

УДК 634.8 + 631.52 + 581.167

UDC 634.8 + 631.52 + 581.167

**ТЕХНОЛОГИЯ ОТБОРА КЛОНОВ
ВИНОГРАДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ**

**TECNOLOGY OF CLONE SELECTION WITH
THE USE OF MOLECULAR MARKERS**

Звягин Андрей Сергеевич
к.б.н., старший научный сотрудник
*Кубанский государственный аграрный
университет, Краснодар, Россия*

Zvyagin Andrey Sergeevich
Cand.Biol.Sci., senior researcher scientists
*Kuban State Agrarian University,
Krasnodar, Russia*

Проведен анализ степени генетического родства или разнообразия между клонами чёрноягодных сортогрупп Каберне-Совиньон и Мерло, и белоягодных популяций Пино и Рислинг. Эти результаты послужили основанием для усовершенствования технологии отбора, размножения и оформления размноженных клонов четырех вышеуказанных популяций в виде сортоклонов для передачи их в гос.испытание: Кабернек, Каберне фанаторийский, Клерет темрюкский, Мерлок, Пинок белый, Рислиналк, Рислинг анапский, Рислинг фанаторийский и др.. Эти сорта-клоны, принятые Госсорткомиссией РФ, несомненно, будут способствовать обогащению виноградного сортимента Анапо-Таманской зоны Кубани, а, значит, и России

The analyze of the genetic relationship or diversity between clones was made by using the microsattellites in the groups with black berries: Cabernet-Sauvignon and Merlot, and with white berries: Riesling and Pinot. These results become the rationale for the new technology of clone selection, breeding and making registration of these clones of four above-named varieties groups in the varieties-clones for state research: Caberneк, Cabernet Fanogoriisky, Merlok, Pinot white, Rieslinalk, Riesling Anapa and Riesling Fanogoriisky. These varieties-clones are accepted by State commission of Russia, they will enrich the viticulture assortment of Anapa-Tamanskay zone of Kuban, therefore Russia

Ключевые слова: ВИНОГРАД, СОРТ, КЛОН, ИЗМЕНЧИВОСТЬ, ПОПУЛЯЦИЯ, ЛИСТ, МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ, МИКРОСАТЕЛЛИТЫ, ДНК-МАРКЕРЫ

Keywords: GRAPE, VARIETY, CLONE, VARIABILITY, POPULATION, LEAVE, MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS, MICROSATELLITIES, DNA-MARKERS

Введение

Генетическая информация играет значительную роль в установлении эффективности работы во всех областях, наиболее востребованной сейчас является информация, полученная с помощью молекулярных маркеров. Они являются превосходным помощником в получении обширного количества генетической информации.

Как известно, при исследовании генетических ресурсов растений с помощью микросателлитных маркеров преследуют разнообразные цели, среди наиболее значимых выделяют следующие.

1. Сохранение растительных генетических ресурсов через описание место нахождения и описания доступного разнообразия.
2. Определение, идентификация, паспортизация и регистрация источников и доноров ценных признаков.

3. Решение спорных вопросов авторства сортов и образцов растений.
4. Определение структуры коллекции и степени родства генотипов для наиболее эффективного подбора родительских пар при гибридизации;
5. Определение, идентификация и регистрация образцов коллекции [7].

Высокий уровень полиморфизма, выявляемый SSR-маркерами, определяет ценность этой маркерной системы и позволяет говорить о возможности ее использования для оценки генетической изменчивости между клонами и сортами винограда, и быстрой и достоверной идентификации сортов.

В данном случае идентификация и паспортизация сортов может выполняться на основании данных об аллельных состояниях использованных маркеров у каждого отдельно взятого генотипа, сорта или клона. Затем данная информация может использоваться для детального описания генотипа.

В настоящее время получение характеристик сортов связано с анализом их по комплексу количественных и качественных морфологических признаков, принятых Международной организацией винограда и вина (окраска цветка и ягоды, форма и тип опушения листовой пластинки, длина побега и др.). Однако полигенное наследование большей части этих признаков затрудняет интерпретацию полученных результатов.

По мнению большинства исследователей, проблема идентификации видов и сортов винограда останется неразрешенной до тех пор, пока не будут применены молекулярно-генетические критерии [9, 20–22, 27–28, 32, 37, 43, 54].

