

ДНК-маркирование в контроле происхождения

УДК 634.8:575.174.015.3:577.21

doi: 10.15389/agrobiology.2016.1.60rus

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО СХОДСТВА ДОНСКИХ АБОРИГЕННЫХ СОРТОВ ВИНОГРАДА С ПРИМЕНЕНИЕМ SSR-АНАЛИЗА И ПО ОСНОВНЫМ АМПЕЛОГРАФИЧЕСКИМ ПРИЗНАКАМ ЛИСТА***Е.Т. ИЛЬНИЦКАЯ¹, С.В. ТОКМАКОВ¹, И.И. СУПРУН¹, Л.Г. НАУМОВА²,
В.А. ГАНИЧ²**

Аборигенные, стародавние сорта, произрастающие в различных регионах возделывания винограда, — важная часть мирового генофонда культуры. Многие аборигенные донские сорта винограда (*Vitis vinifera* L.) представляют значительную ценность для возделывания и использования в селекционной работе. Среди сортов Дона выделяют как близкие по основным признакам группы, так и более отдаленные. Основные признаки листьев сортов винограда — важнейший ампелографический признак. Исследования ДНК — наиболее информативный метод анализа генотипов растений. Микросателлитные маркеры широко используются для генотипирования сортов и подвоев винограда, а также успешно применяются при изучении происхождения сортов и анализа их родословных. Мы провели оценку родства ряда донских сортов по результатам микросателлитного генотипирования. Целью настоящей работы было изучение генетического сходства аборигенных донских сортов на основе ДНК-анализа и сопоставление полученных результатов с данными анализа основных признаков сформировавшегося листа, а также выводами других авторов. Исследования проводили на 16 сортах, произрастающих в коллекции Всероссийского НИИ виноградарства и виноделия им. Я.И. Потапенко (г. Новочеркасск) и в Российской ампелографической коллекции (г. Анапа). Все изученные сорта были описаны по основным ампелографическим признакам. В работе применяли полимеразную цепную реакцию с разделением ее продуктов посредством электрофореза. ДНК выделяли из молодых листьев апикальной части побегов 4–5 типичных кустов сорта. Использовали шесть SSR-маркеров, рекомендованных как основные для фингерпринтинга *V. vinifera*. Контролем служили сорта Шардоне и Каберне-Совиньон, аллельный состав которых по изучаемым SSR-локусам известен. Матрицу генетических дистанций строили с использованием коэффициентов (индексов) подобия по М. Nei и W. Li. Кластерный анализ на основании данных SSR-генотипирования выполняли методом попарного невзвешенного кластерирования с арифметическим усреднением (UPGMA). Проводили графическое построение дендрограмм. Данные по морфологическим признакам листьев и результаты SSR-генотипирования анализировали методом главных координат (PCA). С помощью автоматического генетического анализатора ABI Prism 3130 («Applied Biosystems», США) были получены ДНК-профили местных донских сортов винограда по микросателлитным локусам VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 и VrZAG79. В генотипах исследуемых донских сортов было определено шесть (по локусам VVS2, VVMD5, VVMD7, VrZAG62) и семь (по локусам VVMD27, VrZAG79) аллелей на локус. Кластерный анализ позволил разделить сорта на две основные ветви: в одну вошли Сибирьковский, Пухляковский белый, Сиволистый, Пухляковский черный, Косоротовский и Кукановский (все они относятся к группе естественных сеянцев Пухляковского белого), в другой оказались Безымянный донской, Плечистик обоепольный, Старый горюн, Цимлянский белый, Цимлянский черный, Цимладар, Плечистик, Сыпун черный, Махроватчик и Бессергеновский № 7. Интересно, что во второй ветви выделились три подгруппы. Одна включала сорта Безымянный донской, Плечистик обоепольный, Цимлянский белый, Цимлянский черный, Цимладар, Плечистик, Сыпун черный (группа цимлянских сортов), в другую вошли Бессергеновский № 7 (предположительно сеянец Пухляковского белого) и Старый горюн (группа цимлянских сортов); отдельно выделился сорт Махроватчик (считается сеянцем сорта Кокур белый). В пространстве главных координат нами не было обнаружено распределения сортов по основным признакам листьев в соответствии с их предполагаемым происхождением. По результатам SSR-анализа большинство сортов оказались распределены в соответствии с ранее сделанными выводами об их происхождении. Таким образом, наиболее информативной может считаться оценка коллекций, стародавних сортов, селекционного материала и интродуцируемых образцов по комплексу ампелографических признаков и SSR-маркерам.

