УДК 634.8

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДНК-МАРКЕРОВ В СЕЛЕКЦИИ И ГЕНЕТИКЕ ВИНОГРАДА *VITIS VINIFERA SATIVA D.C.* СОРТА СОВИНЬОН БЕЛЫЙ

Волкова С.А., к.б.н., доцент кафедры биотехнологии, биохимии и биофизики
Милованов А.В., студент 3 курса факультета плодоовощеводства и виноградарства
Научный руководитель - Трошин Л.П., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой виноградарства

Целью данного исследования явилось изучение биоразнообразия протоклонов Vitis vinifera sativa D.C. сорта Совиньон белый молекуляно-генетическими методами. В результате сравнения полиморфизма протоклонов по пяти микросателлитным локусам выявлено их генетическое разнообразие.

Генетическое разнообразие, природное или созданное человеком, является основой для выведения новых сортов сельскохозяйственных культур, в том числе и винограда.

Появление в естественно научной практике молекулярно-генетических подходов привело к ускоренному изменению и развитию теории эволюции и систематики живых организмов, а также к появлению новых приемов селекции. Стремительное развитие биотехнологии привело к появлению современных молекулярно-генетических методов исследования генома данного, как и многих других, вида. Методы быстрой идентификации генотипов и определение отдельных генов имеют важное значение в процессе создания новых сортов и их размножение в селекционных учреждениях.

В первую очередь – это возможность установления генетических различий между выделенными клонами винограда на основе применения молекулярных маркеров. Высокий уровень полиморфизма, выявляемый SSR-маркерами, кодоминантный характер их наследования, аллельспецифичность определяют ценность этой маркерной системы, позволяют говорить о возможности ее использования для оценки генетической изменчивости между клонами винограда. Аллельные варианты микросателлитного локуса оцениваются как продукты амплификации разной длины (разное количество повторов) при использовании пары праймеров к его флангам. Для таких локусов типичен высокий уровень полиморфизма (мутируют в тысячу раз чаще, чем структурные гены) и наличие специфических механизмов возникновения аллельных вариантов (ошибки репликации, ошибки кроссинговера).

Материалы и методы. Подготовку растительного материала и экстракцию ДНК проводили, используя модифицированный CTAB-метод [1]. Для выделения ДНК использовали листья нижеперечисленных генотипов, которые были собраны с кустов в ООО «Фанагория-Агро» и помещены в морозильную камеру при – 70° С. Для анализа были использованы следующие клоны сорта Совиньон белый: 17-28, 18-8, 17-33, 11-32, 15-19, 11-27, 16-16, 7-11, 15-9, 9-2, 10-3, 7-29, 10-32, 11-8, 8-12, 11-11. Для анализа генетического разнообразия генотипов сортогруппы Совиньон были использованы 6 нейтральных микросателлитных (SSR) маркеров: VRTAG79, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VRZAG62, VVS2 [3-7]. Праймерные пары, фланкирующие указанные микросателлитные локусы, были синтезированы фирмой ЗАО «Синтол», Россия (табл. 1).

Таблица 1. – Нуклеотидная последовательность использованных в работе праймеров

Праймер		Нуклеотидная последовательность
VVS2	F	CAG CCC GTA AAT GTA TCC ATC
	R	AAA TT C AAA ATT CTA ATT CAA CTG G
VrZag62	F	GGT GAA ATG GGC ACC GAA CAC ACG C
	R	CCA TGT CTC TCC TCA GCT TCT CAG C
VrZag79	F	AGA TTG TGG AGG AGG GAA CAA ACC G
	R	TGC CCC CAT TTT CAA ACT CCC TTC C

Праймер		Нуклеотидная последовательность
VVMD5	F	CTA GAG CTA CGC CAA TCC AA
	R	TAT ACC AAA AAT CAT ATT CCT AAA
VVMD7	F	AGA GTT GCG GAG AAC AGG AT
	R	CGA ACC TTC ACA CGC TTG AT

Параметры ПЦР, использованные в данном эксперименте: 5 минут при 94° С – начальная денатурация, затем следующие 30 циклов: 30 секунд денатурация при 94° С, 30 секунд отжиг праймеров при N° С, 30 секунд синтез при 72° С; последний цикл синтеза 3 минуты при 72° С.