Традиционные методы идентификации сортов и клонов, изучение изменчивости и таксономии винограда, ампелографии и ампелометрии обычно базируются на описании морфологических различий сортов [2, 12, 13, 17]. Однако несколько ограничений накладываются на эти методы.

1. В течение вегетационного периода необходимо использование взрослых неповрежденных листьев.

2. Вызревшие черенки имеют лишь несколько (обычно 4) градаций морфологии.

3. Фенотипы растений очень сильно взаимодействуют с окружающей средой. Различные условия внешней среды могут вызывать морфологические изменения, касающиеся ампелографических признаков, внося свой вклад в ложную идентификацию [35, 48-49].

4. Общее количество сортов винограда в ампелографических коллекциях насчитывается до 42 650, большинство из них является результатом мутационного процесса или рекомбинации, и количество сортов постоянно увеличивается. Если даже сосредоточить все растения в идеальных условиях, будет тяжело дифференцировать все морфологические характеристики [23–24, 46].

5. Использование ампелографических методов требует знания индивидуальных особенностей каждого сорта в отдельности, однако никто не имеет доступа и необходимых знаний о тысячах разных сортов, возделываемых по всему миру, просто из-за того, что не каждая коллекция может содержать полностью все генетические ресурсы своего региона.

Ампелографы обычно знают сорта винограда, которые используются в их регионе, и менее знакомы с сортовым составом в других регионах.

Частично недостатки традиционных методов оценки генотипов компенсируются использованием комплекса ампелографических признаков [13, 18, 52].

Вопросы идентификации генотипов винограда не менее важны и в процессе клоновой селекции. Чрезвычайно сложно дифференцировать генотипы, являющиеся модификантами в изогенной популяции сорта, фенотип которого изменчив в зависимости от влияния внешней среды и результатов взаимодействия генотип-среда. При этом ставится задача выявления генотипических вариаций среди массы фенотипически близких высокопродуктивных растений [16].

Именно развитие ДНК-маркеров позволило изменить такое состояние и дало возможность легко идентифицировать сорта до такой степени, что можно использовать людей без специальной ампелографической подготовки. Результаты не только объективны, но они также не зависят от условий окружающей среды и болезней, присутствующих в растениях. ДНК-маркеры стали одним из полезных средств, позволяющих решать во многих случаях проблемы, связанные с синонимами и неправильным названием [29, 31, 38-39, 44].

По этой причине требуются альтернативные методы сортовой и клоновой идентификации, которые бы лучше иллюстрировали различия на генетическом уровне [1, 5, 17].

Существующая технология по отбору клонов ведется по методике, утвержденной на первом Международном симпозиуме по клоновой селекции (1971, ФРГ), рассчитанной на почти 20–летнее испытание (табл. 1) [15].

Таблица 1 - Схема клоновой селекции винограда

Годы	Мероприятия	Этапы отбора
1	2	3
1 – 2	Изучение признаков и анализ продуктивности у не менее 1 тыс. кустов на винограднике	Первичный отбор
3	Отбор не менее 100 претендентов в клоны	
4 – 5	Размножение, посадка и формирование кустов	
6 – 8	Испытание в одной повторности (10 — 15 кустов) каждого претендента на участке А, отбор 20 претендентов в клоны	Предварительный отбор
9 – 10	Размножение, посадка и формирование кустов	

Продолжение таблицы 1

11 – 13	Испытание в трех-пяти повторностях (по 10 кустов) каждого претендента на участке Б, отбор 10 кандидатов в клоны	Промежуточный отбор
14 – 15	Размножение, посадка и формирование кустов	
16 – 18	Испытание в разных экологических условиях и на разных подвоях (3 – 5 повторностей по 30 кустов в каждой) на участке В, отбор 1– 2 клонов	Главный отбор
19	Представление клона (клонов) на государственное испытание	

Как показало время, генетическое улучшение сорта более результативно и экономически весьма выгодно при использовании этапа "ступенчатого" отбора, с использованием молекулярных маркеров [статья Звягин А.С.].

