

В.Р. БОЧАРОВА<sup>1,2</sup>,  
І.А. КОВАЛЬОВА<sup>2</sup>, Л.С. МАЗУРЕНКО<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова  
<sup>2</sup>Національний науковий центр  
«Інститут виноградарства і виноробства ім. В.Є. Таїрова», Одеса  
E-mail: tigrys\_off@ukr.net

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГЕНОТИПІВ КЛОНІВ ВІНОГРАДУ ЗА ДОПОМОГОЮ МІКРОСАТЕЛІТНИХ МАРКЕРІВ



*Проведено SSR-аналіз клонів підщепних, технічних та столових сортів винограду. Отримана алельна характеристика за мікросателітними локусами клонів сортів винограду може бути використана для ідентифікації та паспортизації генотипів клонів винограду. Виявлено високий рівень мутаційної мінливості у клонів підщепних та технічних сортів. Отримано ДНК-паспорти перспективних клонів. Результати генотипування можуть бути використані для реєстрації клонів і захисту прав селекціонерів.*

© В.Р. БОЧАРОВА, І.А. КОВАЛЬОВА, Л.С. МАЗУРЕНКО, 2009

**Вступ.** Вегетативне розмноження винограду практикується з давніх часів. Впродовж багатьох циклів вегетативного розмноження сортів винограду у них з'являються спонтанні мутації, які приводять до фенотипових або фізіологічних відмінностей [1]. Що старше сорт і насадження, тим відповідно вище рівень нагромадження мутацій, які підвищують відмінності клонів.

З погляду популяційної генетики клони являють собою об'єкт найпростішої таксономічної одиниці виду, представленої, можливо, унікальним генотипом [2]. Утворення клонів відбувається завдяки вегетативній мінливості.

Вегетативна мінливість – процес появи внутрішньосортних відмінностей у індивідуальних рослин за низкою певних ознак (морфологічні, біохімічні та ін.), що відбувається в природних умовах у результаті виникнення спонтанних мутацій або тривалих модифікацій [3]. Внутрішньосортна мінливість може бути не тільки результатом епігенетичних модифікацій у відповідь на дію факторів зовнішнього середовища, але й на наявність фітопатологічних агентів [4].

Відмінності, що виникають, можуть мати позитивне й негативне господарське значення для виноградарства. Сортополіпшення винограду досягається методами клонової селекції, що нині застосовуються в усьому світі для інтенсифікації виноградарства [5].

У дослідженнях Зуліні та ін. [6] на популяції старих насаджень, вік яких нараховує від 30 до 100 років, спостерігається наявність мутацій. У ДНК клонів різних сортів виявляються унікальні алельні профілі, деякі локуси показують наявність нових або навіть додаткових алелів, що свідчить про хімеризм [1, 6–8].

Хімерну структуру у деяких сортів описали Ріаз та ін. [9] і Франкс та ін. [10]. Хоквігні та ін. [11] запропонували модель для внутрішньосортної мінливості, що включає хімерний стан і перебудови клітинних шарів. Тип клонового поліморфізму за забарвленням ягоди було пояснено ретротранспозонною активністю [12]. Проте причини, механізми й закономірності процесів зміни генотипу індивідуальної рослини в процесі онтогенезу (його форми і розміру вегетативних органів, зміни вегетаційного періоду та ін.) залишаються недостатньо вивченими.

Заключним етапом є вивчення та виділення клонів другого вегетативного покоління, тобто

результатом роботи клонової селекції є реєстрація перспективних клонів і введення їх у розмноження. Для проведення реєстрації клонів необхідна молекулярно-генетична ідентифікація генотипу.

Метою даної роботи є створення ДНК-маркерної системи паспортизації для ідентифікації і реєстрації генотипів господарсько-цінних клонів сортів винограду.

**Матеріали й методика.** *Рослинний матеріал.* У дослідження були взяті клони другого вегетативного покоління підщепного сорту Riparia × Rupestris 101–14 (клон 1182, 4923, 101, 672) клони технічних сортів Каберне Совіньйон (клон 1521, 2043, 143141, 22103) і Сухолиманський білий (клон 5110, 1632, 244); клони столових сортів Одеський сувенір (клон 8022, 7844, 8691, 5837) і Мускат гамбурзький (клон 353, 2034, 622, 321) (табл. 1). Матеріал для дослідження люб'язно наданий лабораторією клонової селекції ННЦ «ІВіВ ім. В.Е. Таїрова». Дослідження проведені впродовж 2008 р.

Клони були виділені як найбільш перспективні за продуктивністю та низкою інших показників і ознак за допомогою методики індивідуального добору і рекомендовані для розмноження на сертифікованій основі.

Важливо зазначити, що деякі клони мають відмінності від вихідного сорту не тільки за кількісними показниками, а також і за морфологічними ознаками. Так, клон 4923 сорту Riparia × Rupestris 101–14 характеризується чоловічим типом квітки й належить до першого біотипу (за даними Чисникова та ін. [5]), у той час як інші клони даного сорту мають функціонально жіночий тип квітки (табл. 1).

