



В.И.Рисованная, к.б.н., вед.н.с. отдела биологически чистой продукции и молекулярно-генетических исследований
Национальный институт винограда и вина «Магарач»

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПАСПОРТОВ ВИНОГРАДА В ПРОИЗВОДСТВЕ

Анализ и идентификация сортов, гибридов, клонов, селекционного и посадочного материала сельскохозяйственных растений - это важный элемент в селекции и генетике, а также при коммерческих операциях и защите авторских прав. Международное сотрудничество в области изучения, сохранения и рационального использования генетических ресурсов винограда предполагает соответствие терминов, понятий и стандартов используемых в украинской науке о винограде международным, в частности тем, которые используются европейским научным сообществом. Основные требования международного союза по защите новых сортов растений (UPOV) к сорту, который выносятся на государственную регистрацию, - это его идентификация и соответствие ООС-критерию (DUS criteria), который включает 3 основные позиции: отличимость, однородность и стабильность.

В статье рассмотрены вопросы об использовании молекулярно-генетических паспортов для идентификации и регистрации сортов винограда.

Ключевые слова: виноград, сорт, идентификация, SSR-маркеры, молекулярно-генетические паспорта, DUS критерий.

Идентификация - это оценка соответствия образца заявленному генотипу. Традиционно описание, идентификация и регистрация сортов, гибридных форм и клонов винограда основывается на оценке ряда морфобиологических признаков, таких как признаки листа, побега, цветка, грозди, а также устойчивость к заболеваниям, урожайность и другие. Однако многие из этих признаков подвержены влиянию факторов окружающей среды, могут варьировать даже у одного растения, зависят от места произрастания и физиологического состояния. Такое варьирование морфологических признаков, в сочетании с фактором субъек-

тивности человеческой оценки, значительно ограничивает возможности традиционных методов. Движение посадочного материала плодовых культур, а также потребности международной виноторговли также требуют применения методов идентификации, основанных на стабильных характеристиках, к которым относят методы анализа ДНК.

Наиболее информативными на сегодняшний день считаются молекулярные методы анализа генотипов растений, в частности ПЦР (полимеразная цепная реакция) с использованием микросателлитных маркеров (SSR -маркеров), которые широко применя-

ются в европейских странах для идентификации наиболее важных сельскохозяйственных культур. Преимущества SSR-маркеров (simple sequence repeats – простые повторяющиеся последовательности) заключаются в высоком полиморфизме, возможности тестировать генотипы на любой стадии развития, кодоминантном типе наследования, объективности полученных результатов. Система SSR-маркеров имеет высокую дифференцирующую способность и характеризуется высоким уровнем стандартизации. Всё это позволяет получать уникальные генетические профили (молекулярно-генетические паспорта) исследуемых образцов, т.е. идентифицировать их, а также тестировать новые сорта или формы на соответствие критериям ООС-теста.

Результаты ДНК-типирования вместе с информацией о родословной и основными ампелографическими признаками могут быть использованы в качестве наиболее точной сертификационной системы в государственных стандартах регистрации сортов. В Украине такая работа выполнена впервые.

В основу предлагаемого способа идентификации и регистрации генотипов с использованием молекулярно-генетических паспортов положен метод ПЦР с последующим анализом продуктов амплификации ДНК на генетическом анализаторе 3130 (Applied Biosystems) или приборах аналогичного типа.

Полимеразная цепная реакция – это метод, позволяющий получать множество копий специфической последовательности ДНК (амплификация). Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах, каждый из которых состоит из температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и дальнейшей достройки полинуклеотидных цепей ДНК-полимеразой. В основе метода ПЦР лежит способность ферментов ДНК-полимераз осуществлять направленный синтез второй, т.е. комплементарной, цепи ДНК, по имеющейся матрице одноцепочечной ДНК. Образование в результате ПЦР реакции ДНК-фрагментов определённого размера свидетельствует о наличии в образце тестируемой ДНК.

