

УДК 634.8: 631.52

DOI: 10.30679 / 2219-5335-2018-3-51-49-58

**СОЗДАНИЕ БАЗЫ ДАННЫХ
И ДНК-ПАСПОРТИЗАЦИЯ СОРТОВ
АНАПСКОЙ АМПЕЛОГРАФИЧЕСКОЙ
КОЛЛЕКЦИИ**

Лукьянов Алексей Александрович
канд. с.-х. наук,
ст. научный сотрудник
директор АЗОСВиВ

Большаков Владимир Андреевич
мл. научный сотрудник
лаборатории виноградарства
и виноделия

*Анапская зональная опытная
станция виноградарства и виноделия –
филиал Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Северо-Кавказский федеральный
научный центр садоводства,
виноградарства, виноделия»,
Анапа, Россия*

Ильницкая Елена Тарасовна
канд. биол. наук
зав. лабораторией сортоизучения
и селекции винограда

*Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«Северо-Кавказский федеральный
научный центр садоводства,
виноградарства, виноделия»,
Краснодар, Россия*

На современном этапе изучения генетических ресурсов винограда ДНК-профили дополняют традиционные ампелографические описания, агробиологические и хозяйственные характеристики сортов и служат основой для достоверной идентификации генотипов, поэтому для решения приоритетных задач селекции винограда необходима мобилизация и сохранение генетических ресурсов, с созданием электронной базы

UDC 634.8: 631.52

DOI: 10.30679 / 2219-5335-2018-3-51-49-58

**CREATION OF DATABASE
AND DNA-SERTIFICATION
OF VARIETIES OF ANAPIC
AMPELOGRAPHIC COLLECTION**

Lukyanov Alexey Aleksandrovich
Cand. Agr. Sci.
Senior Research Associate
Chief of AZESVW

Bolshakov Vladimir Andreyevich
Junior Research Associate
of Laboratory of Viticulture
and Wine-making

*Anapa Zonal Experimental Station
of Viticulture and Wine-making –
branch of Federal State
Budgetary Scientific Institution
«North-Caucasus Federal
Scientific Center of Horticulture,
Viticulture, Winemaking»,
Anapa, Russia*

Ilitskaya Elena Tarasovna
Cand. Biol. Sci.
Head of Laboratory of Cultivar's study
and Breeding of grapes

*Federal State Budget
Scientific Institution
«North-Caucasian Federal
Scientific Center of Horticulture,
Viticulture, Winemaking»,
Krasnodar, Russia*

At the present stage of studying the genetic grape resources, the DNA profiles add the traditional ampelographic descriptions, agrobiological and economic characteristics of varieties and serve as a basis for reliable identification of genotypes, therefore, in order to solve the priority tasks of vine breeding, it is necessary to mobilize and conserve the genetic resources, with the creation

данных. В сохранении и использовании генофонда винограда большую роль играют ампелографические коллекции, где постоянно проводится работа по интродукции сортов, изучению их агробиологических, фенологических и хозяйственных признаков, выделению из их числа перспективных, а также отбор доноров для использования в селекционной работе в целях получения новых конкурентоспособных сортов.

На Анапской ампелографической коллекции с участием лаборатории селекции, сортоизучения и сохранения генофонда винограда СКФНЦСВВ проводится ДНК-паспортизация сортов винограда, создана база данных коллекции. В число возможностей программной платформы входит поиск образцов в базе по ряду параметров, отображение общего списка образцов и отображение подробной информации по каждому сорту в отдельности. Реализованы сервисы обобщения и анализа данных агробиологических и фенологических наблюдений, анализа сохранности глазков после перезимовки растений с привязкой к кустоместам в ампелоколлекции. Проведена ДНК-паспортизация сортов селекции винограда АЗОСВиВ – филиала ФГБНУ СКФНЦСВВ (10 сортообразцов), сортов ФГБНУ СКФНЦСВВ (9 сортообразцов) и известных европейских сортов (4 сортообразца), которая будет интегрирована в единую базу данных. Полученные ДНК-паспорта сортов на практике могут эффективно применяться для определения чистосортности посадочного материала и насаждений винограда, уточнения родительских форм образца, а также в спорных вопросах авторства сорта.