*Виділення ДНК винограду* проводили із заморожених при  $-20^{\circ}\text{C}$  молодих листків за методикою, розробленою у відділі молекулярної генетики Південного біотехнологічного центру в рослинництві (м. Одеса) [13].

*SSR-аналіз.* Були використані 14 пар мікросателітних маркерів п'яти серій: серія VVS – VVS2 (розроблена Томасом та ін. [14]); серія VrZAG – VrZAG62, VrZAG79 (Сефк та ін. [15]); серія VVMD – VVMD7, VVMD27, VVMD28, VVMD36 (Боверс та ін. [16], [17]); серія VVI – VVIb66, VVIv57, VVIp37, VVIv70 (Мердиноглу та ін. [18]); серія VMC – VMC2b3, VMC2h4, VMC6e10 (Vitis microsatellite Consortium, Agro-

gene). Основні характеристики праймерів наведені в табл. 2.

Реакційна суміш для ПЛР (об'єм 25 мкл) містила 20 нг геномної ДНК, 200 мкмоль кожного dNTP, 1–2,5 ммоль  $\text{MgCl}_2$  (залежно від типу праймерів), 0,01 % твін-20, 1 од. Таq-полімерази, 0,2 мкмоль кожного праймера.

Ампліфікацію проводили на термоциклері Терцик («ДНК-технологія», Росія) у режимі: початковий цикл – 4 хв при  $94^{\circ}\text{C}$ , 45 с при  $50\text{--}58^{\circ}\text{C}$ , 1,5 хв при  $72^{\circ}\text{C}$ ; основний етап 35 циклів – 1 хв при  $94^{\circ}\text{C}$ , 45 с при  $50\text{--}58^{\circ}\text{C}$  (залежно від типу праймерів), 1,5 хв при  $72^{\circ}\text{C}$ ; фінальний етап 1 цикл – 1 хв при  $94^{\circ}\text{C}$ , 45 с при  $50\text{--}58^{\circ}\text{C}$ , 5 хв при  $72^{\circ}\text{C}$ .

*Візуалізацію фрагментів ампліфікації* здійснювали за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ 8 %) у буфері  $1 \times \text{TBE}$ . Для фіксації продуктів ампліфікації використовували забарвлення нітратом срібла.

Отримані дані документували за допомогою відеосистеми UVP Bioimaging Systems EC3. Розмір поліморфних фрагментів ДНК визначали за допомогою комп'ютерної програми «Launch Vision WorksLS» згідно зі стандартом – pBR322 DNA /BsuR1 (HaeIII) («Fermentas», Литва).

*Статистичну обробку даних* та розрахунок частоти зустрічальності алелів, індекса поліморфності ( $H_e$ ), середньоарифметичного значення гетерозиготності ( $H_{av}$ ), загального ефективного числа алелів ( $N_e$ ) здійснювали за рекомендаціями [19–21].

**Результати досліджень та їх обговорення.** В результаті SSR-аналізу 19 досліджуваних клонів винограду з використанням 14 пар праймерів до мікросателітних локусів отримані спектри фрагментів ДНК для створення паспортів клонів.

Проаналізовані локуси виявили досить високий рівень поліморфізму (табл. 3). Виявлено в середньому 6 алелів на локус, а очікувана гетерозиготність склала 0,71, що свідчить про інформативність даної маркерної системи.

Відповідно до методичних рекомендацій Сиволапа [22, 23] для ідентифікації і реєстрації генотипів однолітніх рослин був використаний шаблон для створення паспортів клонів. Кожному локусу відповідає буква латинського алфавіту (табл. 2), індекс біля якої відповідає розміру алеля. У випадку гомозиготності вка-

