

УДК: 634.816.581.167

В. Р. Бочарова^{1,2}, асп., **М. І. Тулаєва**², канд. біол. наук, **Н. А. Мулюкіна**², канд. біол. наук, **І. А. Ковальова**², асп.

¹ Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, кафедра генетики та молекулярної біології, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: caphgen@ukr.net

² Національний науковий центр "Інститут виноградарства і виноробства ім. В. Є. Таїрова" вул. 40-річчя Перемоги, 27, смт Таїрове, м. Одеса, 65496, Україна, e-mail: iviv@te.net.ua

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ПАСПОРТИЗАЦІЯ ГЕНОТИПІВ ВИНОГРАДУ ЗА ДОПОМОГОЮ ДНК-МАРКЕРІВ

Проведено молекулярно-генетичний аналіз сортів винограду Піфос та Рубін таїровський, а також клонів підщепного сорту *Berlandieri x Riparia* Кобер 5ББ, за допомогою молекулярних маркерів. Виявлено унікальний алельний профіль для кожного генотипу досліджуваних сортів і клонів. Детальна характеристика генотипів рослин надає можливість ідентифікувати кожний з них для створення паспорту.

Ключові слова: виноград, ДНК-маркери, мікросателіти.

Зростаючі темпи досліджень в області генетики та селекції винограду, а також інтродукція сортів і клонів вимагають надійних способів ідентифікації генотипів.

Методи ампелографії та ізоzimного аналізу не задовольняють вимогам, тому що ознаки винограду характеризуються занадто великою кількістю відмінних рис, крім того, багато з них піддаються впливу навколишнього середовища. В протилежність цьому, дані, отримані за допомогою ДНК-аналізу, не залежать від факторів середовища.

Раніше для виявлення відмінностей між сортами та ідентифікації сортів застосовували RFLP і RAPD-аналізи [1]. Однак ці методи мають деякі обмеження. Так, інтерпретація і стандартизація результатів даних аналізів часто була утрудненою і слабо відтворюваною. Протягом останніх років для ідентифікації і паспортизації сортів і клонів винограду був рекомендований SSR-аналіз, який передбачає використання мікросателітних маркерів [1, 2, 3, 4].

Мікросателітні маркери (яких також називають простими повторюваними послідовностями або SSR-маркерами) на даний момент широко використовуються в дослідженнях генетики винограду. Вони цілком сприйнятні для ідентифікації сортів культурних рослин, аналізу їх походження, а також картування геному [3]. Мікросателіти виявляють високий рівень поліморфізму, оснований на простих тандемно розташованих повторювальних послідовностях із 2-10 пар основ [4]. Такі прості повторювані мотиви досить часто зустрічаються в еукаріотних геномах [5].

SSR-маркери мають високий рівень відтворення, тобто вони дають можливість обмінюватися результатами між різними лабораторіями і впроваджувати отримані результати в загальну міжнародну базу даних [6].

На сьогодні за допомогою SSR-аналізу досліджено 19 груп зчеплення і розроблено більше 370 мікросателітних маркерів винограду, які довели свою корисність для молекулярно-генетичного аналізу [7].

Для ідентифікації сортів-синонімів, а також захисту авторських прав на сорт є необхідним створення генетичного паспорту для занесення його до реєстру сортів рослин України. Для виділення і затвердження клонів так само необхідна молекулярно-генетична ідентифікація. Створення ДНК-паспортів для сортів і клонів має бути обов'язковим у всіх випадках сертифікації досліджуваних зразків.

Метою даної роботи є моделювання системи паспортизації генотипів сортів винограду, рекомендованих для реєстру колекцій, а також вивчення внутрішньо-сортвої мінливості винограду шляхом дослідження клонів.

Матеріали та методи

Для досліджень використовували дев'ять рослин сорту Рубін таїровський, три рослини сорту Піфос, а також вісім рослин клонів підщепного сорту *Berlandieri x Riparia* Кобер 5ББ. Рослини висаджені на дослідних ділянках ННЦ "Інституту ВіВ ім. В. Є. Таїрова" (СМТ Таїрово Овідіопольського району Одеської області). Дослідження проведені протягом 2006–2007 рр.

