

УДК 634.8

UDC 634.8

**ИССЛЕДОВАНИЕ АБОРИГЕННЫХ СОРТОВ
ВИНОГРАДА РОССИИ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ**

**STUDY OF INDIGENEOUS RUSSIAN GRAPE
VARIETIES USING MICROSATELLITE
MARKERS**

Звягин Андрей Сергеевич
к.б.н., старший научный сотрудник

Zvyagin Andrey Sergeevich
Cand.Biol.Sci., senior researcher scientists

Милованов Александр Валериевич
студент винплодфака

Milovanov Aleksander Valerievich
student of the Faculty of horticulture

Трошин Леонид Петрович
д. б. н., профессор
*Кубанский государственный аграрный
университет, Краснодар, Россия*

Troshin Leonid Petrovich
Dr.Sci.Biol., professor
*Kuban State Agrarian University,
Krasnodar, Russia*

Проведен анализ генетического полиморфизма 12 аборигенных сортов винограда, произрастающих в Национальной ампелографической коллекции России (Анапский район Краснодарского края) посредством изучения аллельного разнообразия по шести микросателлитным локусам: VRZAG79, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VRZAG62, VVS2. Установлено, что все аборигенные сорта обладают уникальным аллельным набором. Оценка степени генетического родства сортов проведена с помощью кластерного анализа. Получены данные ДНК-паспортизации исследованных генотипов винограда

The analysis of genetic polymorphisms of 12 autochthonous grape varieties grown in the National ampelographic collection of Russia (Anapa district of the Krasnodar region) through the study of allelic diversity at six microsatellite loci: VRZAG79, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VRZAG62, VVS2 has been done. We have found that all native varieties have a unique set of allele. The assessment of genetic relationships varieties has been performed using cluster analysis. Data for DNA certification of the investigated genotypes of the grapes has also been obtained in the article

Ключевые слова: ВИНОГРАД, ВИД, ПОДВИД,
МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЕ МАРКЕРЫ,
ИЗМЕНЧИВОСТЬ, ГЕНЕТИЧЕСКОЕ
РАЗНООБРАЗИЕ

Keywords: GRAPE, SPECIES, SUBSPECIES,
MICROSATELLITE MARKERS, VARIABILITY,
GENETIC DIVERSITY

Введение

Виноград является многолетней вегетативно размножаемой культурой и одним из наиболее возделываемых растений в мире. Эта культура выделяется большим генетическим разнообразием, поэтому характеристика и идентификация сортов вида *Vitis vinifera* L. являются важным шагом в познании биологии винограда для использования ее особенностей на практике [8].

Среди всех объектов исследований виноградной культуры аборигенные сорта России представляют собой еще далеко не полностью

раскрытый пласт знаний о потенциальных возможностях промышленного производства и использования генофонда в комбинативной и клоновой селекций. Поэтому исследование древних аборигенных сортов, происходящих из районов первичного формообразования культурного винограда, берущих начало с незапамятных времен и известных на заре земледелия (например, кавказские и традиционные западноевропейские сорта), естественно, являются по составу генетически более неоднородными, и улучшение их методами клоновой селекции может иметь положительный эффект, хотя между такими сортами имеется существенная разница в выравненности материала.

Более молодые сорта или культивируемые в данной области сравнительно недавно и размножаемые из ограниченного количества исходного материала генотипически более выровнены и являются менее ценным материалом для улучшения их путем клоновой селекции. Поэтому необходимо исследовать существующие аборигенные сорта с использованием новых современных методов.

Появление в естественно научной практике молекулярно-генетических методов привело к ускоренному изменению и развитию теории эволюции и систематики живых организмов, а также к появлению новых приемов селекции. Одним из наиболее распространенных методов молекулярного ДНК-маркирования широкое распространение нашли ДНК-маркеры, основанные на полиморфизме микросателлитных последовательностей генома (SSR-simple sequence repeat).

Источником полиморфизма микросателлитных последовательностей (SSR)-сайт — специфическое варьирование длины повтора, что, в свою

очередь, обусловлено различием в числе единиц повтора [10]. Наиболее важные свойства SSRs — это кодоминантность, распределение по всему геному, простота манипуляций и высокая аллельная изменчивость, что обеспечивает высокую информативность этих маркеров.

В настоящее время SSR-маркеры используют для поиска различий внутри вида, идентификации сортов, составлении генетических карт в маркерной селекции, а также в работах по изучению генетического разнообразия и паспортизации сортов культурных растений.

Целью нашей НИР являлось исследование генотипического разнообразия аборигенных образцов винограда Национальной ампелографической коллекции России (Анапский район Краснодарского края).

В задачи наших исследований входило выполнение ДНК-фингерпринтинга и оценка генетического полиморфизма 12 аборигенных сортов России с применением анализа микросателлитных локусов.