Характеристика клонів, включених до аналізу

Клон	Рік виділення	Регіон виділення	Основні характеристики клона
Riparia × Rupestris 101–14			
1182*	1983	Дослідницьке господарство «Кучурганське»	Квітка функціонально жіночого типу; утворює грона; верхівки молодого пагона зелені
4923*	1978	Дослідницьке господарство ім. Суворова, Болградський р-н Одеської обл.	Квітка функціонально чоловічого типу; молоді листи верхівки пагона бронзово-червоні
101	1995	Агрофірма радгосп «Білозерський»	Квітка функціонально жіночого типу
672	1978	Дослідницьке господарство ім. Суворова	Квітка функціонально жіночого типу
Каберне Совіньйон			
1521	1991	Промислове насадження радгоспу «Бурлюк», Кримська обл.	Гроно та ягода великі. Урожайність висока. Органолептична оцінка вина: колір світло-рубіновий, характер червоного виражений; аромат чистий, сортовий; смак гармонічний, середньої щільності
2043*	1991	Те саме	Гроно та ягода великі. Урожайність середня. Органолептична оцінка вина: колір світло-рубіновий із гранатовим відтінком; аромат чистий, сортовий, характер червоного виражений; смак гармонічний, середньої щільності, з м'яким пасльоном
143141*	1991	Промислове насадження радгосп-заводу ім. Леніна, Херсонська обл.	Гроно і ягода середні. Урожайність середня. Органолептична оцінка вина: колір темно-гранатовий з винним відтінком; аромат чистий, сортовий, характер червоного виражений; смак середньої щільності, з м'яким пасльоном
22103*	1991	Промислове насадження радгоспу «Бурлюк», Кримська обл.	Гроно і ягода великі. Урожайність середня. Органолептична оцінка вина: колір темно-гранатовий з рубіновим відтінком; аромат чистий, сортовий, характер червоного виражений; смак повний з достатнім таніном
Сухолиманський білий			
1632*	1984	Промислове насадження дослідницького господарства «Таировское», ННЦ «ІВІВ ім. В.Е. Таїрова»	Урожайність дуже висока. Кущі середньої сили росту. Лоза визріває добре. Органолептична оцінка вина: колір світло-солом'яний, аромат чистий сортовий з яскравим квітковим-медовим букетом, смак середньої повноти
5110	1984	Промислове насадження радгоспу «Бурлюк», Кримська обл.	Урожайність висока. Висока цукристість при помірній кислотності. Органолептична оцінка вина: колір світло-солом'яний, аромат чистий сортовий з яскравим квітковим-плодовим букетом
244	1984	Промислове насадження дослідницького господарства «Таировское»	Урожайність висока. Органолептична оцінка вина: колір світло-солом'яний, аромат чистий сортовий, яскравий, смак середньої повноти, кислотність помірна
Одеський сувенір			
8022*	1986	Промислове насадження дослідницького господарства «Таировское»	Урожайність понад 120 ц/га, кущі середньорослі, грона конічне з крилом, ягода крупна, насиченого темного кольору, дозрівання грона на кущах одночасне

Клон	Рік виділення	Регіон виділення	Основні характеристики клона
7844*	1986	Те саме	Урожайність понад 100 ц/га, кущі середньорослі, гроно конічне, ягода крупна, дозрівання грон на кущах вирівняне
8691	1986	»	Урожайність понад 120 ц/га, кущі середньорослі, гроно велике, конічне, ягода крупна, насиченого темного кольору, дозрівання грон на кущах неоднорчасне
5837	1986	»	Урожайність понад 130 ц/га, кущі сильнорослі, гроно конічне або частіше гіллясте з сильним гребенем, ягода крупна, насиченого темного кольору, дозрівання грон на кущах вирівняне, клон більш стійкий до оідіуму
Мускат гамбурзький			
353	1984	Промислове насадження радгоспу ім. Суворова	Гроно конічне або гіллясте; ягода велика, овальної форми, темно-синя; листя велике, осіннє забарвлення червоно-буре; кущі середньої сили росту
2034*	1984	Промислове насадження дослідницького господарства «Тайровское»	Гроно велике, конічне, ягода округла, темно-фіолетового кольору із сильним нальотом; листя середнє; осіннє забарвлення бурувато-червоне; кущі сильнорослі
622	1984	Промислове насадження радгоспу ім. Суворова	Гроно конічне або гіллясте, пухке; ягода округла або овальна, темно-синього кольору; листя велике, осіннє забарвлення червоно-буре; підвищена стійкість до грибних хвороб (оідіуму); кущі сильнорослі
321	1984	Те саме	Гроно конічне; ягода округла або овальна, темно-фіолетового кольору; кущі середньої сили росту; осіннє забарвлення листя буре

\* Клони, що підтвердили свою продуктивність.

зується тільки один алель. Формули генотипів клонів представлені в табл. 4.

Появу нехарактерних або додаткових алелів варто очікувати у старих сортів, що культивувалися близько 100 років та багаторазово вегетативно розмножувалися в різних регіонах Європи (Каберне Совіньйон та Мускат гамбурзький).

Для підщепних сортів також характерні особливості, за якими вірогідна поява відмінностей геному у клонів певного сорту. Так, підщепний сорт Riparia × Rupestris 101–14 представлений декількома біотипами (табл. 1).

У клона 4923 виявлено мутантні алелі за локусами VMC2h4 (206:216 п.о.) і VVMD36 (271:271 п.о.) (рис. 1). Характерною ознакою даного клона є функціонально чоловічий тип квітки (перший біотип) та висока продуктивність пагонів на відміну від клонів 1182, 101 і 672, що мають жіночий тип квітки (другий біотип).

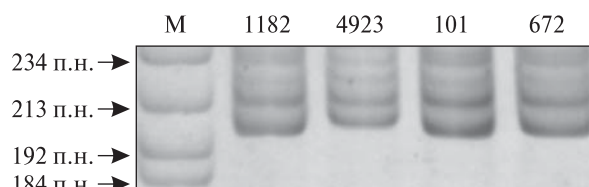


Рис. 1. Результати електрофорезу продуктів ампліфікації ДНК клонів сорту Riparia × Rupestris 101–14 за локусом VMC2h4. М – молекулярний маркер pBR322 DNA/BsuR1

Слід зазначити, що сорт Одеський сувенір є результатом схрещування сортів Молдавський × Мускат гамбурзький. Клони останнього були також включені в наші дослідження.