В состав ПЦР смеси входили: 40 нг ДНК, 0,05мМ dNTPs, 0,2μМ каждого праймера, 1 единица Taq-полимеразы, 25 mM KCI, 60 mM Tris-HCI, pH 8,5, 0,1% Тритон Х-100, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 1,5мМ MgCI2, в общем объеме реакционной смеси 25 мкл. Амплификация была проведена в амплификаторе Терцик производства НПО ДНК-технологии, Россия.

Для электрофоретического разделения продуктов ПЦР использовали 8% акриламидный гель на основе 1ЧТрис-боратного буфера (0,09 М Трис, 0,09 М Борной кислоты, 2 мМ ЭДТА, pH=8,2).. В качестве катализаторов полимеризации использовали ТЕМЕД и аммония персульфат, из расчета 40 мкл ТЕМЕДа (100% раствор) и 350 мкл аммония персульфата 10%-ного на 40 мл раствора геля.

Электрофорез проводили при напряжении 250 V в течение 3-4 часов. В работе был использован аппарат вертикального электрофореза VE-3 фирмы Хеликон. После электрофореза гелевые пластины помещали на 30 минут в раствор бромистого этидия 5 мкг/мл и фотографировали в ультрафиолете [2].

Таблица 2. - Полиморфизм микросателлитных локусов

Маркер	Аллели
VVS2	141* – 0**, 143 – 2, 147 – 6
VrZag62	189 – 0, 191 – 2, 193 – 4, 195 – 6, 197 – 8
VrZag79	251 – 0, 255 – 4
VVMD5	235 – 0, 240 – 6, 242 – 8
VVMD7	239 – 0, 241 – 2, 243 – 4
VVMD27	174 – 0, 176 – 2, 178 – 4, 180 – 6, 184 – 10, 186 – 12

*Примечание: *- размер аллелей указан в парах нуклеотидов (п.н.), ** - после размера аллеля через тире указан номер, ему присвоенный.*

По результатам анализа о наличии аллелей исследовавшихся сортов, были составлены их ДНК-паспорта, содержащие информацию о номере микросателлитного маркера и его аллельном состоянии у конкретного генотипа.

Таблица 3. – ДНК-паспорта протоклонов популяции Совиньон белый, составленные по данным об аллельных комбинациях микросателлитных маркеров*

Маркер	Протоклон															
	17-28	18-8	17-33	11-32	15-19	11-27	16-16	7-11	15-9	9-2	10-3	7-29	10-32	11-8	8-12	11-11
VVS2	0	2	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	2	0	2	0
VVMD7	2	4	4	0	4	4	2	0	4	0	2	2	2	4	0	0
VVMD5	6	6	8	6	6	6	6	8	8	0	8	6	8	8	6	8
VVMD27	1	0	0	11	4	7	6	4	2	2	7	4	1	2	2	0

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

Анализ данных ДНК-отпечатков сортогруппы Совиньон белый (табл. 3) показал, что исследуемые нами генотипы имеют отличающиеся наборы аллелей по нескольким микросателлитным локусам, несмотря на высокую степень генетического родства.

Возможность различать генетически близкие протоклоны сорта на основе полиморфизма микросателлитных маркеров подтверждает перспективность их использования в идентификации генотипов. Помимо этого, высокий уровень полиморфизма микросателлитных маркеров может быть применим для поиска ложных сортов и клонов при затруднительности проведения этой процедуры по фенотипу.

Таким образом, результат эксперимента показал эффективность использования полиморфизма микросателлитных локусов для изучения генетического разнообразия протоклонов винограда. Наличие одинаковых аллелей по многим маркерам у большого количества протоклонов свидетельствует об относительной генетической их близости.

Литература

1. Звягин А.С. Выделение ДНК из гербарных листьев *Vitis vinifera* / Звягин А.С. // Научный журнал КубГАУ. – 2010. - № 58 (04).
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. - М.: Мир, 1984. – 480 с.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.

24.04.2011