Клони сорту Кобер 5ББ – № 1, 6872, 1074, 211161, 21192, 4354, 3413, 9191 представлені другим вегетативним поколінням, виділені методом індивідуального добору як найбільш перспективні за продуктивністю, а також за низкою інших показників (однорідність пагонів і розвитку кущів, підвищена якість лози, добра сумісність та ін.). Вони рекомендовані для розмноження на сертифікованій основі. Важливо відзначити, що у клону 6872 є морфологічні відмінності від базового сорту (опущена листова пластинка, черешок і пагін, яскраво рожева верхівка молодого пагона). Крім того, клони 9191, 211161, 6872 характеризуються підвищеною та стабільною продуктивністю [8]. Клон Кобер 5ББ №1 інтродукований з угорської колекції.

ДНК винограду була виділена з заморожених при -20°C молодих листків за методикою, розробленою у відділі молекулярної генетики Південного біотехнологічного центру в рослинництві м. Одеси [9].

Загалом, у наших попередніх дослідженнях були використані п'ять повністю охарактеризованих STSs локусів: *VVS2*, *VVMD7*, *VVMD27*, *ZAG62*, *ZAG79*, а також проведено порівняльний ISSR-аналіз з інтермікросателітним праймером *P_i16* (последовність фланкуючого праймера - (GA)_nC). Характеристики досліджених SSR-локусів і последовності праймерів, що фланкують локуси, представлені в табл. 1.

Реакційна суміш для проведення ПЛР (обсягом 25 мкл) включала: 20 нг генотної ДНК, 200 мкмоль кожного dNTP, 1–3 ммоль MgCl_2 (залежно від типу праймерів), 0,01% твін, 1 од. Таq-полімерази, 0,2 мкмоль кожного праймеру. Концентрація MgCl_2 в реакційній суміші залежно від праймерів складала: *VVMD7* – 1,0 ммоль; *ZAG62*, *ZAG79* – 1,5 ммоль; *VVS2*, *VVMD27* – 2,0 ммоль; *P_i16* – 3,0 ммоль.

Ампліфікацію проводили на термоциклері Терцик (ДНК-технологія, Росія), у режимі: початковий цикл – 4 хв. при 94°C , 45 сек. при $50\text{--}56^{\circ}\text{C}$, 1,5 хв. при 72°C ; основний етап 35 циклів – 1 хв. при 94°C , 45 сек. при $50\text{--}56^{\circ}\text{C}$ (залежно від типу праймерів), 1,5 хв. при 72°C ; фінальний етап 1 цикл – 1 хв. при 94°C , 45

сек. при 50–56°C, 5 хв. при 72°C. Температура віджигу для праймерів складала: ZAG62, ZAG79 – 50°C, VVS2, VVMD7 – 52°C, VVMD27, P₁₆ – 56°C.

Таблиця 1

Характеристики досліджених SSR- локусів (згідно з даними літератури [2, 6, 10–14])

Код локусу	Послідовність фланкуючих праймерів (5'-3')	Кількість алелів	Розмір фрагментів ДНК (п.н.)	Група зчеплення	Локалізація на карті зчеплення (сМ)	Гетерозиготність (%)
VVS2	AAATTCAAAATTCTAATTCAA CAGCCCGTAAATATATCCATC	19	123- 161	11	44.3	84.6
VVMD7	AGAGTTGCGGAGAACAGGAT CGAACCTTCACACGCTTGAT	17	232- 266	7	105.1	92.3
VVMD27	GTACCAGATATGAATACATCCGTA AGT ACGGGTATAGAGCAAACGGTG	23	175- 219	5	70.6	92.3
ZAG62	GGTGAAATGGGCACCGAACACACG CCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC	18	174- 220	7	52.3	69.2
ZAG79	AGATTGTGGAGGAGGGAACAAC CG TGCCCCATTTCAAACACTCCC TTCC	14	238- 264	5	115.2	100.0

Аналіз продуктів ампліфікації здійснювали за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ 8%) у буфері 1 x TBE. Для прояву й фіксації продуктів ампліфікації використовували фарбування азотнокислим сріблом.

Документували отримані дані за допомогою відеосистеми UVP Bioimaging Systems EC3. Розмір поліморфних фрагментів ДНК визначали за допомогою комп'ютерної програми "Launch Vision WorksLS" згідно стандарту *-pBR 322 DNA / Bsu RI (Hae III)* (Fermentas).

Результати і обговорення

Для створення ДНК-паспорту сортів винограду були обрані сорти Рубін таїровський та Піфос, які рекомендовані в якості батьківських пар для гібридизації.

Рубін таїровський та Піфос є перспективними винними сортами міжвидового походження, які культивуються в Україні та Молдові і широко використовуються в селекційній роботі. Сорт Рубін таїровський був виведений селекціонерами ННЦ "Інституту ВіВ ім. В. Є. Таїрова". Сорт Піфос виведений на базі Молдовського інституту виноградарства і виноробства.