Материал и методы

Объектами анализа были использованы следующие аборигенные сорта России: Шавраны (1), Аг чакрак (2), Красностоп золотовский (3), Яй изюм черный (4), Цимладар (5), Краснянский (6), Яй изюм розовый (7), Мола гусейн цибил (8), Мушкетный (9), Алый терский (10), Тавлинский поздний (11), Хатми (12).

Образцы были собраны на НАКР и сохранены при -70°C . Выделение ДНК производили, используя модифицированный СТАВ-метод [1].

Для анализа генетического разнообразия генотипов были использованы 6 нейтральных микросателлитных (SSR) маркеров: VRZAG79, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VRZAG62, VVS2 [3-7].

Параметры ПЦР, использованные в данном эксперименте: 5 минут при 94°C – начальная денатурация, затем следующие 30 циклов: 30 секунд денатурация при 94°C , 30 секунд отжиг праймеров при $N^{\circ}\text{C}$, 30 секунд синтез при 72°C ; последний цикл синтеза 3 минуты при 72°C .

В состав ПЦР смеси входили: 40 нг ДНК, 0,05мМ dNTPs, 0,2μМ каждого праймера, 1 единица Taq-полимеразы, 25 мМKCl, 60 мМTris-HCl, pH 8,5, 0,1 % Тритон X-100, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 1,5мМ MgCl₂, 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 1×Трис-боратного буфера (0,09 МТрис, 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].

Результаты исследований

В результате работы был выявлен разный уровень полиморфизма: от 5 (маркер VrZag62) до 10 аллелей (маркер VVS2) на локус в изученной группе аборигенных сортов винограда. При этом все сорта обладали уникальным аллельным набором, позволяющим идентифицировать их среди сортов изученной выборки (рисунок 1).