Ключевые слова: БАЗА ДАННЫХ, ГЕНОФОНД, ВИНОГРАД, СОРТ, ДНК-ПАСПОРТИЗАЦИЯ, АМПЕЛОГРАФИЧЕСКАЯ КОЛЛЕКЦИЯ

of an electronic database. Ampelographic collections are very important in the preservation and use of the gene grape pool, in these collections the work is constantly carried out to introduce varieties, to study of their agrobiological, phenological and economic features, to identify the promising ones from them, and to select the donors for use in breeding work in order to obtain the new competitive varieties. In the Anapa ampelographic collection with the participation of the laboratory of variety study and preservation of the grape gene pool of NCFSCHVW the DNA-certification of grape varieties is carried out, a collection database has been created. Among the features of the software platform there is the search for samples in the database for a number of parameters, displaying a common list of samples and displaying the detailed information for each variety separately. Services for calculating and analyzing of agro-biological and phenological observations data, analyzing the safety of buds after wintering of plants according to bushplaces in an ampelocollection have been realized. The DNA certification was carried out for the grape varieties of AZESVW breeding – the branch of the FSBSI NCFSCHVW (10 varieties), the varieties of the FSBSI NCFSCHVW (9 varieties) and 4 well-known European varieties, which will be integrated into a united database. The obtained DNA-passports of varieties in practice can be effectively applied to determine the clean varieties in the planting material and in the grapes orchards, to define the parental forms of the sample, as well as in the disputed questions of the variety authorship.

Key words: DATABASE, GENE POOL, GRAPES, VARIETY, DNA-CERTIFICATION, AMPELOGRAPHIC COLLECTION

Введение. Сохранение генофонда и совершенствование сортимента винограда является одним из определяющих условий устойчивого развития отрасли виноградарства, причем для рентабельного ведения виноградных насаждений необходим научно обоснованный подбор сортов с учетом соответствия их биологических особенностей почвенно-климатическим условиям региона выращивания винограда.

В сохранении и использовании генофонда винограда большую роль играют ампелографические коллекции, где постоянно проводится работа по интродукции сортов, изучению их агробιологических, фенологических и хозяйственных признаков, выделению из их числа перспективных, а также отбор доноров для использования в селекционной работе в целях получения новых конкурентоспособных сортов.

Мобилизация сортовых ресурсов винограда в ампелографической коллекции, как показано учеными многих стран (Eiras-Dias, 2008; Lacombe, 2008; Maghradze et al., 2015), играет важную роль в сохранении и использовании генофонда винограда [1-4].

Это объясняется тем, что существует реальная угроза потери значительного числа сортов в связи с исчезновением во многих регионах мира дикорастущего винограда, уменьшением количества сортов в промышленных насаждениях, реконструкцией старых насаждений и т.д.

Большинство аборигенных и мало распространенных сортов винограда в настоящее время сохранилось только благодаря коллекциям [4-6]. Кроме того, стремительное развитие молекулярной биологии в 80-90-х годах прошлого столетия и изобретение ПЦР-технологии открыли новые возможности в вопросах изучения сортов и перевели на другой уровень процесс идентификации генотипов.

На современном этапе изучения генетических ресурсов винограда ДНК-профили дополняют традиционные ампелографические описания, аг-

робиологические и хозяйственные характеристики и служат основой для достоверной идентификации генотипов, поэтому для решения приоритетных задач селекции винограда просто необходима мобилизация и сохранение генетических ресурсов, с созданием электронной базы данных.

Ценность и важность создания электронных баз данных генетических ресурсов давно и в полной мере понята международным научным сообществом. Так, в Международном договоре о растительных генетических ресурсах для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства (статья 17) договариваются о создании Глобальной информационной системы для облегчения обмена информацией по научным, техническим и экологическим вопросам, связанным с растительными генетическими ресурсами для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства (<http://docs.cntd.ru/document/901947561>).

Довольно подробно работа по созданию информационных банков по генетическим ресурсам (проект Genesys, банк данных генетических ресурсов растений GRIN-Global, библиографическая база данных винограда VITIS-VEA, европейская база винограда – The European Vitis Database) описана учёными Всероссийского научно-исследовательского института виноградарства и виноделия в публикации «Информационные системы генетических ресурсов винограда» [7].

В настоящее время в России на портале коллекций растений зарегистрированы 4 крупные ампелографические коллекции (Анапская ампелографическая коллекция, ампелографическая коллекция «Магарач», Донская ампелографическая коллекция имени Я.И. Потапенко, ампелографическая коллекция ДСОСВиО). На всех вышеупомянутых коллекциях ведутся работы по формированию баз данных сортов винограда. Так, Анапская ампелографическая коллекция обладает собственной системой управления базой данных с открытым WEB-интерфейсом (рис. 1).