Зазначена наявність загального алеля у всіх клонів сортів Одеський сувенір і Мускат гамбурзький підтверджує їхнє споріднення, крім локусу VVMD36 (Одеський сувенір – 279:279 п.о.; Мускат гамбурзький – 262:262 п.о.).

Характеристика використаних SSR-локусів згідно з даними літератури [14–17]  
та <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>

Код	Локус	Послідовність фланкуючих праймерів (5'-3')	Кількість алелів	Розмір фрагментів ДНК, п.о.	Група зчеплення	Повтори
A	VMC2b3	TCTGTGAATTTGCAGAGACGC GGCTCAGACACAAACATGACCT	11	161–187	1	(GA) <sub>8</sub> CA(GA) <sub>8</sub>
B	VVMD28	AACAATTCATGAAAAGAGAGA- GAGAGA TCATCAATTCGTATCTCTATTTG- CTG	16	221–279	3	–
C	VVMD36	TAAAATAATAATAGGGGGA- CACGGG GCAACTGTAAAGGTAAGA- CACAGTCC	19	244–315	3	–
D	VVIp37	AGGACCAAGTAAAAGCTTATA GTATGTTTCATATGCTCCTAAGC	7	123–156	4	(GA) <sub>13</sub> (GATA) <sub>9</sub> AAA(GA) <sub>6</sub>
E	VVMD27	GTACCAGATATGAATACATCCG- TAAGT ACGGGTATAGAGCAAACGGTG	23	175–219	5	–
F	VrZAG79	AGATTGTGGAGGAGGGAA- CAAACCG TGCCCCCATTTTCAAACACTC- CCTTC	14	238–264	5	(GA) <sub>19</sub>
G	VMC6e10	CTAGGTGTGCCAAGAGATCAGA CATTTGTGGGTAGTTGTGAGGA	12	90–122	5	(GA) <sub>13</sub>
H	VVMD7	AGAGTTGCGGAGAACAGGAT CGAACCTTCACACGCTTGAT	17	232–266	7	(CT) <sub>14.5</sub>
I	VrZAG62	GGTGAATGGGCACCGAACA- CACG CCATGTCTCTCCTCAGCTTCTC- AGC	18	174–220	7	(GA) <sub>19</sub>
J	VVb66	CCACTAGTGGTCAGAAAAGAAG TTGTATTGTGTGCCTCTTCTCA	8	88–102	8	(GA) <sub>13</sub>
K	VVS2	AAATTCAAAATTCTAATTCAA CAGCCCGTAAATATATCCATC	19	123–161	11	(AG) <sub>9</sub>
L	VMC2h4	ACCAGGTGTGCCTATAAGAATC TCTCTGGAACATCCAATCAAC	13	197–235	12	(GA) <sub>17</sub>
M	VViv70	CAGGAAAACCTATAAACACTCC TTACAATTGATTTCCCCCTTCA	8	169–193	19	(GA) <sub>22</sub>
N	VVin57	TTACCAACGTAACAATGTGCAA GGAGTTGAATGGCTACTAAAT	7	288–313	–	(TA) <sub>2</sub> (CA) <sub>13</sub>

Сорт Мускат гамбурзький, менш давній, ніж Каберне Совіньйон, не показав відмінностей між генотипами клонів.

Відсутність генетичних відмінностей у клонів столових сортів також може бути пов'язана з близько розташованими регіонами виділен-

ня. Як показано в попередніх дослідженнях [24], у клонів, інтродукованих з географічно віддалених колекцій, більш вірогідне виявлення генотипових відмінностей, ніж у клонів, виділених з однієї області. Крім того, відбір клонів сорту Мускат гамбурзький проводили

**Показники інформативності ДНК-маркерної системи для дослідженої популяції клонів**

SSR-локус	Кількість алелів	Довжина алелів, п.о.	Частота зустрічальності	Кількість		He	Ефективна кількість алелів
				гомозигот	гетерозигот		
VVS2	7	135	0,105	8	11	0,35	1,55
		137	0,5				
		141	0,105				
		145	0,105				
		147	0,079				
		149	0,053				
		153	0,053				
VVMD27	7	165	0,316	4	15	0,81	5,2
		175	0,053				
		179	0,134				
		181	0,079				
		185	0,21				
		195	0,105				
		205	0,105				
VrZAG62	8	178	0,105	0	19	0,86	6,9
		189	0,157				
		192	0,105				
		193	0,201				
		195	0,184				
		201	0,105				
		203	0,079				
206	0,053						
VrZAG79	7	244	0,211	7	12	0,82	5,68
		246	0,079				
		250	0,184				
		252	0,184				
		256	0,105				
		258	0,211				
		260	0,026				
VMC2b3	7	134	0,079	4	15	0,81	5,26
		143	0,079				
		162	0,211				
		166	0,105				
		167	0,105				
		184	0,105				
		187	0,316				
VMC2h4	9	204	0,079	6	13	0,83	5,92
		206	0,026				
		208	0,079				
		210	0,105				
		212	0,316				
		216	0,105				
		220	0,158				
		224	0,079				
		228	0,053				
VVMD7	3	240	0,289	12	7	0,54	2,17
		246	0,105				
		250	0,605				