Вследствие изложенных выше фактов, для исследования генетического разнообразия и составления их ДНК-фингерпринта, были исследованы клоновые популяции сортов Мерло, Каберне-Совиньон (монография), Пино и Рислинг (статья рислинг, автореферат, монография) с использованием 8 нейтральных, т.е. не сцепленных с каким либо геном, ядерных микросателлитных маркеров, отобранных в базе данных как наиболее полиморфные: Greek Vitis Database, <http://www.ncbi.ucl.ac.uk/gvd>.

Цель исследования – проанализировать возможность использования молекулярных маркеров для изучения полиморфизма клонов винограда.

Задачами являлось определить, возможно ли дифференцировать клоны среди исследуемых популяций винограда с помощью микросателлитных маркеров.

Материалы и методы

Объектами исследований являлись:

- две чернаягодные популяции сортов Мерло и Каберне-Совиньон: Мерло-2 № 49 – 10 кустов, Мерло-343 – 43 куста, Мерло-181 – 46 кустов и

Мерло (контроль) – 30 кустов; Каберне-Совиньон-5А – 20 кустов, Каберне-Совиньон-14) – 12 кустов, Каберне-Совиньон-15А – 22 куста, Каберне-Совиньон-15Б – 10 кустов и Каберне-Совиньон (контроль) – 43 куста (Приложение В и Г). Всего было исследовано в учхозе «Кубань» 236 учетных кустов;

- две белоягодные популяции сортов Пино и Рислинг: Пино белый – 35 кустов, Пино белый 31 – 19 кустов, Пино черный – 56 кустов и Пино Белый 32 – 12 кустов; Рислинг Алькадар – 15 кустов, Рислинг Алькадар 34 – 34 куста, Рислинг Алькадар -34А – 16 кустов, Рислинг Алькадар 34Б – 14 кустов, Рислинг 4-9-2 - 6 кустов, Рислинг 9-9-1 - 4. Всего было исследовано в учхозе «Кубань» 211 учетных кустов.

Клоны Мерло-343 и Мерло-181 были завезены из Франции, остальные отобраны профессором Трошиным Л.П. за 30 лет его работы в этом направлении.

Проводилось исследование агробιοлогическιх и технологическιе характеристики исследуемых сортов [5, 14].

Подготовку растительного материала и экстракцию ДНК проводили, используя СТАВ-метод, модифицированный по следующей схеме [42].

Для выделения ДНК использовали листья ранее названных генотипов, которые были собраны с кустов в разных экологических условиях (учхоз «Кубань» Кубанского госагроуниверситета, ООО «Фанагория-Агро» и ЗАО «Победа» Темрюкского района) и помещены в азот при -70°C .

Концентрацию выделенной ДНК определяли спектрофотометрически по стандартной методике, а также методом разведений полученных препаратов с последующим их электрофорезом в 2% агарозном геле, содержащем 1 мкг/мл бромистого этидия и визуализацией в ультрафиолете. При этом исходили из того, что порог чувствительности бромистого этидия в агарозных гелях составляет 10 нг ДНК [40].

В ходе работы по ускоренному процессу отбора была определена возможность отбора клонов винограда в исследуемых популяциях с использованием 8 нейтральных, т.е. не сцепленных с каким либо геном, ядерных микросателлитных маркеров, отобранных в базе данных как наиболее полиморфные: Greek Vitis Database, <http://www.ncbi.ucl.ac.uk/gvd>.

В ходе исследования было выявлено количество в сумме 24 аллеля для групп Мерло и Каберне-Совиньон, 30 аллелей для Пино и Рислинг (ссылки на Пашину работу и мою).

Таблица 1 – Количество аллелей выявленных в группах

Маркер	Молекулярный вес (п.н.)*	Число выявленных аллелей в сортогруппах			
		Мерло	Каберне Совиньон	Пино	Рислинг
VVS2	141-147* 129-155**	3		3	
VVS3	214-222 214-222	2		2	
VrZag62	188-199 185-203	5		5	
VrZag79	242-255 236-260	2		9	
VVMD5	239-257 226-246	5		4	
VVMD7	239-243	3		-	
VVMD27	174-186 173-194	6		3	
Scu10vv	205	-		4	

Примечание: * - для популяций Мерло и Каберне-Совиньон.