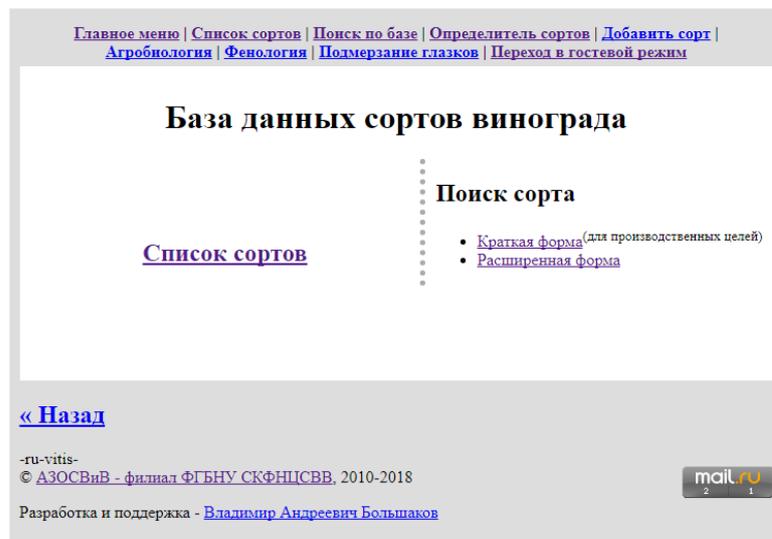


Рис. 1. Главное меню базы данных Анапской ампелографической коллекции

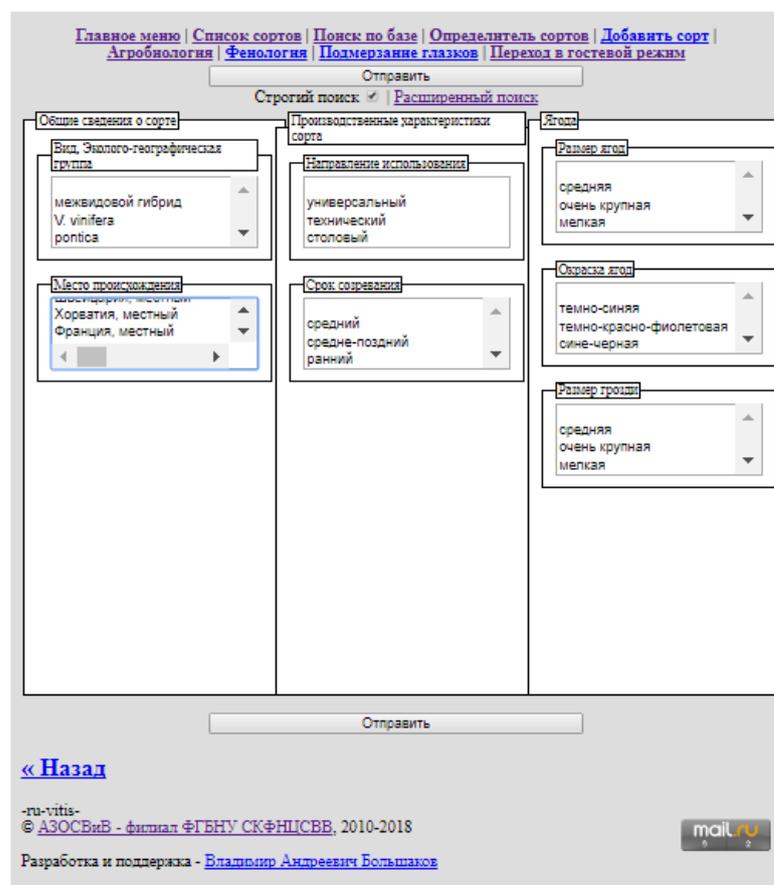


Рис. 2. Аналитические инструменты для поиска сорта в базе

В число возможностей программной платформы входит поиск образцов в базе по ряду параметров (рис. 2), отображение общего списка образцов и отображение подробной информации по каждому сорту в отдельности.

Из прикладных инструментов для научной работы также реализованы сервисы обчёта и анализа данных агробиологических и фенологических наблюдений, анализа сохранности глазков после перезимовки с привязкой к кустоместам в ампелоколлекции.