В основе оценки регистрируемых сортов на соответствие их генотипов критериям ООС-теста методом SSR-ПЦР лежит подбор оптимального количества наиболее полиморфных микросателлитных локусов, позволяющих тестировать не только однородность, но и отличимость заявленных сортов. Шесть полиморфных микросателлитных локусов VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62, VrZAG79 были предложены европейской рабочей группой по винограду как необходимый минимальный набор для генотипирования, идентификации, дифференциации и классификации сортов винограда [1]. Впоследствии их количество было дополнено локусами VVMD25, VVMD28, VVMD32 [2]. Идентификация методом SSR-ПЦР основывается на определении аллельного состава микросателлитных локусов исследуемых образцов (например, сортов) и является основой для последующей паспортизации и регистрации сортов [3].

Предлагается при регистрации генотипов винограда учитывать молекулярно-генетические паспорта, которые представляют аллельный состав 9 микросателлитных локусов: VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD25,

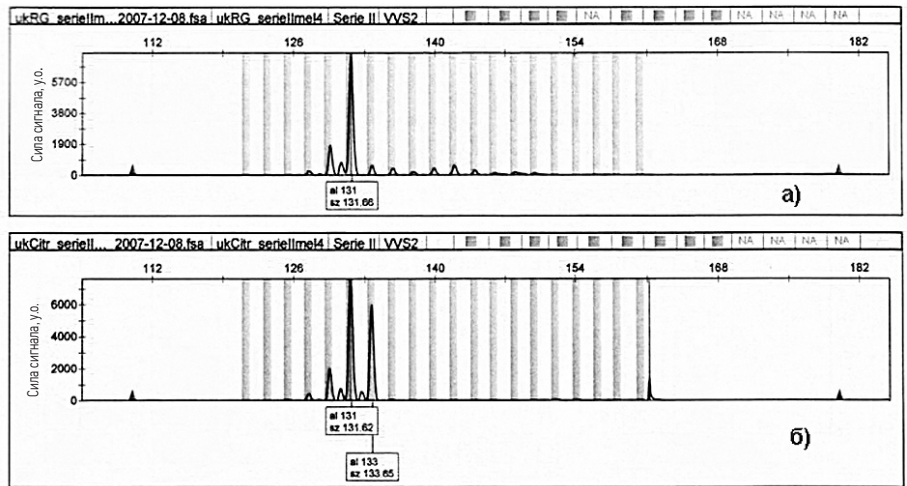


Рис. Молекулярно-генетические профили сортов винограда Гранатовый Магарача и Цитронный Магарача (локус VVS2), полученный методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе 3130AB: а) гомозиготный генотип; б) гетерозиготный генотип. Цифры соответствуют размеру ПЦР-фрагмента

VVMD27, VVMD28, VVMD32, VrZAG62, VrZAG79. Этот элемент регистрации сорта позволит повысить уровень защиты интеллектуальной собственности.

Первый этап регистрации – это идентификация сорта и составление молекулярно-генетического паспорта путем анализа генотипов 50 индивидуальных растений с помощью 9 микросателлитных локусов.

Составление молекулярно-генетического паспорта включает несколько основных моментов.

1. Выделение тотальной ДНК из ткани листа индивидуальных растений винограда или плодовых.
2. Оценка чистоты и концентрации экстрагированной ДНК.
3. Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР).
4. Детекция продуктов амплификации (ПЦР-фрагментов) на генетическом анализаторе.
5. Определение размеров аллелей (ПЦР-фрагментов) с использованием программы GeneMapper 4.0.

На рисунке представлен результат SSR-ПЦР анализа ДНК сортов Гранатовый Магарача и Цитронный Магарача. Один большой пик на электрофореграмме соответствует гомозиготному генотипу (а), а два – гетерозиготному. Анализ ПЦР-фрагментов должен выполняться с использованием контрольных (reference) сортов и маркеров молекулярного веса.

Визуализация продуктов амплификации может быть выполнена методом гелевого электрофореза (в случае отсутствия генетического анализатора).