** - для популяций Пино и Рислинг

Как видно из таблицы 2, маркеры проявили различный уровень полиморфизма: от двух (локус VVS3) до девяти (локус VrZag79) аллелей на один микросателлитный локус с максимальным полиморфизмом по

маркерам VrZag79, VVMD27, VrZag62 и VVMD5, что свидетельствует о дальнейшем использовании этих маркеров в будущей селекции винограда и определение генетической идентификации клонов. При этом видно, что маркеры показывают относительно одинаковые результаты встречаемости у обеих популяций, за исключением маркера VrZag79 и VVMD27, которые показали различающие по количеству аллелей.

По результатам анализа о наличии аллелей исследовавшихся сортов составлялись их ДНК-паспорта, содержащие информацию о номере микросателлитного маркера и его аллельном состоянии у конкретного генотипа (табл. 1, 2, 3 и 4). Нулевым аллелям принимали наименьший среди исследуемой группы.

Таблица 3 – ДНК-паспорта клонов и сортов группы Каберне-Совиньон, составленные по данным об аллельных комбинациях микросателлитных маркеров

Маркер	*К-С (к)	*К-С-5А	*К-С-15А	*Кабернек	*К-С-217	*К-С-169
Vrzag62	*4	0	0	2	2	2
VVS2	6	6	6	6	6	6
Vvmd27	4	0	0	4	2	6
Vvmd5	6	16	16	18	16	16
Vrzag79	0	0	0	0	0	0
Vvmd7	4	0	4	4	2	2

**Примечание: для каждого генотипа указаны аллели, выявленные по каждому отдельному маркеру.*

В ходе анализа данных ДНК отпечатков группы Каберне-Совиньон (табл. 3) было выявлено, что исследуемые генотипы группы Каберне-Совиньон имеют отличающиеся наборы аллелей: генотип Каберне-Совиньон-5А отличается от контрольного сорта на 22 повтора, клон Каберне-Совиньон-15А – 18 аллелей, Каберне-Совиньон-169 – 16 аллелей, Кабернек – 14 аллелей, Каберне-Совиньон-217 – 14 аллелей.

Таблица 4 – ДНК-паспорта клонов и сортов группы Мерло, составленные по данным об аллельных комбинациях микросателлитных маркеров

Маркер	*М (к)	*М- 14	*М-348	*М-343	*М-181	*М-347	*М-2 № 49	*М- 35
Vrzag62	*2	2	6	8	8	8	8	2
VVS2	2	2	2	2	2	2	2	0
Vvmd27	0	0	2	12	10	10	10	0
Vvmd5	8	6	18	8	6	0	0	0
Vrzag79	0	0	0	4	4	4	0	0
Vvmd7	2	2	0	0	0	2	2	0

**Примечание: для каждого генотипа указаны аллели, выявленные по каждому отдельному маркеру.*

Анализ данных ДНК-отпечатков группы Мерло (табл. 4) показал, что исследуемые формы отличаются от контрольного сорта, при этом клон Мерло-347 – 28 аллелей, Мерло-343 – 24 аллеля, Мерло-2 № 49 – 24 аллеля, Мерло-181 – 24 аллеля, Мерло-348 – 18 аллелей, Мерло-35 – 12 аллелей и Мерло-14 отличается на 2 аллеля.

Таблица 5 – ДНК-паспорта клонов и сортов группы Пино, составленные по данным об аллельных комбинациях микросателлитных маркеров

Маркер	Пино белый (к)	Пино Блан	Пино черный	Пино белый 31	Пино белый 32
VVS2	0	3	6	0	0
Vrzag62	14	17	17	17	19
Vvmd27	0	7	3	0	0
Vvmd5	0	5	5	0	0
Vrzag79	23	18	18	11	0
VVS3	2	0	0	0	0
Scu10	0	2	0	0	0

**Примечание: для каждого генотипа указаны аллели, выявленные по каждому отдельному маркеру.*

Анализ данных ДНК отпечатков группы Пино (табл. 5) показал, что исследуемые нами генотипы группы Пино имеют отличающиеся наборы аллелей: генотип Пино блан отличается от контрольного сорта на 39 аллелей, клон Пино черный – 49 аллелей, Пино белый-31 – 28 аллелей, Пино белый-32 -19 аллелей.