Для повышения эффективности инструмента, согласно предложениям производителей, планируется внести в проект следующие усовершенствования:

- добавить информацию об особенностях плодоношения различных сортов винограда (зоны формирования плодоносных побегов);
- подключить интерфейс базы данных метеорологических наблюдений по метеостанциям, размещённым вблизи ампелоколлекции;
- разработать методики сравнительной аналитики данных полевых наблюдений на дублирующихся образцах в различных ампелографических коллекциях и наблюдаемых промышленных насаждениях с учётом различных почвенно-климатических данных;
- разработать алгоритмы моделирования ампелоценозов на основании полученной сравнительной аналитики.

Объекты и методы исследований. На Анапской ампелографической коллекции с участием лаборатории селекции, сортоизучения и сохранения генофонда винограда СКФНЦСВВ проводится ДНК-паспортизация сортов, которая будет интегрирована в единую базу данных.

В работу были включены сорта селекции АЗОСВиВ – филиала ФГБНУ СКФНЦСВВ (Бархатный, Достойный, Красностоп АЗОС, Красностоп анапский, Надежда АЗОС, Юлия, Филлоксероустойчивый Джемете, Рислинг АЗОС, Анапский устойчивый, Бригантина), сорта селекции

ФГБНУ СКФНЦСВВ (Алькор, Антарис, Ларни мускатная, Литдар, Рексави, Курчанский, Мицар, Владимир, Гранатовый), а также известные европейские сорта Алиготе, Мускат гамбургский, Мадлен Анжевин, Пино фран, произрастающие на Анапской ампелографической коллекции.

Молекулярно-генетические исследования проведены по общепринятым методикам [8, 9]. ДНК выделяли методом ЦТАБ из молодых листьев апикальной части побегов. Полимеразная цепная реакция проводилась по стандартной методике, с экспериментальной оптимизацией параметров реакции. В работе использованы SSR-маркеры VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 и VrZAG79.

Разделение продуктов реакции проводили методом капиллярного электрофореза на оборудовании Центра коллективного пользования ФГБНУ СКФНЦСВВ. Оценка результатов SSR-анализа проведена с использованием автоматического генетического анализатора ABI Prism 3130 и специального программного обеспечения GeneMapper и PeakScanner.

Обсуждение результатов. Ниже представлены последовательности праймеров ДНК-маркеров, используемых нами при генотипировании сортов винограда:

VVS2	F: CAGCCCGTAAATGTATCCATC R: AAATTCAAAATTCTAATTCAACTGG
VVMD5	F: CTAGAGCTACGCCAATCCAA R: TATACCAAAAATCATATTCCTAAA
VVMD7	F: AGAGTTGCGGAGAACAGGAT R: CGAACCTTCACACGCTTGAT
VVMD27	F: GTACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT R: ACGGGTATAGAGCAAACGGTGT
VrZAG62	F: GGTGGAAATGGGCACCGAACACACAGC R: CCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC
VrZAG79	F: AGATTGTGGAGGAGGGAACAAACCG R: TGCCCCATTTTCAAACCTCCCTTCC

При проведении генотипирования SSR-маркеры были объединены нами с учетом диапазонов размеров амплифицируемых фрагментов по конкретным локусам и температурам отжига праймерных пар: VVS2 + VVMD7; VVMD27 + VVMD5; VrZAG62 + VrZAG79. Объединение ДНК-маркеров в мультиплексные системы позволяет оптимизировать затраты и время, требуемые для микросателлитного анализа. Проведение ПЦР данными маркерными парами позволяет чётко детектировать аллельное состояние каждого анализируемого локуса (рис. 3).

Так, на рис. 3 видно, что по локусу VVMD27 определяется гомозиготное состояние (один красный пик), по локусу VVMD5 – гетерозиготное состояние (два чёрных пика). В качестве контроля (референсного сорта винограда) для коррекции размеров анализируемых продуктов ПЦР в работе использовали ДНК сортов Шардоне и Каберне-Совиньон.

По результатам микросателлитного профилирования изучаемые сорта показали сорт-специфическую комбинацию аллелей (табл.).