Ключевые слова: аборигенный генофонд, SSR-маркеры, ампелографические признаки листа, *Vitis vinifera* L., донские сорта винограда, генетическое сходство.

* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Администрации Краснодарского края (грант № 13-04-96541p_юг_a).

Аборигенные, стародавние сорта из различных регионов возделывания винограда, как и дикие формы, — наиболее ценная часть мирового генофонда культуры *Vitis vinifera* L. Именно автохтонные сорта, многие из которых не имеют даже локального распространения, могут быть безвозвратно утеряны. Их генотипы содержат редкие аллели и характеризуются уникальными адаптивными свойствами к конкретным зонам виноградарства. По этой причине изучению аборигенного генофонда уделяется особое внимание во всех производящих виноград странах (1-6).

История виноградарства на Дону насчитывает несколько веков. Местные сорта винограда многообразны и специфичны. Многие из них представляют значительную ценность и для возделывания в благоприятных условиях правобережья Дона, и для селекционной работы (7). Единственного мнения о происхождении донских сортов винограда нет, однако чисто местные названия и общность признаков свидетельствуют об их давности. На местное происхождение большинства донских аборигенных сортов указывает и формирование в разных микрорайонах виноградарства групп сортов, близких по основным морфологическим признакам.

На основании сходства признаков (листьев и формы ягод) было установлено, что сорта Косоротовский, Сибирьковский, Пухляковский черный, Ольховский, Сиволистный, Бессергеновский № 7 — естественные сеянцы сорта Пухляковский белый (7). А.И. Потапенко считает, что сорт Пухляковский белый появился на Дону в начале XIX века (8). А.М. Алиев, напротив, утверждает, что большая группа сортов винограда не могла возникнуть и распространиться за такой короткий период (9). По его мнению, Пухляковский белый был известен на Дону значительно раньше и относится к аборигенным донским сортам. Группа сортов, близких к Пухляковскому белому, — не единственная. Выделяют и более многочисленную группу так называемых цимлянских сортов, сходных по морфологическим признакам.

При установлении происхождения сортов винограда народной селекции немаловажное значение имеют методы их идентификации. Исследования показали результативность использования унифицированной системы описания сортов винограда, разработанной Международной организацией винограда и вина (Office International de la vigne et du vin, OIV, Париж, Франция) (10). Эта система облегчает оценку близости признаков и тем самым помогает подтвердить или опровергнуть предполагаемое происхождение сорта. Наибольшую ценность имеют основные признаки листьев, при формировании которых практически исключено воздействие искусственного отбора (7). В зависимости от длины побега и условий произрастания величина и форма листьев различаются в пределах одного и того же сорта, однако эти параметры остаются надежным ампелографическим признаком.

Исследования ДНК — наиболее информативный метод анализа генотипов растений. ДНК-профили дополняют традиционное описание и агробиологические характеристики сортов, позволяя точно идентифицировать сорта, изучать их происхождение, выявлять синонимы и примеси в коллекциях. В работах по изучению генетического разнообразия и идентификации сортов чаще всего используют маркерные системы, основанные на вариабельности микросателлитных участков ДНК.

Микросателлиты (simple sequence repeats, SSR) — tandemные повторы простых последовательностей в структуре ДНК. Источник их полиморфизма — сайт-специфическое варьирование длины повтора, обусловленное различием в числе его единиц (11). Микросателлитные последова-

тельности распространены повсеместно в геноме высших растений. Для SSR-маркеров характерны кодоминантный тип наследования, высокая дифференцирующая способность и воспроизводимость результатов. Микросателлитные маркеры широко используются для генотипирования сортов и подвоев винограда (12-16), а также успешно применяются при изучении происхождения сортов и анализа их родословных (17-22). На основании работ по фингерпринтингу сортов винограда, проведенных в различных лабораториях, сформирован основной стандартный набор SSR-маркеров для генотипирования *Vitis vinifera* (23).