Система ідентифікації генотипів і створення паспорту містить у собі оптимальну кількість локусів, за якими визначається найбільша кількість алелів. За

стандартами Vitis Microsatellite Consortium (VMC) оптимальною кількістю алелів вважають 5–6, за умовою проявлення поліморфізму розмірів фрагментів [6, 7].

Проведено дослідження п'яти SSR-локусів, які виявляють чіткі відмінності між сортами, що вказує на їх ефективність при створенні ДНК-паспорту. Однак інтермікросателітний праймер *P_i16* не виявив відмінностей між сортами. Розмір фрагментів ДНК у обох сортів дорівнював 326 п.н.

Генотипова оцінка та підрахунок розмірів алелів ДНК-локусів сортів Рубін таїровський та Піфос наведені в табл. 2.

SSR-аналіз є інформативним для виявлення відмінностей фрагментів ДНК досліджуваних сортів винограду при створенні генетичного паспорту сорту та може бути використаний для швидкої і точної ідентифікації генотипу сорту при створенні геномних бібліотек. Таким чином, на основі отриманих даних були розроблені ДНК-паспорти сортів Рубін таїровський та Піфос.

Таблиця 2

Поліморфні ДНК-локуси сортів Піфос та Рубін таїровський

Сорт	SSR-локуси									
	VVS2		VVMD7		VVMD27		ZAG62		ZAG79	
	алелі (п.н.)		алелі (п.н.)		алелі (п.н.)		алелі (п.н.)		алелі (п.н.)	
Піфос	137	137	248	248	175	189	196	206	250	250
	n+14	n+14	n+1	n+1	n	n+14	n+2	n+34	n+1	n+1
Рубін таїровський	131	151	240	240	191	191	190	190	260	260
	n+8	n+28	n+8	n+8	n+16	n+16	n+16	n+16	n+22	n+22

n - розмір фрагменту ДНК найменшого алеля в п.н. згідно з даними літератури [14], додаток до n - кількість тандемних повторів.

Вивчені ДНК-локуси клонів сорту Кобер 5ББ є загалом генетично однорідними, тому що даний селекційний матеріал є попередньо добре відселектованим. Тому явних морфологічних відмінностей клони не виявляють (окрім клону № 6872, який має опушене листя та пагін, а також яскраво рожеву верхівку молодого пагону). За показниками продуктивності клони № 211161 та № 9191 є найбільш перспективними, інші клони знаходяться на рівні контролю. Однак проведення ДНК-паспортизації є обов'язковим для клонів, рекомендованих для сертифікації, незалежно від наявності або відсутності морфогенетичних відмінностей.

Молекулярно-генетичний аналіз популяції клонів показав наявність генетичних відмінностей у клону № 1, інтродукованого з Угорщини, по локусах *VVS2*, *VVMD7*, *ZAG62* (рис. 1, 2), а також за здатністю ДНК взаємодіяти з інтермікросателітним праймером *P_i16*.

Відмінності виражаються у відсутності фрагментів ДНК, або наявності фрагментів іншого розміру.

Так, клон № 1 є гомозиготним за локусом *VVS2*, та має розмір алелів 151 : 151 п.н., інші клони гетерозиготні (142 : 149 п.н.), але у клону № 3413 виявляється новий алель (142 : 151 п.н.).

По локусу *VVMD7* та *VVMD27* всі клони знаходяться в гетерозиготному стані і мають розмір алелів 201 : 214 п.н. та 189 : 214 п.н. відповідно. По локусу *ZAG62* всі клони також є гетерозиготними (201 : 214 п.н.), але клон № 1 має один алель ін-

шого розміру (192 : 214 п.н.). За локусом *ZAG79* всі клони є гетерозиготними (254 : 263 п.н.). ISSR-аналіз з використанням праймеру *P₁I6* також виявив відмінності у вивченій вибірці клонів. Так, клон № 1 характеризується наявністю фрагменту ампліфікації розміром 321 п.н. на відміну від інших клонів (316 п.н.). Генотипова оцінка досліджуваних клонів представлена в табл. 3.