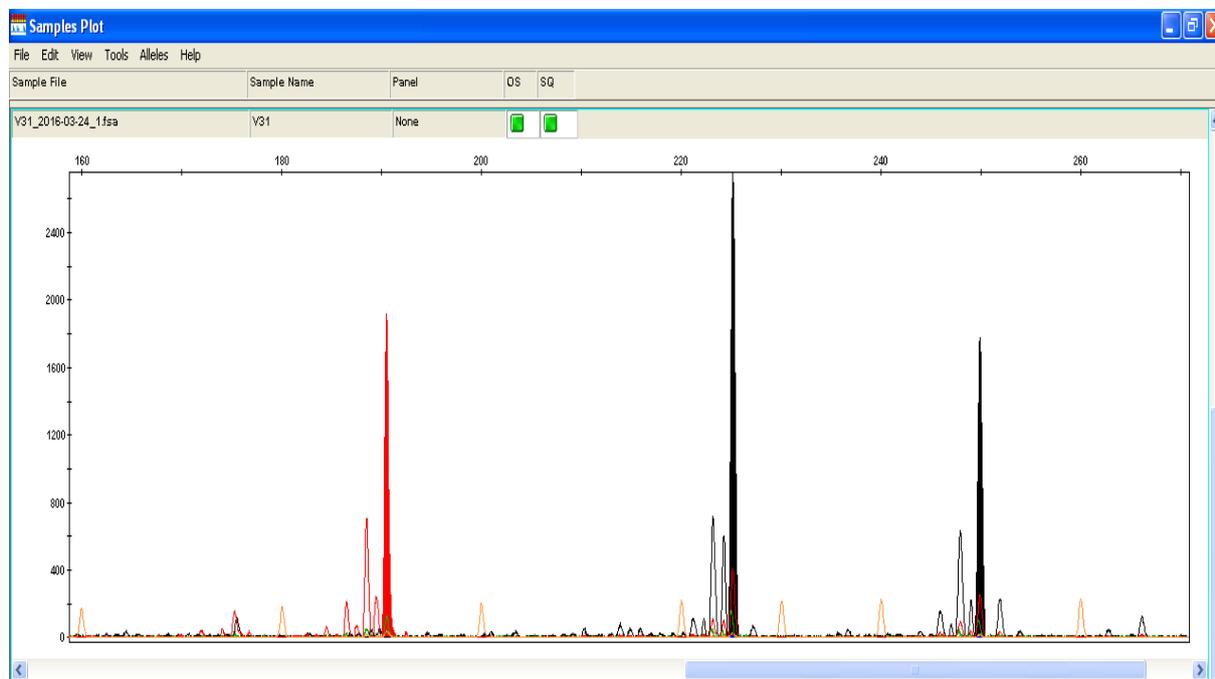


Рис. 3. Результаты фрагментного анализа ПЦР-продуктов ДНК сорта винограда Красностоп анапский с маркерами VVMD27 и VVMD5

ДНК-профили сортов винограда Анапской ампелографической коллекции

Сорт	Аллели SSR-локусов, пары нуклеотидов											
	VVS2		VVMD7		VVMD27		VVMD5		VrZAG62		VrZAG79	
Шардоне (контроль)	137	143	239	243	182	190	236	240	188	196	244	246
Каберне-Совиньон (контроль)	139	151	239	239	176	190	234	242	188	194	248	248
Алькор	139	143	239	249	182	190	238	242	194	194	248	260
Антарис	133	145	239	249	193	195	230	242	188	200	258	262
Бархатный	135	151	247	249	180	184	230	240	186	186	248	256
Достойный	125	133	239	253	182	190	224	242	188	200	244	248
Красностоп АЗОС	125	145	239	253	176	190	224	238	188	200	238	244
Красностоп анапский	133	145	239	265	190	190	224	248	188	196	244	256
Надежда АЗОС	135	135	249	251	186	195	228	242	186	194	252	258
Юлия	135	143	247	247	186	186	230	232	192	200	240	248
Рексави	139	143	239	253	182	190	234	238	196	202	250	262
Филлоксеро-устойчивый Джемете	125	143	239	253	176	182	238	242	200	200	238	248
Рислинг АЗОС	125	151	239	239	176	182	238	242	194	200	248	248
Анапский устойчивый	141	143	247	253	180	186	242	244	200	204	238	244
Гранатовый	139	145	239	239	190	190	234	242	194	200	244	248
Бригантина	135	135	243	249	182	186	228	242	188	188	256	256
Мицар	139	143	239	249	182	190	238	242	194	202	248	260
Владимир	129	143	239	239	182	190	238	242	202	204	250	258
Пино фран	137	151	239	243	186	190	230	240	188	194	240	246
Алиготе	133	137	239	239	180	190	230	242	194	196	244	246
Курчанский	145	145	239	251	182	190	228	242	196	196	246	250
Литдар	133	135	249	249	180	195	236	240	186	204	248	256
Ларни мускатная	133	143	247	249	182	186	238	242	204	204	252	260
Мадлен Анжевин	135	135	249	249	182	195	238	242	194	194	250	260
Мускат гамбургский	135	149	247	249	180	186	234	240	186	192	240	256

Заключение. Полученные ДНК-паспорта сортов на практике могут эффективно применяться для определения чистосортности посадочного материала и насаждений винограда, уточнения родительских форм образца, а также в спорных вопросах авторства сорта.