В настоящей работе мы впервые провели оценку родства аборигенных донских сортов винограда, преимущественно из групп цимлянских сортов и сеянцев Пухляковского белого, на основе анализа ДНК.

Целью нашей работы было изучение генетического сходства донских сортов по данным анализа полиморфизма микросателлитных локусов и сопоставление полученных результатов с выводами других авторов о происхождении сортов, а также с данными анализа основных признаков сформировавшегося листа.

Методика. Исследования проводили на выборке аборигенных донских сортов винограда — Безьямный донской, Бессергеновский № 7, Косоротовский, Кукановский, Махроватчик, Плечистик, Плечистик обоепольный, Пухляковский белый, Пухляковский черный, Сибирьковский, Сиволистный, Старый горюн, Сыпун черный, Цимладар, Цимлянский белый, Цимлянский черный, произрастающих в коллекции Всероссийского НИИ виноградарства и виноделия им. Я.И. Потапенко (г. Новочеркасск) и в Российской ампелографической коллекции (г. Анапа). Контрольными сортами служили Шардоне и Каберне-Совиньон, аллельный состав которых по изучаемым SSR-локусам известен (23). Все сорта были описаны по основным ампелографическим признакам сформировавшегося листа согласно методике проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность, предложенной для винограда (9).

Основным методом, применяемым в работе, была полимеразная цепная реакция (ПЦР). Разделение продуктов ПЦР осуществляли посредством электрофореза как в 2 % агарозном геле (при оптимизации параметров ПЦР), так и методом капиллярного электрофореза с использованием автоматического генетического анализатора ABI Prism 3130 («Applied Biosystems», США) при выполнении SSR-фингерпринтинга генотипов.

В исследовании были использованы SSR-маркеры VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 и VrZAG79, рекомендованные для молекулярно-генетической паспортизации генотипов *Vitis vinifera* Европейской базой данных и проектом GrapeGen06 (23). ДНК выделяли из молодых листьев апикальной части побегов 4-5 типичных кустов сорта СТАВ-методом (с использованием бромистого цетилтриметиламмония) (24). Состав ПЦР-смеси формировали согласно стандартному протоколу, реакцию проводили по стандартным параметрам, экспериментально подобрав температуры отжига праймерных пар (25). Размеры амплифицированных фрагментов определяли на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 3130. Результаты обрабатывали в программе Gene Mapper 4.1.

Матрицу генетических дистанций строили с использованием коэффициентов (индексов) подобия по M. Nei и W. Li (26). Кластерный анализ выполняли методом попарного невзвешенного кластирования с арифметическим усреднением (UPGMA) с использованием FreeTreeApplication 0.9.1.50 (ZDATv.o.s.). Графическое построение дендрограмм проводили в программе TreeView (Win32) 1.6.6.

Данные по морфологическим признакам листьев, а также результаты SSR-генотипирования анализировали с помощью метода главных координат (PCA). Расчеты осуществляли в программе PAST v. 2.17c.

Результаты. Изученная выборка была представлена в основном сортами винограда, относящимися к двум группам, ранее выделенным учеными-ампелографами, — группе цимлянских сортов и группе естественных сеянцев сорта Пухляковский белый.

Для снижения себестоимости анализов после апробации SSR-маркеров и подбора оптимальных параметров ПЦП были сформированы наборы для мультиплексного анализа. SSR-маркеры объединяли с учетом диапазона размеров амплифицируемых фрагментов по каждому локусу и температур отжига праймерных пар, используя в одном наборе два флуоресцентных красителя из четырех (FAM, R6g, Rox или Tamra). Генотипирование сортов проводили следующими маркерными парами: VVS2 + VVMD7; VVMD27 + VVMD5; VrZAG62 + VrZAG79.

По результатам анализа полиморфизма микросателлитных локусов каждый сорт показал ДНК-профиль, отличный от других образцов. По изучаемым SSR-локусам в выборке донских сортов винограда было определено шесть (по локусам VVS2, VVMD5, VVMD7, VrZAG62) и семь (по локусам VVMD27, VrZAG79) аллелей на локус.