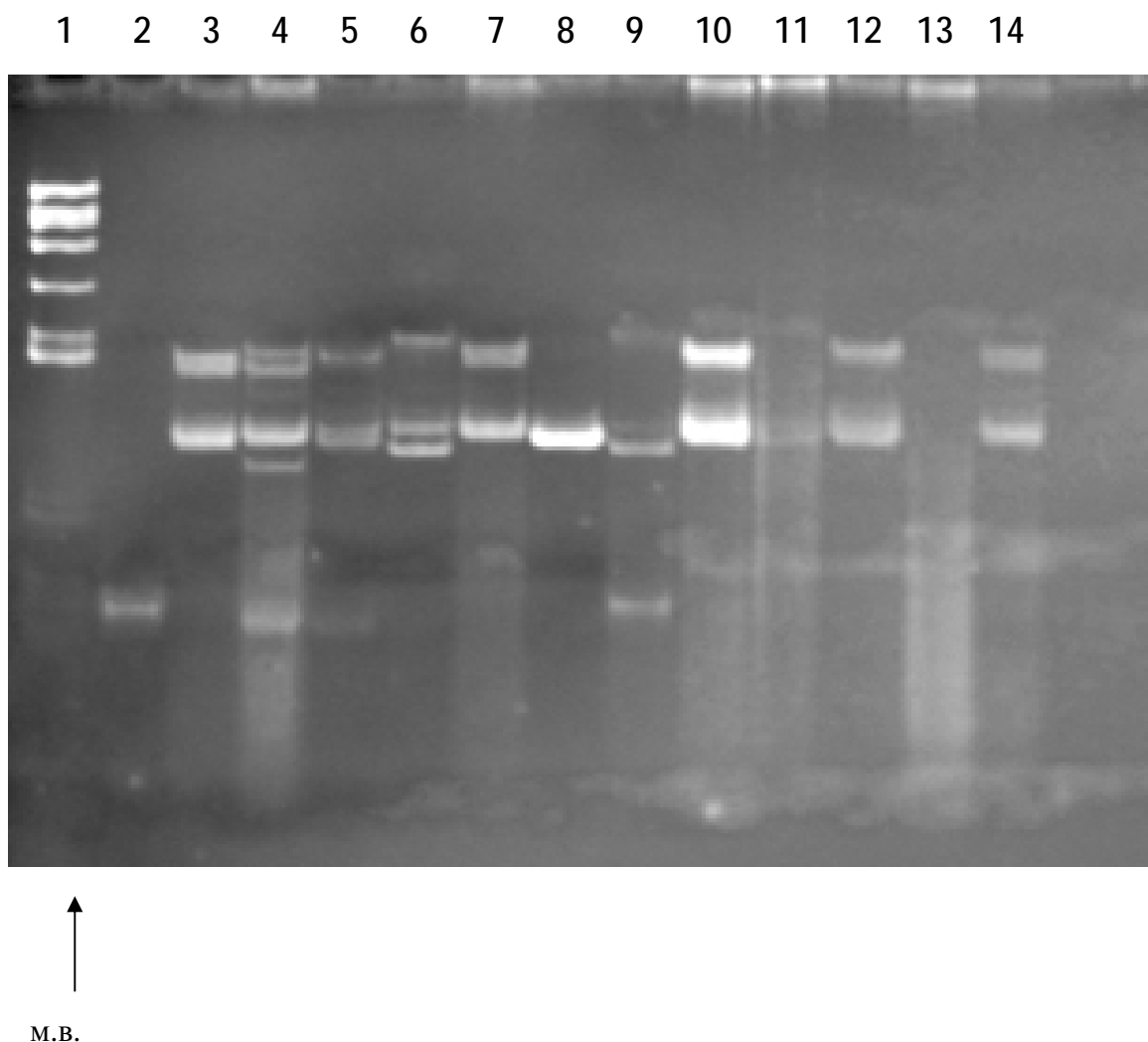


Рисунок 1. – Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР маркера VVS2.

Примечание: м.в. – маркер молекулярного веса ДНК; 2 - контроль, образец без ДНК; 3-12 – электрофоретические позиции продуктов ПЦР различных аборигенных сортов винограда: 3 – Шавраны, 4 – Аг чакрак, 5 – Красностоп золотовский, 6 – Яй изюм черный, 7 – Цимладар, 8 – Краснянский, 9 – Яй изюм розовый, 10 – Мола гусейн цибил, 11 – Мушкетный, 12 – Алы терский, 13 – Тавлинский поздний, 14 – Хатми.

Таблица. - Результаты анализа 12 аборигенных сортов по 6 микросателлитным маркерам

Сорт	VrZag62	VrZag79	VVS2	VVMD5	VVMD7	VVMD27
Шавраны	N/A*	N/A	150*	259	238	184/196
Аг чакрак	218/224	247	128/150	254	232	N/A
Красностоп золотовский	218/226	247	146	235/268	266	N/A
Яй изюм черный	N/A	N/A	140/160	265	245	N/A
Цимладар	N/A	254	134/155	268	232	N/A
Краснянский	218	254	140/150	262	238	196/212
Яй изюм розовый	218	262	152/162	N/A	259	N/A
Мола гусейн цибил	N/A	N/A	150/160	268	257	200/210
Мушкетный	220	262	142/160	259	257/266	205
Алы терский	216/226	251/262	150/160	268	257	210
Тавлинский поздний	216/223	260	152/162	N/A	257	203
Хатми	N/A	262	150/162	N/A	262	203/212

Примечание: *- N/A, означает, что аллель не амплифицировалась.

** - длина аллелей указана в п.н.

Из приведенных данных таблицы видно, что гетерозиготность, характеризующаяся одновременным присутствием двух амплифицированных фрагментов разного размера, значительно варьирует в пределах данной сортогруппы. Максимальный уровень гетерозиготности был выявлен по SSR-локусам VVS2 и VrZag62, VVMD27. Меньшую

степень гетерозиготности выявили по локусам VrZag79, VVMD5, VVMD7. В данном исследовании имеется высокая вероятность присутствия нулевых аллелей, однако, это не может быть полностью достоверно, так как не проводилось секвенирование данных участков и предполагается, что большинство очевидных гомозигот могут быть гетерозиготами: один аллель будет видим, другой - нет. Эти типы нулевых аллелей могут появляться, когда мутации не позволяют связывать праймеры на нацеленный регион [11].

На основании комплекса данных о частоте встречаемости аллелей и о размере амплифицированных последовательностей для каждой аллели была проведена оценка степени генетического сходства изученных аборигенных сортов винограда.

Для этой цели использовали кластерный анализ. Результаты кластеризации представлены ниже на дендрограмме (рисунок 2).