Таблица 6 - ДНК-паспорта клонов и сортов группы Рислинг, составленные по данным об аллельных комбинациях микросателлитных маркеров

Маркер	P-A (к)	P-34	P-34A	PA-34Б	P 4-9-2	P 9-1-1
VVS2	3	3	к*	0	6	0
Vrzag62	17	17	0	17	21	21
Vvmd27	7	0	0	0	7	0
Vvmd5	5	2	8	0	8	0
Vrzag79	16	20	18	7	14	5
VVS3	0	2	0	0	2	0
Scu10	2	6	4	0	4	0

**Примечание: для каждого генотипа указаны аллели, выявленные по каждому отдельному маркеру; К – маркер VVS2 отсутствует у данного генотипа.*

Анализ данных ДНК-отпечатков группы Рислинг (табл. 6) показал, что исследуемые формы отличаются от контрольного сорта, при этом клон Рислинг Алькадар 34- 50 аллелей, Рислинг Алькадар 34А -30 аллелей, Рислинг Алькадар 34Б – 24 аллеля, Рислинг 4-9-2 – 62 аллеля, Рислинг 9-1-1 – 26 аллелей.

В ходе использования ядерных микросателлитных маркеров было выявлено, что они позволяют различать близкородственные генотипы и являются эффективным инструментом при исследовании клонов винограда. Так при рассмотрении ДНК-отпечатков было видно, что исследуемые генотипы чернойгодных популяций Каберне-Совиньон и

белоягодные популяций Пино и Рислинг несмотря на высокую степень генетического родства, имеют отличающиеся наборы аллелей.

Возможность различать генетически близкие сорта на основе полиморфизма микросателлитных маркеров подтверждает перспективность их использования в идентификации клонов винограда. Помимо этого, высокий уровень полиморфизма микросателлитных маркеров позволяет их применять для поиска ложных сортов и клонов при затруднительности проведения этой процедуры по фенотипическим признакам.

Исходя из вышеизложенных фактов, предлагается необходимо применять следующий способ отбора клонов популяций винограда позволяющий сокращать данный процесс до 3-5 лет (табл.7).

Таблица 7 – Процесс отбора клонов

Годы	Мероприятия
1	2
1-3	Отбор высокопродуктивных протоклонов винограда и их молекулярно-генетическое маркирование.
4	Размножение протоклонов <i>in vitro</i> .
5	Оформление лучшего клона-сорта винограда на государственное испытание в Госсорткомиссию РФ.

ВЫВОДЫ

Одним из основных видов отбора винограда является клоновая селекция, направленная на улучшение сортового состава виноградных насаждений. Она является действенным методом повышения урожайности и качества винограда.

По совокупности агробиологических показателей все клоны отличались от контрольных сортов по определенным признакам;

– во второй сортогруппе также все исследуемые клоны отличались от контрольного сорта, например, клон Рислинг Алькадар № 34 50 аллелями, Рислинг Алькадар № 34А - 30, Рислинг Алькадар № 34Б – 24, Рислинг № 4-9-2 – 62, Рислинг анапский 26 аллелями.

На основании данных об аллельных комбинациях выявлено, что каждый из исследуемых генотипов винограда популяций Каберне-Совиньон, Мерло, Пино и Рислинг обладает уникальным, свойственным лишь ему набором аллелей, что свидетельствует о наличии отличий между исследуемыми клонами и о том, что микросателлитные маркеры обладают достаточным уровнем полиморфизма для использования их в клоновой идентификации.

Сорта-клоны винограда Пинок белый (А.с. № 49773), Рислиналк и Рислинг анапский, последовательно созревающие в первой половине сентября, вместе с созданными с нашим участием сортами Мерлок (патент № 4116, А.С. № 9360096) и Кабернек, последовательно созревающие во второй половине сентября, создают нужный для производства конвейер сбора урожая и организуют высокоэффективный ампелоценоз.