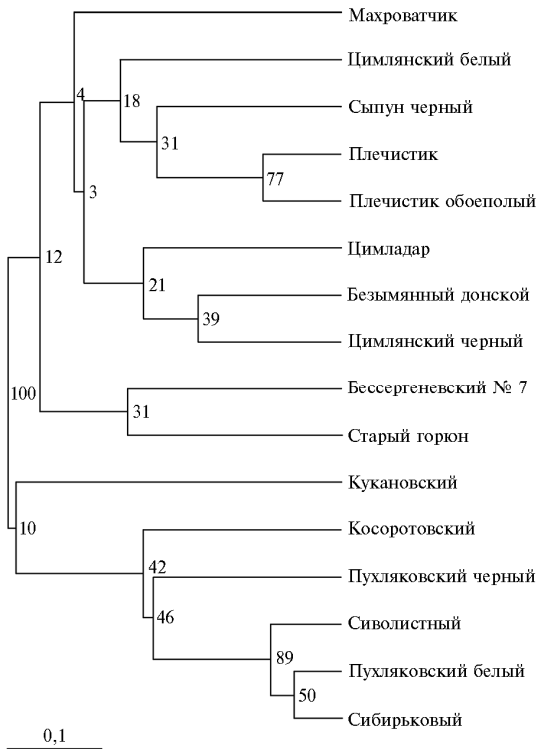


Рис. 1. Дендрограмма генетического сходства между изученными донскими сортами винограда (*Vitis vinifera* L.) на основе данных SSR-анализа (коллекция Всероссийского НИИ виноградарства и виноделия им. Я.И. Потопенко, Российская ампелографическая коллекция).

но говорить о генетическом сходстве сортов Безымянный донской, Плечистик обоеполый, Цимлянский белый, Цимлянский черный, Цимладар, Плечистик, Сыпун черный. Сорта Плечистик и Плечистик обоеполый

Кластерный анализ на основе данных фингерпринтинга по микросателлитным локусам позволил разделить сорта на две основные ветви (рис. 1). В одну ветвь вошли сорта Сибирьковый, Пухляковский белый, Сиволистный, Пухляковский черный, Косоротовский и Кукановский. Все они обладали генетическим сходством, что подтверждает предположение об их происхождении от сорта Пухляковский белый, причем наиболее близкими по результатам микросателлитного анализа оказались сорта Сибирьковый, Пухляковский белый и Сиволистный.

Во вторую ветвь вошли следующие сорта: Безымянный донской, Плечистик обоеполый, Старый горюн, Цимлянский белый, Цимлянский черный, Цимладар, Плечистик, Сыпун черный, Махроватчик и Бессергеновский № 7. Интересно, что в этой ветви выделились три подгруппы. В так называемой подгруппе цимлянских сортов мож-

оказались наиболее генетически близки. Сорт Махроватчик показал сходство с группой цимлянских сортов. Сорта Бессергеновский № 7 и Старый горюн были ближе друг к другу, чем к другим предположительно родственными им сортам, однако оба они по результатам микросателлитного анализа оказались ближе к цимлянской группе. Если учитывать, что по ампелографическим признакам сорт Бессергеновский № 7 считают сеянцем Пухляковского белого, то можно предположить, что другим его родителем был сорт из группы цимлянских сортов или близкий им.

Более точные выводы могут быть сделаны при увеличении числа анализируемых SSR-локусов. Однако даже используемый в работе набор микросателлитных маркеров позволил получить результаты, сопоставимые с заключениями других ученых.

Основные ампелографические признаки листьев у аборигенных донских сортов винограда (*Vitis vinifera* L.) (коллекция Всероссийского НИИ виноградарства и виноделия им. Я.И. Потапенко, Российская ампелографическая коллекция)