SSR-локус	Кількість алелів	Довжина алелів, п.о.	Частота зустрічальності	Кількість		He	Ефективна кількість алелів
				гомозигот	гетерозигот		
VVIb66	6	88	0,395	8	11	0,76	4,12
		90	0,211				
		94	0,105				
		96	0,105				
		102	0,132				
		106	0,053				
VVMD28	5	227	0,079	11	8	0,65	2,84
		237	0,026				
		243	0,5				
		249	0,105				
		255	0,289				
VVMD36	7	261	0,395	14	5	0,74	3,89
		263	0,211				
		267	0,026				
		271	0,053				
		273	0,079				
		279	0,211				
		288	0,026				
VVIIn57	3	305	0,364	8	3	0,6	2,5
		313	0,5				
		323	0,136				
VVIp37	7	123	0,079	6	13	0,81	5,26
		137	0,105				
		140	0,316				
		144	0,105				
		150	0,079				
		152	0,158				
VVIv70	4	169	0,133	11	4	0,55	2,22
		171	0,2				
		189	0,4				
		201	0,267				
VMC6e10	6	96	0,211	13	6	0,77	4,35
		98	0,263				
		102	0,105				
		112	0,053				
		116	0,316				
		120	0,053				
Середнє	6,14	—	—	8	10,1	0,71	4,13

за низкою ідентичних показників та ознак на насадженнях, отриманих методом масової селекції.

Клони технічного сорту Сухолиманський білий не виявили генетичних відмінностей за дослідженими мікросателітними локусами.

Це може бути пов'язано із тим, що сорт порівняно молодий та добре селекційно вирівняний.

Дослідження геному клонів сорту Каберне Совіньйон виявили відмінності за дев'ятьма мікросателітними локусами. Такий рівень му-

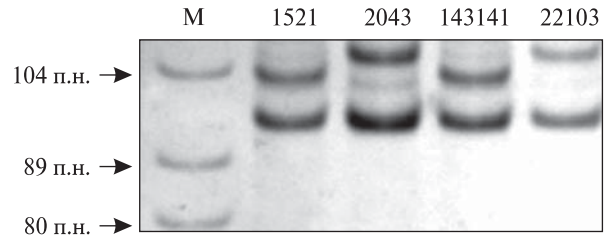


таційної мінливості даного сорту раніше описувався в літературі.

Монкада та ін. [1] дослідили генетичне розмаїття, асоційоване із географічним поширенням видів, що розмножуються вегетативно, на моделі стародавнього сорту Каберне Совіньйон. Було проаналізовано 55 клонів, отриманих з семи країн світу, за допомогою 84 мікросателітних маркерів. Однак тільки два клони показали передбачуваний предковий генотип, а найбільш розбіжний генотип показав французький клон, що накопичив п'ять соматичних мутацій. В результаті дослідники детектували 19 поліморфних мікросателітних локусів (21,4 %) і виявили 22 різних генотипи в популяції, в якій генетичне споріднення становило понад 97 %.

Згідно з нашими даними клони 1521 і 143141 відрізняються від клонів 2043 і 22103 за шістьма локусами. Так, за локусом VVS2 клони гетерозиготні і мають загальний алель (141 п.о.), однак клони 1521 і 143141 мають генотип 141:153 п.о., у той час як клони 2043 і 22103 мають генотип 141:149 п.о.

Такий розподіл генотипів спостерігався також за локусом VrZAG62 (клони 1521 і 143141 –



**Рис. 2.** Результати електрофорезу продуктів ампліфікації ДНК клонів сорту Каберне Совіньйон за локусом VVIb66. М – молекулярний маркер pBR322 DNA/ BsuR1

189:195 п.о., клони 2043 і 22103 – 195:206 п.о.); за локусом VVIb66 (клони 1521 і 143141 – 94:102 п.о.; клони 2043 і 22103 – 94:106 п.о.) (рис. 2) та за локусом VVMD27 (клони 1521 і 143141 – 175:185 п.о.; клони 2043 і 22103 – 179:185 п.о.).

За локусом VMC2h4 у клонів 1521 і 143141 була виявлена наявність нового алеля. Клони 1521 і 143141 є гетерозиготними (220:228 п.о.) і мають один загальний алель із гомозиготними за даним локусом клонами 2043 і 22103 (220:220 п.о.). Аналогічно, за локусом VVIp37 клони 1521 і 143141 – гетерозиготні (152:

