** Генотипирование сортов винограда по молекулярным маркерам [Электронный ресурс] / А. В. Милованов, Л. П. Трошин // По-

литематический сетевой электронный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Журнал КубГАУ). – Краснодар: КубГАУ, 2014. – №96(02). – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2014/02/pdf/05.pdf>. – авт. 0.36

6. **Милованов, А. В.** Генотипирование продуктивных протоклонов трех технических сортов винограда с использованием микросателлитных маркеров [Электронный ресурс] / А. В. Милованов, А. С. Звягин, Л. П. Трошин // Политематический сетевой электронный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Журнал КубГАУ). – Краснодар : КубГАУ, 2014. – №98(04). – Режим доступа : <http://ej.kubagro.ru/2014/04/pdf/77.pdf>. – авт. 0.27

7. **Милованов, А. В.** Генотипирование новых перспективных технических протоклонов винограда с использованием микросателлитных маркеров [Электронный ресурс] / А. В. Милованов, А. С. Звягин, Л. П. Трошин // Политематический сетевой электронный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Журнал КубГАУ). – Краснодар : КубГАУ, 2014. – №98(04). – Режим доступа : <http://ej.kubagro.ru/2014/04/pdf/10.pdf>. – авт. 0.35

8. **Милованов, А. В.** Выделение ДНК методом NUCLEOSPINPLANT 2 COREKIT. Комментарии [Электронный ресурс] / А. В. Милованов, Л. П. Трошин // Политематический сетевой электронный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Журнал КубГАУ). – Краснодар: КубГАУ, 2014. – № 101(07). – Режим доступа : <http://ej.kubagro.ru/2014/07/pdf/160.pdf>. – авт. 0.41

9. Troshin, L. Molecular marker screening of new promising wine grape clones [Электронный ресурс] / L. Troshin, **A. Milovanov**, A. Zviagin // VITIS Journal of Grapevine Research. – Geilweilerhof: Julius Kuhn-Institut, 2015. – №54 (Special Issue). – 105–106. – Режим доступа: <http://pub.jki.bund.de/index.php/VITIS/article/view/4988/4778>. – авт. 0.037

ЗАЯВКИ НА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пиногрик / Л. П. Трошин, А. С. Звягин, А. В. Милованов и др. // Заявка на патент № 63160 от 29.11.2013.

2. Семидесятилетие Победы / Л. П. Трошин, А. В. Милованов и др. // Заявка на патент № 6672 от 15.01.2015.

Подписано в печать 26.01.2016. Уч.-изд. л. – 1,0.
Тираж 100. Заказ №

Типография Кубанского государственного аграрного университета.
350044, г. Краснодар, ул. Калинина, 13