Сорт	Код признака											
	080	077-1	077-2	078-1	078-2	068	067	065	082	079	084	093
	Естественные сеянцы сорта						Пухляковский белый					
Пухляковский белый	3	5	3	5	3	3	4	5	2, 3	5	5	3, 2
Косоротовский	5	3	3	5	5	3	3	5, 7	2	5, 8	7	4
Сиволистый	3	5	5	5	5	3	3, 4	5, 7	2, 3	5, 6	5	2
Пухляковский черный	3	3	3	5	3	3	4	5, 7	2, 3	5, 8	3	2
Бессергеновский № 7	3	3	3	5	5	2, 3	4	7	1	6	5	3
Кукановский	5	5	3	5	3	3	4	5	2, 3	3, 5	3, 5	2
Сибирьковский	7	5	5	5	5	3	4	5, 7	2	5	5	2, 3
	Группа цимлянских сортов											
Безмянный донской	3	5	3	5	5	3	4	5	2, 3	5, 8	7	2
Плечистик обоеполый	3	3	3	7	7	3	4	5, 7	2	5, 6	7	2
Старый горюн	3	7	3	7	5	3	3	7	2	5	7	2
Цимлянский белый	3	5	3	7	5	3	4	5, 7	2	5, 8	3, 5	3, 4
Цимлянский черный	3	3	3	5	5	3	4	7	2	5	7	4
Цимладар	7	7	5	5	5	3	4	5	3, 4	8	5, 7	2
Плечистик	7, 9	5	5	5	5	3	4	7	2	5	7	2, 3
Сыпун черный	7, 9	5	3	5	5	3	4	5, 7	2	5	5	3
	Сеянец сорта						Кокур белый					
Махроватчик	9	7	5	7	7	3	4	5, 7	2, 4	5, 6	7	2

Примечание. 080 — глубина верхних боковых вырезок, 077-1 — длина верхушечного зубчика, 077-2 — длина бокового зубчика, 078-1 — отношение длины верхушечного зубчика к его ширине, 078-2 — отношение длины бокового зубчика к его ширине, 068 — число лопастей, 067 — форма пластинки, 065 — размер пластинки, 082 — расположение лопастей верхних боковых вырезок, 079 — расположение лопастей черешковой выемки, 084 — паутинистое опушение между главными жилками на нижней стороне пластинки, 093 — длина черешка по отношению к длине средней жилки. Цифры в таблице означают степень выраженности признака (10).

Основные ампелографические признаки сформировавшегося листа для каждого сорта были описаны нами по системе индексов в соответствии с методикой, принятой Международной организацией винограда и вина (табл.). Анализ полученных данных по основным признакам листьев проводили методом главных координат. Нами не было обнаружено закономерностей, соответствующих предполагаемому происхождению сортов или результатам SSR-анализа: область распределения сортов из группы сеянцев Пухляковского белого значительно перекрывалась с областью распределения сортов цимлянской группы (рис. 2, А).

В то же время по результатам SSR-анализа большинство сортов оказались распределены в пространстве главных координат в соответствии

с ранее сделанными выводами об их происхождении (см. рис. 2, Б). Выделенные области I и II соответствовали кластерам, полученным при UPGMA кластеризации.

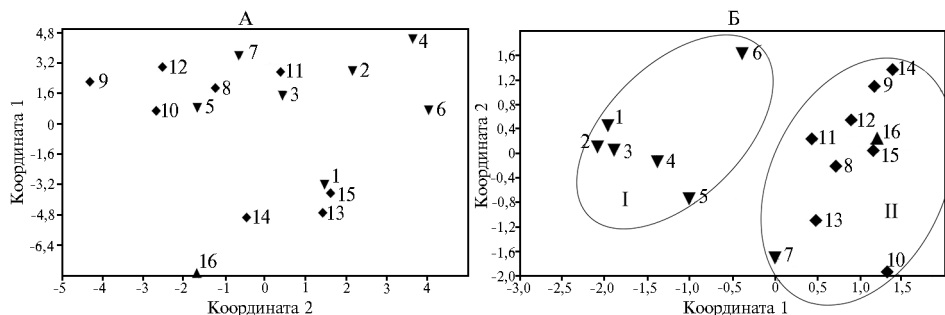


Рис. 2. Распределение изученных донских сортов винограда (*Vitis vinifera* L.) в пространстве главных координат по результатам оценки признаков листовой пластинки (А) и SSR-анализа (Б): 1 — Сибирьковский, 2 — Пухляковский белый, 3 — Сиволиственный, 4 — Пухляковский черный, 5 — Косоротовский, 6 — Кукановский, 7 — Бессергеновский № 7 (естественные сеянцы сорта Пухляковский белый); 8 — Безымянный донской, 9 — Плечистик обоеполый, 10 — Старый горюн, 11 — Цимлянский белый, 12 — Цимлянский черный, 13 — Цимладар, 14 — Плечистик, 15 — Сыпун черный (группа цимлянских сортов); 16 — Махроватчик (сеянец сорта Кокур белый); I и II — кластеры, полученные методом UPGMA (коллекция Всероссийского НИИ виноградарства и виноделия им. Я.И. Потапенко, Российская ампелографическая коллекция).