Таблиця 4

**Формули генотипів клонів згідно з алельними характеристиками за мікросателітними локусами**

Сорт	Клон	Формула
Riparia × Ruprestis 101–14	1182*	A <sub>162</sub> B <sub>255</sub> C <sub>261</sub> E <sub>195:205</sub> F <sub>258</sub> H <sub>246:250</sub> I <sub>178:192</sub> J <sub>90</sub> K <sub>135:145</sub> L <sub>203:216</sub> N <sub>305</sub>
	4923*	A <sub>162</sub> B <sub>255</sub> C <sub>271</sub> E <sub>195:205</sub> F <sub>258</sub> H <sub>246:250</sub> I <sub>178:192</sub> J <sub>90</sub> K <sub>135:145</sub> L <sub>206:216</sub> N <sub>305</sub>
	101 672	A <sub>162</sub> B <sub>255</sub> C <sub>261</sub> E <sub>195:205</sub> F <sub>258</sub> H <sub>246:250</sub> I <sub>178:192</sub> J <sub>90</sub> K <sub>135:145</sub> L <sub>203:216</sub> N <sub>305</sub> A <sub>162</sub> B <sub>255</sub> C <sub>261</sub> E <sub>195:205</sub> F <sub>258</sub> H <sub>246:250</sub> I <sub>178:192</sub> J <sub>90</sub> K <sub>135:145</sub> L <sub>203:216</sub> N <sub>305</sub>
Каберне Совіньйон	1521	A <sub>166:184</sub> B <sub>243</sub> C <sub>261:288</sub> D <sub>152:155</sub> E <sub>175:185</sub> F <sub>250</sub> G <sub>112:120</sub> H <sub>240</sub> I <sub>189:195</sub> J <sub>94:102</sub> K <sub>141:153</sub> L <sub>220:228</sub> N <sub>313</sub>
	2043*	A <sub>166:184</sub> B <sub>237:243</sub> C <sub>261</sub> D <sub>155</sub> E <sub>179:185</sub> F <sub>250</sub> G <sub>98</sub> H <sub>240</sub> I <sub>195:206</sub> J <sub>94:106</sub> K <sub>141:149</sub> L <sub>220</sub> N <sub>313</sub>
	143141*	A <sub>166:184</sub> B <sub>243</sub> C <sub>261:266</sub> D <sub>152:155</sub> E <sub>175:185</sub> F <sub>250</sub> G <sub>112:120</sub> H <sub>240</sub> I <sub>189:195</sub> J <sub>94:102</sub> K <sub>141:153</sub> L <sub>220:228</sub> N <sub>313</sub>
	22103*	A <sub>166:184</sub> B <sub>237:243</sub> C <sub>261</sub> D <sub>155</sub> E <sub>179:185</sub> F <sub>250:260</sub> G <sub>98</sub> H <sub>240</sub> I <sub>195:206</sub> J <sub>94:106</sub> K <sub>141:149</sub> L <sub>220</sub> N <sub>313</sub>
Сухолиманський білий	5110	A <sub>134:142</sub> B <sub>227:254</sub> C <sub>261:273</sub> D <sub>123:150</sub> E <sub>179:181</sub> F <sub>246:253</sub> G <sub>98</sub> H <sub>240:250</sub> I <sub>195:203</sub> J <sub>88:102</sub> K <sub>137:147</sub> L <sub>208:224</sub> N <sub>313:323</sub>
	1632*	A <sub>134:142</sub> B <sub>227:254</sub> C <sub>261:273</sub> D <sub>123:150</sub> E <sub>179:181</sub> F <sub>246:253</sub> G <sub>98</sub> H <sub>240:250</sub> I <sub>195:203</sub> J <sub>88:102</sub> K <sub>137:147</sub> L <sub>208:224</sub> N <sub>313:323</sub>
	244	A <sub>134:142</sub> B <sub>227:254</sub> C <sub>261:273</sub> D <sub>123:150</sub> E <sub>179:181</sub> F <sub>246:253</sub> G <sub>98</sub> H <sub>240:250</sub> I <sub>195:203</sub> J <sub>88:102</sub> K <sub>137:147</sub> L <sub>208:224</sub> N <sub>313:323</sub>
Одеський сувенір	8022*	A <sub>167:187</sub> B <sub>243</sub> C <sub>279</sub> D <sub>140:144</sub> E <sub>166</sub> F <sub>244:252</sub> G <sub>115</sub> H <sub>250</sub> I <sub>193:201</sub> J <sub>88</sub> K <sub>138</sub> L <sub>212</sub> M <sub>189</sub>
	7844*	A <sub>167:187</sub> B <sub>243</sub> C <sub>279</sub> D <sub>140:144</sub> E <sub>166</sub> F <sub>244:252</sub> G <sub>115</sub> H <sub>250</sub> I <sub>193:201</sub> J <sub>88</sub> K <sub>138</sub> L <sub>212</sub> M <sub>189</sub>
	8691	A <sub>167:187</sub> B <sub>243</sub> C <sub>279</sub> D <sub>140:144</sub> E <sub>166</sub> F <sub>244:252</sub> G <sub>115</sub> H <sub>250</sub> I <sub>193:201</sub> J <sub>88</sub> K <sub>138</sub> L <sub>212</sub> M <sub>189</sub>
	5837	A <sub>167:187</sub> B <sub>243</sub> C <sub>279</sub> D <sub>140:144</sub> E <sub>166</sub> F <sub>244:252</sub> G <sub>115</sub> H <sub>250</sub> I <sub>193:201</sub> J <sub>88</sub> K <sub>138</sub> L <sub>212</sub> M <sub>189</sub>
	353	A <sub>187</sub> B <sub>243:250</sub> C <sub>262</sub> D <sub>140</sub> E <sub>166:186</sub> F <sub>244:256</sub> G <sub>101:115</sub> H <sub>250</sub> I <sub>189:193</sub> J <sub>88:96</sub> K <sub>138</sub> L <sub>210:212</sub> M <sub>169:189</sub>
Мускат гамбурзький	2034*	A <sub>187</sub> B <sub>243:250</sub> C <sub>262</sub> D <sub>140</sub> E <sub>166:186</sub> F <sub>244:256</sub> G <sub>101:115</sub> H <sub>250</sub> I <sub>189:193</sub> J <sub>88:96</sub> K <sub>138</sub> L <sub>210:212</sub> M <sub>169:189</sub>
	622	A <sub>187</sub> B <sub>243:250</sub> C <sub>262</sub> D <sub>140</sub> E <sub>166:186</sub> F <sub>244:256</sub> G <sub>101:115</sub> H <sub>250</sub> I <sub>189:193</sub> J <sub>88:96</sub> K <sub>138</sub> L <sub>210:212</sub> M <sub>169:189</sub>
	321	A <sub>187</sub> B <sub>243:250</sub> C <sub>262</sub> D <sub>140</sub> E <sub>166:186</sub> F <sub>244:256</sub> G <sub>101:115</sub> H <sub>250</sub> I <sub>189:193</sub> J <sub>88:96</sub> K <sub>138</sub> L <sub>210:212</sub> M <sub>169:189</sub>