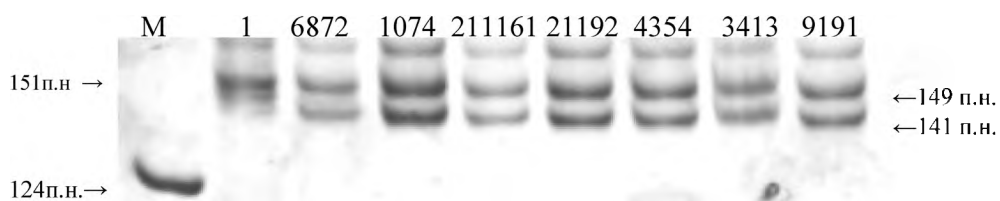


Рис. 1. Результати електрофорезу продуктів ампліфікації ДНК клонів сорту *Berlandieri x Riparia* Кобер 5ББ по локусу *VVS2*. М - молекулярний маркер *pBR 322 DNA / Bsu RI*



Рис. 2. Результати електрофорезу продуктів ампліфікації ДНК клонів сорту *Berlandieri x Riparia* Кобер 5ББ по локусу *VVMD7*. М - молекулярний маркер *pBR 322 DNA / Bsu RI*

Однак у інших клонів поліморфізму не виявлено, що може бути пов'язано з недостатньою кількістю досліджуваних ДНК-локусів, або з відсутністю генетичних відмінностей.

Таблиця 3

Поліморфні ДНК-локуси клонів підшешного сорту *Berlandieri x Riparia* Кобер 5ББ

Клон	SSR-локуси									
	VVS2		VVMD7		VVMD27		ZAG62		ZAG79	
	алелі (п.н.)		алелі (п.н.)		алелі (п.н.)		алелі (п.н.)		алелі (п.н.)	
1	151	151	234	250	189	209	192	214	254	262
	n+28	n+28	n+2	n+18	n+14	n+34	n+18	n+40	n+16	n+24
6872	141	149	232	262	189	209	202	214	254	262
	n+18	n+26	n	n+30	n+14	n+34	n+28	n+40	n+16	n+24
1074	141	149	232	262	189	209	202	214	254	262
	n+18	n+26	n	n+30	n+14	n+34	n+28	n+40	n+16	n+24
211161	141	149	232	262	189	209	202	214	254	262
	n+18	n+26	n	n+30	n+14	n+34	n+28	n+40	n+16	n+24

Закінчення таблиці 3

Клон	SSR-локуси									
	VVS2		VMD7		VMD27		ZAG62		ZAG79	
	алелі (п.н.)		алелі (п.н.)		алелі (п.н.)		алелі (п.н.)		алелі (п.н.)	
21192	141	149	232	262	189	209	202	214	254	262
	n+18	n+26	n	n+30	n+14	n+34	n+28	n+40	n+16	n+24
4354	141	149	232	262	189	209	202	214	254	262
	n+18	n+26	n	n+30	n+14	n+34	n+28	n+40	n+16	n+24
3413	141	151	232	262	189	209	202	214	254	262
	n+18	n+28	n	n+30	n+14	n+34	n+28	n+40	n+16	n+24
9191	141	149	232	262	189	209	202	214	254	262
	n+18	n+26	n	n+30	n+14	n+34	n+28	n+40	n+16	n+24

n - розмір фрагменту ДНК найменшого алеля в парах нуклеотидів згідно з даними літератури [14], додаток до n - кількість тандемних повторів

Планується продовжити молекулярно-генетичні дослідження сортів та клонів на більшій виборці та з дослідженням більшої кількості SSR-локусів.

Таким чином, оцінка внутрішньосортової мінливості клонів сорту Кобер 5ББ показала, що популяція клонів гетерогенна та генетично неоднорідна, про що свідчать одиничні відмінності по деяким локусам, більшість з яких виявлена у клону № 1, інтродукованого з угорської колекції.

Висновки

SSR-аналіз послідовностей ДНК дозволив виявити молекулярно-генетичний поліморфізм сортів і клонів винограду.

Аналіз внутрішньосортової мінливості клонів сорту Кобер 5ББ виявив відмінності по трьох локусах у інтродукованого клону № 1, а також по одному локусу у клону № 3413.

На основі отриманих даних розроблені ДНК-паспорти сортів Рубін таїровський та Піфос.

Використана маркерна система є ефективним, швидким та точним методом для ідентифікації генотипів сортів і клонів, а також для створення паспорту з метою захисту авторських прав селекціонерів.