Таким образом, основные признаки сформировавшегося листа недостаточны для оценки родства тех или иных генотипов винограда. Применение микросателлитных маркеров для этих целей более эффективно. ДНК-маркеры позволяют за достаточно короткий период времени сделать выводы о генетическом сходстве образцов, подтвердить или опровергнуть информацию о происхождении. То есть наиболее информативной может считаться оценка коллекций, стародавних сортов, селекционного материала и интродуцируемых образцов по комплексу ампелографических признаков и SSR-маркерам.

¹ФГБНУ Северо-Кавказский зональный НИИ садоводства и виноградарства,
350901 Россия, г. Краснодар, ул. 40 лет Победы, 39,
e-mail: ilnitskaya79@mail.ru, supruni@mail.ru, ad-a-m@mail.ru;
²ФГБНУ Всероссийский НИИ виноградарства и виноделия им. Я.И. Потапенко,
346421 Россия, Ростовская обл., г. Новочеркасск,
пр. Баклановский, 166,
e-mail: LGnaumova@yandex.ru

Поступила в редакцию
9 сентября 2015 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2016, V. 51, № 1, pp. 60-67

GENETIC SIMILARITY OF THE AUTOCHTHONOUS GRAPEVINE VARIETIES FROM DON REGION REVEALED BY SSR-ANALYSIS AND MAIN LEAF AMPELOGRAPHIC TRAITS

E.T. Il'nitskaya¹, S.V. Tokmakov¹, I.I. Suprun¹, L.G. Naumova², V.A. Ganich²

¹North-Caucasian Zonal Research Institute of Orchard and Viticulture, Federal Agency of Scientific Organizations, 39, ul. Pobedy, Krasnodar, 350901 Russia, e-mail ilnitskaya79@mail.ru, supruni@mail.ru, ad-a-m@mail.ru;

²Ya.I. Potapenko All-Russian Research Institute of Viticulture and Winemaking, Federal Agency of Scientific Organizations, 166, pr. Baklanovskii, Novochechassk, Rostov Province, 346421 Russia, e-mail LGnaumova@yandex.ru

Acknowledgements:

Supported by Russian Foundation for Basic Research and Administration of Krasnodar Krai (grant № 13-04-96541r_yug_a)