\* Клони, що підтвердили свою продуктивність.



155 п.о.), а клони 2043 і 22103 — гомозиготні (155:155 п.о.).

Крім того, були виявлені індивідуальні відмінності за двома локусами. Клон 22103 за локусом VrZAG79 гетерозиготний і має додатковий алель (250:260 п.о.) на відміну від інших гомозиготних клонів (250:250 п.о.). Клон 2043 за локусом VVMD28 також показав наявність нового алеля (237:243 п.о.), що не був виявлений у вибірці (243:243 п.о.).

За локусом VVMD36 виявлені два нових алелі у клона 1521 (261:288 п.о.) і клона 143141 (261:266 п.о.), у той час як клони 2043 і 22103 були гомозиготними (261:261 п.о.).

Слід зазначити, що за локусом VMC6e10 клони 1521 і 143141 не мали загальних алелів із клонами 2043 і 22103. Так, перша група клонів (1521 і 143141) була гетерозиготною (112:120 п.о.), а друга група клонів 2043 і 22103 — гомозиготною і представлена алелями меншої молекулярної маси (98:98 п.о.).

За локусами VVMD7, VVin57, VMC2b3 відмінностей між генотипами клонів сорту Каберне Совінйон не зафіксовано.

Можливість такого роду генетичної варіабельності, як у клонів сорту Каберне Совінйон, присутня і у інших видів, що розмножуються вегетативно.

Виходячи з цього, дослідження внутрішньосортового розмаїття сортів доцільно, тому що результати можуть допомогти пояснити процеси, що приводять до розмаїтості у інших сортів.

Молоді сорти не накопичують достатньої кількості мутацій, тому виявити зміни геному молодого сорту досить складно. Для пошуку змін в генотипі необхідно збільшити кількість досліджуваних локусів, а також додатково застосувати інші типи молекулярно-генетичного аналізу (AFLP, SNP і ін.), що дозволяють розширити пошуки в геномі й зафіксувати найдрібніші зміни.

**Висновки.** Отримано алельну характеристику за мікросателітними локусами клонів підщепних, технічних та столових сортів винограду, яка може бути використана для ідентифікації генотипів клонів. Виявлено високий рівень генетичного поліморфізму у клонів технічного сорту Каберне Совінйон. У перспективного клону 4923 підщепного сорту Riparia × Rupestris 101-14 виявлено відмінності за

двома SSR-локусами — VVMD36 та VMC2h4. Отримано ДНК-паспорти перспективних клонів, які можуть бути використані для сертифікації посадкового матеріалу та захисту прав селекціонерів.

*V.R. Bocharova,*

*I.A. Kovaliova, L.S. Mazurenko*

#### IDENTIFICATION OF GENOTYPES OF GRAPEVINE CLONES USING MICROSATELLITE MARKERS

SSR-analysis of a number of clones of rootstock, technical and table grape cultivars has been carried out. Allele microsatellite loci characteristics can be used for genotype identification of grape cultivar clones. High level of mutational variability among the studied clones of rootstock and technical cultivars has been revealed. DNA-passports of perspective clones were created. The results of genotyping can be used for clone registration and protection of rights of breeders.