Література

1. *Lodhi M. A., Daly M. J.* et al. A molecular marker based linkage map of Vitis // Genome. – 1995. – Vol. 38. – P. 786–794.
2. *Sefc K. M., Regner F.* et al. Genotyping of grapevine and rootstock cultivars using microsatellite markers // Vitis. – 1998. – Vol. 37 (1). – P. 15–20.
3. *Arroyo-Garcia R., Martinez-Zapater J. M.* Development and characterization of new microsatellite markers for grape // Vitis. – 2004. – Vol. 43 (4). – P. 175–178.
4. *Goto-Yamamoto N., Mouri H.* et al. Development of grape microsatellite markers and microsatellite analysis including oriental cultivars // Vitis. – 2006. – Vol. 57 (1). – P. 105–108.

5. Кожухова Н. Э., Сиволап Ю. М. Идентификация генотипов кукурузы при помощи молекулярных маркеров // Генетика. – 2004. – Т. 40, № 1. – С. 59–66.
6. Martin J. P., Borrego J. et al. Characterization of Spanish grapevine cultivar diversity using sequence-tagged microsatellite site markers // Genome. – 2003. – Vol. 46. – P. 10–18.
7. Adam-Blondon A. F. et al. Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics // Theor. Appl. Genet. – 2004. – Vol. 109. – P. 1017–1027.
8. *Состояние и перспективы улучшения подвойных сортов винограда в Украине* / И. А. Ковалева, М. И. Тулаева, В. С. Чисников // Виноградарство і винооробство: Тематичний науковий збірник. – О., 2006. – № 43. – С. 51–61.
9. *Исследование внутривидового полиморфизма Vitis vinifera* / Ю. М. Сиволап, Т. Г. Вербицкая, С. Н. Прокопенко, М. И. Тулаева // Цитология и генетика. – 1993. – Т. 27, № 3. – С. 11–15.
10. Costantini L. et al. Generation of a common set of mapping markers to assist table grape breeding // Vitis. – 2007. – Vol. 58 (1). – P. 102–111.
11. Snoussi H. et al. Genetic relationship among cultivated and wild grapevine accessions from Tunisia // Genome. – 2004. – Vol. 47. – P. 1211–1219.
12. Sanchez-Escribano E. M. et al. Use of sequence-tagged microsatellite site markers for characterizing table grape cultivars // Genome. – 1999. – Vol. 42. – P. 87–93.
13. Costantini L. et al. Genetic relationships among local *Vitis vinifera* from Campania (Italy) // Vitis. – 2005. – Vol. 44 (1). – P. 25–34.
14. This P., Jung A. et al. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars // Theor. Appl. Genet. – 2004. – Vol. 109. – P. 10448–11458.

В. Р. Бочарова, М. И. Тулаева, Н. А. Мулюкина, И. А. Ковалева

Одесский национальный университет, каф.
генетики и молекулярной биологии,
ул. Дворянская 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: caphgen@ukr.net

Национальный научный центр “Институт виноградарства
и виноделия им. В. Е. Таирова”,
ул. 40-летия Победы, 27, пгт Таирово, Одесса, 65496, Украина,
e-mail: iviv@te.net.ua

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ПАСПОРТИЗАЦИЯ ГЕНОТИПОВ ВИНОГРАДА ПРИ ПОМОЩИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

Резюме

Проведен молекулярно-генетический анализ сортов Пифос и Рубин таировский, а также клонов сорта Verlandiegi x Riparia Кобер 5ББ, с помощью молекулярных маркеров. Выявлен уникальный аллельный профиль для каждого генотипа сортов и клонов. Детальная характеристика генотипов растений позволит идентифицировать каждый из них для создания паспорта.

Ключевые слова: виноград, ДНК-маркеры, микросателлиты.

B. R. Bocharova, M. I. Tulaeva, N. A. Mulyukina, I. A. Kovalova

Odessa National University, Department of Genetics and Molecular Biology,
str. Dvoryanskaia, 2, Odessa, 65082, Ukraine, e-mail: caphgen@ukr.net

National scientific centre “Institute of viticulture and wine-making
named after V. Ye. Tairov”,

27, 40 let Pobeda str., Tairovo, Odessa, 65496, Ukraine, e-mail: iviv@te.net.ua

IDENTIFICATION AND GENOTYPING OF GRAPEVINE USING MOLECULAR MARKERS

Summary

The molecular-genetic analysis of two cultivars of grapevine Piphos and Rubin tairofsky as well as clones of the cultivar Berlandieri x Riparia Cober 5BB were conducted, by means of molecular marker. Unique allele profile was revealed for the genotype of each cultivar and clones. The detailed characteristic of plant genotype will allow to identify each of them for making the passport.

Keywords: grapevine, DNA-markers, microsatellites.