Received September 9, 2015

doi: 10.15389/agrobiol.2016.1.60eng

Abstract

Native, ancient grape varieties of different cultivation regions are important part of grapevine genetic resources. Many native Don grape varieties represent a significant value for cultivation and use in breeding. The close varieties and more distant groups are distinguished on the main characteristics among the varieties of Don. The main features of the leaves of grape varieties are the key ampelographical characteristics. Currently, the study at the DNA level is considered the most informative method of plant genotyping analysis. Microsatellite markers are widely used for genotyping of grapevine varieties and rootstocks, and successfully applied in the study of the origin of varieties and the analysis of their pedigrees. We evaluated the relationship among the number of Don varieties by microsatellite genotyping. The aim was to study the genetic similarity of native Don varieties based on DNA analysis and compare the results with earlier made conclusions about relationship of varieties, and with data of the analysis of the main features of the leaves. The research was carried out on 16 varieties from the collection of the All-Russian Scientific Research Institute of Viticulture and Winemaking (Novocherkassk) and the Russian ampelographic collection (Anapa). Studied Don grapevine varieties were described ampelographically, and the main method we used in the work was the PCR. Six SSR-markers basically recommended for *V. vinifera* fingerprinting were used. DNA was extracted from young leaves of the apical shoots of 4-5 typical bushes. Chardonnay and Cabernet Sauvignon were used as the reference cultivars. Genetic distance matrix was constructed using the coefficients (indices) similarity of M. Nei and W. Li. Based on the data of SSR-genotyping, estimation of the genetic similarity of studied varieties was performed using cluster analysis (UPGMA), and dendrograms were graphically constructed. Data on the morphological characteristics of leaves and SSR-genotyping results were analyzed by means of principal coordinates (PCA). DNA profiles of 16 local Don grapevine varieties were obtained using microsatellite loci VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVS2, VrZAG62 and VrZAG79 with an automated genetic analyzer ABI Prism3130 («Applied Biosystems», USA). In the studied Don varieties genotypes, six (for VVS2, VVMD5, VMD7, VrZAG62) and seven (for VVMD27, VrZAG79) alleles per locus were determined. Cluster analysis allowed to divide the varieties into two main groups: one included Sibir'kovyi, Puhlyakovskii belyi, Sivolistnyi, Puhlyakovskii chernyi, Kosorotovskii and Kukanovskii cultivar, being a group of natural seedlings of Puhlyakovskii belyi, the other contained Bezmyannyi Donskoi, Plechistik oboepolyi, Saryi Goryun, Tsimlyanskii belyi, Tsimlyanskii chernyi, Tsimladar, Plechistik, Syun chernyi, Mahrovatchik and Bessergenevskii № 7 cultivars. Interestingly, the second cluster had three subgroups. One includes varieties Bezmyannyi Donskoi, Plechistik oboepolyi, Tsimlyanskii belyi, Tsimlyanskii chernyi, Tsimladar, Plechistik, Syun chernyi of the Tsimlyanskii group. The other contained Bessergenevskii № 7 cultivar being presumably a seedling of Puhlyakovskii belyi, and Sary Goryun of the Tsimlyanskii group. Variety Mahrovatchik (considered to be a seedling of Kokur white variety) was grouped separately. Analysis of the main features of leaves showed no differentiation according to the presumed origin of the studied varieties. As the result of SSR-analysis, most of varieties were distributed in accordance with the earlier made conclusions about their origin. Thus, the study of collections, old varieties, breeding material and introduced samples based on the complex of ampelographic traits and SSR-markers can be considered as the most informative one.

Keywords: native gene pool, SSR-markers, ampelographic leaf traits, *Vitis vinifera* L., Don grape varieties, the genetic similarity.

REFERENCES

1. Dzhambazova T., Tsvetkov I., Atanassov I., Rusanov K., Martinez-Zapater J.M., Atanassov A., Hvarleva T. Genetic diversity in native Bulgarian grapevine germplasm (*Vitis vinifera* L.) based on nuclear and chloroplast microsatellite polymorphisms. *Vitis*, 2009, 48(3): 115-121.
2. Stajneri N., Korosec-Korusa Z., Rusjan D., Javornic B. Microsatellite genotyping of old Slovenian grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.) of the Primorje (coastal) winegrowing region. *Vitis*, 2008, 47(4): 201-204.
3. Cipriani G., Marrazzo M.T., Peterlunger E. Molecular characterization of the autochthonous grape cultivars of the region Friuli Venezia Giulia-North-Eastern Italy. *Vitis*, 2010, 49: 29-38.
4. Doulati-Baneh H., Mohammadi S.A., Labra M. Genetic structure and diversity analysis in *Vitis vinifera* L. cultivars from Iran using SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 2013, 160: 29-36 (doi: 10.1016/j.scienta.2013.05.029).
5. Martinez L.E., Cavagnaro P.F., Masuelli R.W., Zuniga M. SSR-based assessment of genetic diversity in South American *Vitis vinifera* varieties. *Plant Sci.*, 2006, 170: 1036-1044 (doi: 10.1016/j.plantsci.2005.12.006).
6. Vouillamoz J.F., McGovern P.E., Ergul A., Söylemezoglu G., Tevzadze G., Meredith C.P., Grando M.S. Genetic characterization and relationships of traditional grape cultivars from Transcaucasia and Anatolia. *Plant Genetic Resources*,