*V.P. Bocharova,*

*I.A. Kovaleva, L.S. Mazurenko*

#### ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОТИПОВ КЛОНОВ ВИНОГРАДА ПРИ ПОМОЩИ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ

Проведен SSR-анализ клонов подвойных, технических и столовых сортов винограда. Полученная аллельная характеристика по микросателлитным локусам может быть использована для идентификации и паспортизации генотипов клонов сортов винограда. Вывявлен высокий уровень мутационной изменчивости у клонов подвойных и технических сортов. Получены ДНК-паспорта перспективных клонов. Результаты генотипирования могут быть использованы для регистрации клонов и защиты прав селекционеров.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Moncada X., Pelsy F., Merdinoglu D., Hinrichsen P.* Genetic diversity and geographical dispersal in grapevine clones revealed by microsatellite markers // *Genome*. — 2006. — **49**. — P. 1459–1472.
2. *Bisson J.* The principal ecogeographical groups in French grapevine assortment // *J. Int. Sci. Vigne Vin*. — 1995. — **29**. — P. 63–68.
3. *Энциклопедия виноградарства*. Т. 3. — Кишинев, 1987.
4. *Walter B., Martelli G. P.* Consideration on grapevine selection and certification // *Vitis*. — 1998. — **37**. — P. 87–90.
5. *Чисников В.С., Тулаева М.И., Глотова Л.В., Хилько В.С.* Улучшение подвоя Рипариа × Рупестрис 101–14 методами клоновой селекции // *Виноград и вино России*. — 2001. — № 3. — С. 25–28.

6. Zulini L., Fabro E., Peterlunger E. Characterization of the grapevine cultivar Picolit by means of morphological descriptors and molecular markers // *Vitis*. – 2005. – **44**, № 1. – P. 35–38.
7. Fernandez L., Doligez G., Lopez M.R., Thomas A., Bouquet A., Torregrosa L. Somatic chimerism, genetic inheritance, and mapping of the fleshless berry (flb) mutation in grapevine (*Vitis vinifera* L.) // *Genome*. – 2006. – **49**. – P. 721–728.
8. Techera G.A., Jubany S. et al. Molecular diversity within clones of cv. Tannat (*Vitis vinifera*) // *Vitis*. – 2004. – **43**, № 4. – P. 179–185.
9. Riaz S., Garrison K.E., Dangl G.S., Boursiquot J.M., Meredith C.P. Genetic divergence and chimerism within ancient asexually propagated winegrape cultivars // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* – 2002. – **127**. – P. 508–514.
10. Franks T., Botta R., Thomas M. R. Chimerism in grapevines: implication for cultivar identity, ancestry and genetic improvement // *Theor. Appl. Genet.* – 2002. – **104**. – P. 192–199.
11. Hoquigny S., Pelsy F., Dumas V., Kindt S., Heloir M.-C., Merdinoglu D. Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states // *Genome*. – 2004. – **47**. – P. 579–589.
12. Kobayashi S., Goto-Yamamoto N., Hirochika H. Retrotransposon-induced mutations in grape skin color // *Science*. – 2004. – **304**. – P. 982.
13. Сиволап Ю.М., Вербицкая Т.Г., Прокопенко С.Н., Тулаева М.И. Исследование внутривидового полиморфизма *Vitis vinifera* // *Цитология и генетика*. – 1993. – **27**, № 3. – С. 11–15.
14. Thomas M.R., Scott N.S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs) // *Theor. Appl. Genet.* – 1993. – **86**. – P. 885–990.
15. Sefc K.M., Regner F.J., Turetschek E., Glossl J., Steinkellner H. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of different *Vitis* species // *Genome*. – 1999. – **42**. – P. 367–373.
16. Bowers J.E., Dangl G.S., Virnani R., Meredith C.P. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.) // *Genome*. – 1996. – **39**. – P. 628–633.
17. Bowers J.E., Dangl G.S., Meredith C.P. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape // *Amer. J. Enology Vitic.* – 1999. – **50**, № 3. – P. 243–246.
18. Merdinoglu D., Butterlin G., Bevilacqua L., Chiquet V., Adam-Blondon A.-F., Decroocq S. Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR // *Mol. Breed.* – 2005. – № 15. – P. 349–366.
19. Кожухова Н.Э., Сиволап Ю.М. Идентификация и регистрация генотипов кукурузы при помощи молекулярных маркеров // *Генетика*. – 2004. – **40**, № 1. – С. 59–66.
20. *Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях* : Науч.-метод. руководство / Под ред. Ю.М. Сиволапа. – К.: Аграр. наука, 1998. – 156 с.
21. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск : Вышэйш. шк., 1973. – 320 с.
22. *Ідентифікація і реєстрація генотипів м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.), ячменю (*Hordeum vulgare* L.), соняшника (*Helianthus annuus* L.) за допомогою аналізу мікросателітних локусів* : Метод. рекомендації. – Одеса : ТОВ «Зовнішрекламсервіс», 2004. – 16 с.
23. Сиволап Ю.М., Топчиева Е.А., Чеботарь С.В. Идентификация и паспортизация сортов мягкой пшеницы методами RAPD- и SSRP-анализа // *Генетика*. – 2000. – **36**, № 1. – С. 44–51.
24. Бочарова В.Р., Тулесва М.І., Мулюкіна Н.А., Ковальова І.А. Ідентифікація та паспортизація генотипів винограду за допомогою ДНК-маркерів. // *Вісн. Одес. нац. ун-ту*. – 2008. – **13**, вип. 4. – С. 127–134.

Надійшла 06.11.08