Список литературы

1. Барышева И.А., Тулаева М.И., Чисников В.С. Исследование внутрисортовой изменчивости ДНК винограда ПДРФ и ПЦР методами // Цитология и генетика. – 2003. – Т. 37, № 6. – С. 31-38.
2. Биометрическая оценка морфологических признаков популяции Каберне-Совиньон / А.С. Звягин, Л.П. Трошин, П.П. Подваленко, В.И. Вернигоров // Критерии и принципы формирования высокопродуктивного виноградарства. – Анапа, 2007. – С. 201–172.
3. Звягин А.С., Подваленко П.П., Трошин Л.П. Исследование интродуцированных из Крыма клоновых популяций винограда // Труды КубГАУ. – Краснодар, 2009. - № 5 (20). – С. 189-192.
4. Звягин А.С., Трошин Л.П., Подваленко П.П. Использование молекулярно-генетических маркеров для виноградной культуры // Нанобиотехнологии в сельском хозяйстве. – М., 2008. – С. 32-33.
5. Звягин А.С. Изучение полиморфизма чернойгодных популяций винограда: дис. ... канд. биол. наук. Краснодар, 2006. 165 с.
6. Звягин А.С., Трошин Л.П. Паспортизация сортов и клонов винограда молекулярно-генетическим методом // Научное обеспечение агропромышленного комплекса. – Краснодар, 2005. – С. 128–132.

7. Итоги изучения сортов и клонов винограда в разных зонах Краснодарского края / Л.П. Трошин, Д.Е. Хлевный, А.С. Звягин, П.П. Подваленко, Т.И. Гугучкина, А.И. Мисливский // Технологии производства элитного посадочного материала и виноградной продукции, отбора лучших протоклонов. – Краснодар: АлВи-Дизайн, 2005. – С. 96-107.
8. Конарев В.Г. Морфогенез и молекулярно-биологический анализ растений. – Санкт-Петербург: ВИР, 1998. – 370 с.
9. Медведева Н.И., Поливара Н.В., Трошин Л.П. Особенности микроклонального размножения интродуцентов и клонов винограда // Научный журнал КубГАУ. – 2008. – № 40 (6). – 18 с. <http://ej.kubagro.ru/2008/06/>.
10. Остерман Л.А. Методы исследования нуклеиновых кислот. – Москва: Наука, 1981. – 288 с.
11. Перспективы исследования сортотипа Каберне-Совиньон / А.С. Звягин, Л.П. Трошин, П.П. Подваленко, С.В. Копыльцов // Роль молодых ученых в реализации национального проекта “Развитие АПК”. Сборник материалов Международной научно-практической конференции. Часть 1. – М.: ФГОУ ВПО МГАУ, 2007. – С. 35.
12. Подваленко П.П. Исследования полиморфизма популяций винограда Пино и Рислинг для отбора высокопродуктивных сортов: дисс... биол. наук. К., 2009. 153 с.
13. Подваленко П.П., Звягин А.С., Трошин Л.П. Клоновая селекция – современная основа подъема продуктивности виноградников // Научный журнал КубГАУ. – 2009. - № 51 (07). – 25 с. <http://ej.kubagro.ru/2009/07/>.
14. Подваленко П.П., Трошин Л.П., Звягин А.С. Ампелографическое исследование сортогруппы Рислинг // Роль молодых ученых в реализации национального проекта “Развитие АПК”. Сборник материалов Международной научно-практической конференции. Часть 1. – М.: ФГОУ ВПО МГАУ, 2007. – С. 74.
15. Подваленко П.П. Исследования полиморфизма популяций винограда Пино и Рислинг для отбора высокопродуктивных сортов. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Краснодар. – 2009. – С. – 22.
16. Трошин Л.П. Ампелография и селекция винограда. – Краснодар: РИЦ «Вольные мастера», 1999. – 138 с.: цв. вкладка.
17. Трошин Л.П. Биометрическая оценка полиморфизма сортогрупп винограда Пино и Рислинг по морфологическим признакам листьев среднего яруса кроны / Л.П. Трошин, Е.В. Луценко, П.П. Подваленко, А.С. Звягин // Научный журнал КубГАУ. – 2009. - № 52 (08). – 14 с. <http://ej.kubagro.ru/2009/08/>.
18. Трошин Л.П., Звягин А.С., Подваленко П.П. Анализ генетического разнообразия клонов сортогрупп Пино и Рислинг с использованием микросателлитных маркеров // Материалы XVIII Международного научного симпозиума «Нетрадиционное растениеводство. Селекция и генетика. Эниология. Экология и здоровье». 17-26 сентября 2009 г. – Симферополь, 2009. – С. 308-313.
19. Трошин Л.П., Звягин А.С., Подваленко П.П. Проблемы идентификации винограда // Виноделие и виноградарство. – 2008. - № 1. - С. 34-35.
20. Трошин Л.П., Рисованная В.И., Полулях А.И. Ампелографические признаки в изучении таксономических отношений сортов *Vitis vinifera sativa pontica* Negr. // Труды Научного центра виноградарства и виноделия. – 1999. – С. 10-12.
21. Трошин Л.П., Цурканенко Н.Г. Новые технические сорта винограда // Садоводство и виноградарство. – 2007. – № 4. – С. 24-25. 19. Энциклопедия виноградарства. – Кишинев: МСЭ, 1986-1987. – Т. 1-3. 7