- 2006, 4: 144-158.
7. Aliev A.M., Kravchenko L.V., Naumova L.G., Ganich V.A. *Donskie aborigen-nye sorta vinograda* [Don indigenous grape varieties]. Novocherkassk, 2013.
 8. Potapenko A.I. *Starozhil zemli russkoi: ocherki o russkom vinograde* [An old-timer of the Russian land — essays about Russian grape]. Rostov/Don, 1976.
 9. Aliev A.M., Kravchenko L.V., Naumova L.G. *Vinodelie i vinogradarstvo*, 2005, 3: 36-37.
 10. *Code des caracteres descriptifs des varietes especes de Vitis*. Office international de la vigne et du vin (OIV), Paris, 1983.
 11. Schlotterer C., Soller M. Polymorphism and locus-specific effects on polymorphism at microsatellite loci in natural *Drosophila melanogaster* populations. *Genetics*, 1997, 146: 309-320.
 12. Fatahi R., Ebadi A., Bassil N., Mehlenbacher S.A., Zamani Z. Characterization of Iranian grapevine cultivars using microsatellite markers. *Vitis*, 2003, 42(4): 185-192.
 13. Hvarleva T., Rusanov K., Lefort F., Tsvetkov I., Atanassov A., Atanassov I. Genotyping of Bulgarian *Vitis vinifera* L. cultivars by microsatellite analysis. *Vitis*, 2004, 43(1): 27-34.
 14. Lin H., Walker M.A. Identifying grape rootstocks with simple sequence repeat (SSR) DNA markers. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1998, 49: 403-407.
 15. Karatas H., Degirmenci D., Velasco R., Vezzulli S., Bodur C., Agaoğlu Y.S. Microsatellite fingerprinting of homonymous grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties in neighboring regions of South-East Turkey. *Scientia Horticulturae*, 2007, 114: 164-169 (doi: 10.1016/j.scienta.2007.07.001).
 16. Zulini L., Fabro E., Peterlunger E. Characterisation of the grapevine cultivar Picolit by means of morphological descriptors and molecular markers. *Vitis*, 2005, 44(1): 35-38.
 17. Costantini L., Monaco A., Vouillamoz J.F., Forlani M., Grando M.S. Genetic relationships among homonymous *Vitis vinifera* cultivars from Campania (Italy). *Vitis*, 2005, 44: 25-34.
 18. Bowers J.E., Meredith C.P. The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon. *Nature Genetics*, 1997, 16: 84-87.
 19. Cipriani G., Spadotto A., Jurman I., Gaspero Di G., Crespan M., Meneghetti S., Testolin R. The SSR-based molecular profile of 1005 grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions uncovers new synonymy and parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origin. *Theor. Appl. Genet.*, 2010, 121(8): 1569-1585 (doi: 10.1007/s00122-010-1411-9).
 20. Sefc K.M., Steinkellner H., Wagner H.W., Glössl J., Regner F. Application of microsatellite markers to parentage studies in grapevine. *Vitis*, 1997, 36(4): 179-183.
 21. Sefc K.M., Steinkellner H., Glössl J., Kampfer S., Regner F. Reconstruction of a grapevine pedigree by microsatellite analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 1998, 97: 227-231 (doi: 10.1007/s001220050889).
 22. Vouillamoz J.F., Maigre D., Meredith C.P. Identity and parentage of two Alpine grape cultivars from Switzerland (*Vitis vinifera* L. Lafnetscha and Himbertscha). *Vitis*, 2004, 43(2): 81-87.
 23. This P., Jung A., Boccacci P., Borrego J., Botta R., Costantini L., Crespan M., Dangl G.S., Eisenheld C., Ferreira-Monteiro F., Grando S., Ibanez J., Lacombe T., Laucou V., Magalhaes R., Meredith C.P., Milani N., Peterlunger E., Regner F., Zulini L., Maul E. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. *Theor. Appl. Genet.*, 2004, 109: 1448-1458 (doi: 10.1007/s00122-004-1760-3).
 24. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.*, 1985, 19(1): 69-76 (doi: 10.1007/BF00020088).
 25. Shibata D.K. V knige: *Molekulyarnaya klinicheskaya diagnostika. Metody* [In: Molecular clinical diagnostics. Methods]. Moscow, 1999: 395-427.
 26. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *PNAS USA*, 1979, 76: 5269-5273.