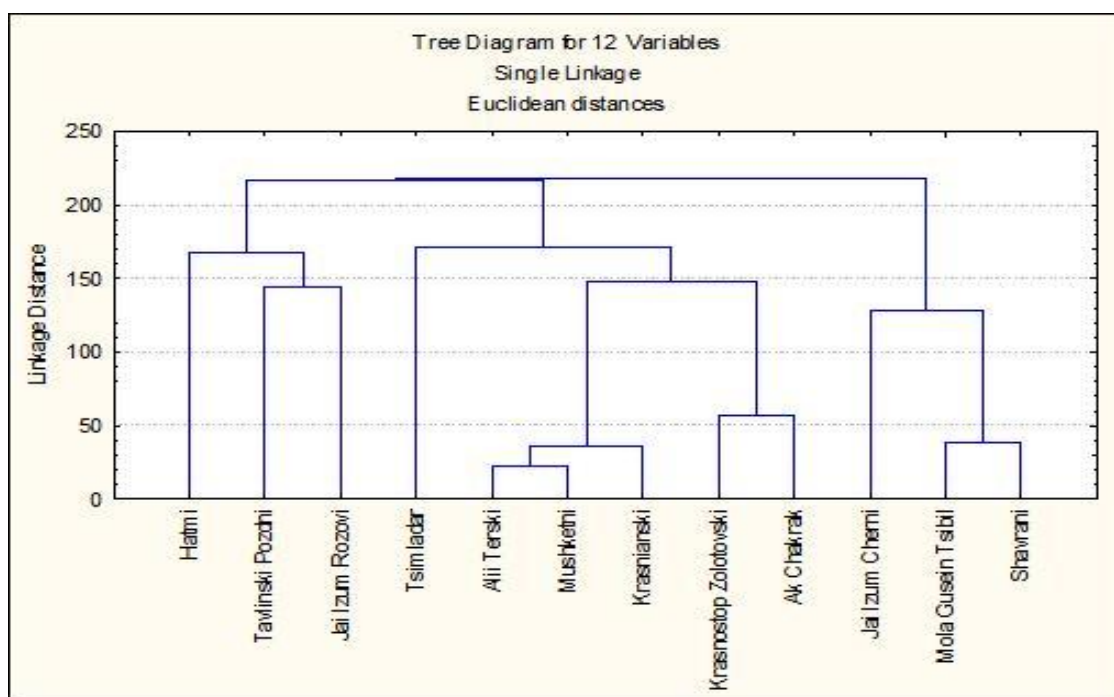


Рисунок 2. - Кластерный анализ изученных аборигенных сортов по шести микросателлитным маркерам.

Анализ полученного в результате кластеризации иерархического дендрита позволяет выделить в выборке исследованных сортов три основные группы (кластера).

В кластер 1 отнесены сорта Хатми, Тавлинский поздний, Яй изюм розовый, в то время как кластер 2 включает сорт Цимладар, а также в отдельные субкластеры включены аборигенных сорта Алый терский, Мушкетный, Краснянский, Красностоп золотовский, Аг чакрак.

В третий кластер входят аборигенные сорта Яй изюм черный, Мола гусейн цибил и Шавраны.

Выводы

Анализ данных ДНК-отпечатков аборигенных сортов показал, что исследуемые нами генотипы имеют отличающиеся наборы аллелей по представленным микросателлитным локусам.

Данные по шести микросателлитным маркерам могут быть использованы для дальнейшего анализа фенотипических особенностей аборигенных сортов винограда. Их ампелографические характеристики представлены в наших монографиях [10-11].

В результате работы были выявлены ДНК-паспорта 12 аборигенных сортов, которые будут использованы в дальнейших исследованиях по изучению генетического разнообразия, сохраняемого в Национальной ампелографической коллекции России, их фенотипического сходства и эволюции формирования подвида *Vitis vinifera sativa* D.C.

Список литературы

1. Звягин А.С. Молекулярно-генетические исследования полиморфизма винограда (монография). – Краснодар: КубГАУ, 2011. – 150 с.
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.
8. Лазаревский М.А. Изучение сортов винограда. - Ростов-н/Д.: РГУ, 1963. - 150 с.
9. Schlotterer C., Soller M. Polymorphism and locus-specific effects on polymorphism at microsatellite loci in natural *Drosophila melanogaster* populations // Genetics. - 1997. - V. 146. - P. 309–320.
10. Трошин Л.П. Аборигенные сорта винограда России. - Краснодар: КубГАУ, 2007. – 256 с.
11. Troshin L.P. Viticulture and winemaking in Russia. Russia: native varieties of grapevine // D. Maghradze, L. Rustioni, J. Turok, A. Scienza, O. Failla. Caucasus and Northern Black Sea Region Ampelography. - COST: Vitis, 2012. – PP. 268-392.

References

1. Zvyagin AS Molecular genetic studies of polymorphism of grapes (monograph). - Krasnodar KubGAU, 2011. - 150.
2. Maniatis, T., E. Fritsch, Sambrook J. Molecular Cloning. - Mir. - 1984. - 480.
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.
8. Lazarev MA The study of grape varieties. - Rostov-N / A: Rostov State University, 1963. - 150.
9. Schlotterer C., Soller M. Polymorphism and locus-specific effects on polymorphism at microsatellite loci in natural *Drosophila melanogaster* populations // Genetics. - 1997. - V. 146. - P. 309-320.
10. Troshin LP Native grape varieties Russia. - Krasnodar KubGAU, 2007. - 256.
11. Troshin L.P. Viticulture and winemaking in Russia. Russia: native varieties of grapevine / / D. Maghradze, L. Rustioni, J. Turok, A. Scienza, O. Failla. Caucasus and Northern Black Sea Region Ampelography. - COST: Vitis, 2012. - PP. 268-392.