22. Alleveldt G., Dettweiler E. A model to differentiate grapevine cultivars with the aid of morphological characteristics // *Rivista di Viticoltura e di Enologia*. – 1989. – V. 1. – P. 59-63.
23. Alleveldt G., Dettweiler E. The genetic resources of *Vitis*. – Siebeldingen / FRG, 1994. – 74 s.
24. Alleveldt G., Spiegel-Roy P. and Reisch B. Grapes (*Vitis*). In: Moore J. N. and J. R. Ballington (Eds.): *Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops* // *Acta Hort.* – 1990. – V. 290. – P. 291-337.
25. Bellin D., Velasco R. and Grando M. S. Intravarietal DNA polymorphisms in grapevine (*Vitis vinifera* L.) // *Acta horticulturae*. – 2001. – V. 546. – P. 343-349.
26. Botta R., Scott N.S., Eynard I., Thomas M.R. Evaluation of microsatellite sequence-tagged site markers for characterizing *Vitis vinifera* cultivars // *Vitis*. – 1995. – V. 34. – P. 99-102.
27. Bowers J.E., Dangl G.S. and Meredith C.P. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape // *Am. J. Enol. Vitic.* – 1999. – V. 50, № 30. – P. 243-246.
28. Bowers J.E., Dangl G.S., Vignani R. and Meredith C.P. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.) // *Genome*. – 1996. – V. 39. – P. 628-633.
29. Fatahi R., Ebadi A., Bassil N., Mehlenbacher S.A. and Zamani Z. Characterization of Iranian grapevine cultivars using microsatellite markers // *Vitis*. – 2003. – V. 42, № 4. – P. 185-192.
30. Filippetti I., Intriери C., Ceminari M., Bucchetti B. and Pastore C. Molecular characterization of officially registered Sangiovese clones and of other Sangiovese-like biotypes in Tuscany, Corsica and Emilia-Romagna // *Vitis*. – 2005. – V. 44, № 4. – P. 167-172.
31. Francois L., Marianna M., Gorislavets S.S, Risovannaya V. and Troshin L. Genetic profiling of Moldavian, Crimean and Russian cultivars of *Vitis Vinifera* L. with nuclear microsatellite markers // Тезисы IV международной конференции. – 2003. – С. 25.
32. Gonzalez A., Jubany S., Ponce I. De Leon., Dellacassa E., Carrau F.M., Hinrichsen P. and Gaggero C.A. Molecular diversity within clones of cv. Tannat (*Vitis vinifera*) // *Vitis*. – 2004. – V. 43, № 4. – P. 179-185. 31. <http://www.drmed.rus/s.php/377> html.
33. Karp A., Ingram. D.S. and Isaac P. *Molecular Tools for Screening Biodiversity* // Chapman and Hall. – 1998. – P. 195-201.
34. Lamboy W.F. and Alpha C.G. Using simple sequence repeats (SSRs) for DNA fingerprinting germplasm accessions of grape (*Vitis* L.) species // *J. Am. Soc. Hort. Sci.* – 1998. – V. 123. – P. 182-188.
35. Lefort F. and Roubelakis-Angelakis K.A. Genetic Comparison of Greek Cultivars of *Vitis vinifera* L. by Nuclear Microsatellite Profiling // *Am. J. Enol. Vitic.* – 2001. – V. 52, № 2. – P. 101-108.
36. Lefort F., Risovannaya V., Gorislavets S., Massa V. and Troshin L. Genetic profiling of Moldavian, Crimean and Russian cultivars of *Vitis Vinifera* with nuclear microsatellite markers // Геном растений. Сборник тезисов IV Международной конференцию. – Одесса, 2003. – С. 25.
37. Lopes M.S., Sefc K.M., Eiras D.E., Steinkellner H., Laimer da Свмара Machado M. and A. da Свмара Machado. The use of microsatellites for germplasm management in a Portuguese grapevine collection // *Theor. Appl. Genet.* – 1999. – V. 99. – P. 733-799.
38. Maletic E., Sefc K.M., Steinkellner H., Kontic J.K. and Pejic I. Genetic characterization of Croatian grapevine cultivars and detection of synonymous cultivars in neighboring region // *Vitis*. – 1999. – V. 38. – P. 79-83.