Размеры аллелей (ПЦР-фрагментов) определяются автоматически с использованием программы GeneMapper 4.0. и выражены в парах нуклеотидов (п.н.). Полученные размеры ПЦР-фрагментов записываются в виде формул генотипов или молекулярно-генетических паспортов: VVS2_{141 149}, VVMD5_{223 229}, VVMD7_{243 255}, VVMD25_{248 248}, VVMD27_{178 191}, VVMD28_{227 259}, VVMD32_{251 271}, VrZAG62_{188 204}, VrZAG79_{250 260}. Рядом с названием SSR-локуса записываются размер идентифицированных аллелей (ПЦР-фрагмента). Название локуса может быть закодировано латинскими буквами. Например, для сорта Португизер формула генотипа может быть записана

следующим образом:

$A_{141 149} B_{223 229} C_{243 255} D_{248 248} E_{178 191} F_{227 259}$
 $G_{251 271} H_{188 204} I_{250 260}$. Этот вариант записи формулы генотипа используется для кодирования сортов в Украине [4].

В рамках совместных европейских проектов разработан стандарт для маркирования генотипов винограда с использованием кодов эталонных аллелей: VVS2_{CH1 CH2}, VVMD5_{CH1 CH2}, VVMD7_{CF1 TR1}, VVMD25_{CS1 CF2}, VVMD27_{CF1CS2}, VVMD28_{CH1CH2}, VVMD32_{CS1MU2}, VrZAG62_{CH1CH2}, VrZAG79_{CH1CH2}. При этом нижние индексы представлены в виде набора кодов аллелей. Однако универсальным вариантом кодирования размеров аллелей микросателлитных локусов признан вариант «n + x», который и предложен как основная запись формул генотипов винограда (молекулярно-генетических паспортов) на основе анализа микросателлитных локусов: VVS2_{n+14}, VVMD5_{n+20}, VVMD7_{n+12}, VVMD25_{n+16}, VVMD27_{n+8}, VVMD28_{n+6}, VVMD28_{n+14}, VVMD28_{n+2}, VVMD32_{n+4}, VrZAG62_{n+14}, VrZAG79_{n+6}.

Следующий этап регистрации заключается в оценке соответствия заявленного сорта ООС – критериям. Определение критерия отличимости заключается в тестировании заявленных сортов на их отличие от близких ему генотипов (родительские сорта, сортогруппы) путем сравнительного анализа спектров микросателлитных локусов, которые должны иметь отличия.

Суть критерия однородности или единообразия заключается в том, что генетически однородный генотип должен иметь одинаковый ДНК-спектр по каждому микросателлитному локусу. Критерии однородности и стабильности для плодовых культур, в том числе и винограда, оценивают с учётом особенностей их размножения. Вегетативное размножение винограда в процессе его культивирования обеспечивает сохранение однородности генотипа после каждого цикла размножения.

Полученные как результаты ДНК-типирования молекулярно-генетические паспорта сортов винограда рекомендуются к применению:

- в учреждениях pomologo-ампелографической инспекции;
- при регистрации сортов в государственной службе охраны прав на сорта рас-



тений;

- для оценки соответствия ООС-критериям (отличие, однородность, стабильность);

- при защите авторских прав и в коммерческих операциях.

В некоторых случаях, например, для генотипирования и/или идентификации близкородственных сортов, клонов, а также оценки происхождения селекционных сортов или гибридных форм, количество и спектр молекулярных маркеров может быть

увеличен или изменен, например на AFLP, т.е. выбор класса и количества маркеров зависит от поставленной задачи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. This P., Jung A., Voccacci P. et al. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars // Theoretical and Applied Genetics. - 2004. - V.109. - P. 1048-1058

2. This P. Microsatellite markers analysis // Minutes of the First GrapeGen06 Workshop March 22nd and 23rd, 2007 INRA, Versailles (France). - P.3-4.

3. Heuertz M., Goryslavets S., Hausman J.F., Risovanna V. Characterization of grapevine accessions from Ukraine using microsatellite markers // American Journal of Enology and Viticulture. - 2008. - V. 59. - P. 169-178.

4. Сиволап Ю.М., Волкодав В.В., Бальвінська М.С. [и др.]. Методические рекомендации. Ідентифікація і реєстрація генотипів м'якої пшениці, ячменю, кукурудзи, соняшника за допомогою аналізу мікросателітних локусів. - Одеса, 2004. - 14 с.

Поступила 29.03.2013

© В.И.Рисованная, 2013