Исследование поддержано программой развития биоресурсных коллекций ФАНО России.

Литература

1. Eiras-Dias J.E.J. Status of the Vitis national collection in Portugal. Report of a Working Group on Vitis. Rome, Italy: Bioversity International, 2008; 93-94.
2. Lacombe T. Status of the French Vitis National Collection. Report of a Working Group on Vitis. Rome, Italy: Bioversity International. 2008; 73-74.
3. Maghradze D., Maletic E., Maul E., Faltus M., Failla O. Field genebank standards for grapevines. Vitis. 2015a;54: 273-279.
4. Полулях, А.А. Генетические ресурсы винограда института «Магарач». Проблемы и перспективы сохранения / А.А. Полулях, В.А. Волынкин, В.В. Лиховской // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – № 21(6). – С. 608-616.
5. Dettweiler E. Genetic resources – Gene banks. Vitis. 1990; 29:57-59.
6. Егоров, Е.А. Анапская ампелографическая коллекция / Е.А. Егоров, О.М. Иль-яшенко, А.Г. Коваленко, В.А. Носульчак, Т.А. Нудьга, М.И. Панкин [и др.]. – Красно-дар, 2009. – 215 с.
7. Новикова, Л.Ю. Информационные системы генетических ресурсов винограда / Л.Ю. Новикова, Л.Г. Наумова, И.О. Рябчун // Плодоводство и виноградарство Юга Рос-сии [Электронный ресурс]. – 2016. – № 40(4). – С. 1–13. – Режим доступа: <http://journalkubansad.ru/pdf/16/04/01.pdf>.
8. Шибата, Д.К. Полимеразная цепная реакция и молекулярно-генетический ана-лиз биоптатов / Д.К. Шибата // Молекулярная клиническая диагностика. – М.: Мир, 1999. – С. 395-427.
9. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Molecular Biology. 1985. - V. 19. - № 1. P. 69-76.

References

1. Eiras-Dias J.E.J. Status of the Vitis national collection in Portugal. Report of a Working Group on Vitis. Rome, Italy: Bioversity International, 2008; 93-94.
2. Lacombe T. Status of the French Vitis National Collection. Report of a Working Group on Vitis. Rome, Italy: Bioversity International. 2008; 73-74.
3. Maghradze D., Maletic E., Maul E., Faltus M., Failla O. Field genebank standards for grapevines. Vitis. 2015a;54: 273-279.
4. Polulyax, A.A. Geneticheskie resursy vinograda instituta «Magarach». Problemy i perspektivy soxraneniya / A.A. Polulyax, V.A. Volynkin, V.V. Lixovskoj // Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii. – 2017. – № 21(6). – S. 608-616.
5. Dettweiler E. Genetic resources – Gene banks. Vitis. 1990; 29:57-59.
6. Egorov, E.A. Anapskaya ampelograficheskaya kolleksiya / E.A. Egorov, O.M. Il'yashenko, A.G. Kovalenko, V.A. Nosul'chak, T.A. Nud`ga, M.I. Pankin [i dr.]. – Krasnodar, 2009. – 215 s.
7. Novikova, L.Yu. Informacionnye sistemy geneticheskix resursov vinograda / L.Yu. Novikova, L.G. Naumova, I.O. Ryabchun // Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Ros-sii [Elektronnyj resurs]. – 2016. – № 40(4). – S. 1–13. – Rezhim dostupa: <http://journalkubansad.ru/pdf/16/04/01.pdf>.
8. Shibata, D.K. Polimeraznaya cepnaya reakciya i molekulyarno-geneticheskij analiz bioptatov / D.K. Shibata // Molekulyarnaya klinicheskaya diagnostika. – M.: Mir, 1999. – S. 395-427.
9. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Molecular Biology. 1985. - V. 19. - № 1. P. 69-76.