39. Meredith C.P., Bowers J.E., Riaz S., Handley V., Bandman E.B. and Dangl G.S. The identity and parentage of the variety known in California as 'Petite Sirah' // *Amer. J. Enol. Vitic.* – 1999. – V. 50. – P. 236-242.
40. Moncada X., Munoz L., Merdinoglu D., Castro M.H. and Hinrichsen P. Clonal polymorphism in the red wine cultivars "Carmenere" and "Cabernet Sauvignon" // *ISHS Acta Horticulture: VII International Symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology.* – 2003.
41. Murray M.G. and Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // *Nucleic Acids Research.* – 1980. – V. 10. – P. 4321-4325.
42. Nunez Y., Fresno J. and Gallego F.J. Practical use of microsatellite markers to manage *Vitis vinifera* germplasm: Molecular identification of grapevine samples collected blindly in D.O. El Bierzo (Spain) // *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology.* – 2004. – V. 79, № 3. – P. 437- 440.
43. Patrick P. and Jean B. Molecular genetic diversity of the French-American grapevine hybrids cultivated in North America // *Genome/Genome.* – 2003. – V. 46, № 6. – P. 1037-1048.
44. Perret M., Arnold C., Gobat J.-M. and Kupfer P. Cultivated grapevines (*Vitis vinifera* L.) in central Europe based on microsatellite markers // In: *Proceedings of VII International symposium on Grapevine Genetics and Breeding.* – 2001. – V. 531. – P. 155-159.
45. Regner F., Sefc K., Stadlbauer A. and Steinkellner H. Genetic markers for the identification of varieties and clones as a guarantee of quality // *Acta Hortic.* – 1998. – V. 473. – P. 49-61.
46. Regner F., Stadlbauer A. and Eisenheld C. Molecular markers for genotyping grapevine and for identifying clones of traditional varieties // *ISHS Acta Horticulturae.* – 2000. – I.N. 546.
47. Sefc K.M., Regner F., Tureschek E., Glossl J. and Steinkellner. H. Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their application for genotyping of different *Vitis* species // *Genome.* – 1999. – V. 42. – P. 367-373.
48. Sefc K.M., Regner F., Tureschek E., Glossl J. and Steinkellner. H. Genotyping of grapevine and rootstock cultivars using microsatellite markers // *Vitis.* – 1998. – V. 37. – P. 15-20.
49. Smurygin A.S., Nosulchak V.A., Troshin L.P. Creation of the Russian ampelographic collection // *Report of a Working Group on Vitis.* – Bioversity International, 2008. – P. 95-96.
50. Thomas M.R. and Scott N.S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphism when analysed as sequence-tagged sites (STSs) // *Theor. Appl. Genet.* – 1993. – V. 86. – P. 985-990.
51. Thomas M.R., Matsumoto S., Cain P. and Scott N.S. Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification // *Theor. Appl. Genet.* – 1993. – V. 86. – P. 173-180.
52. Troshin L., Nosulchak V., Smurygin A. National ampelographic collection of Russia: creation and use // *Plant Genetic Resources and their Exploitation in the Plant breeding for Food and Agriculture. 18th EUCARPIA Genetic Resources Section Meeting.* – Piestany, Slovak Republic. 23-26 May 2007. – P. 108.
53. Troshin L.P., Zvyagin A. Clone identification of four grapevine varieties // *9th International Conference on Grape Genetics and Breeding, 2-6 July 2006.* – Udine / Italy. – P. 38.