

РАЗДЕЛ 2. ВИНОГРАД

УДК: 634.8:631.526.32:577.231.3

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ В СЕЛЕКЦИИ ВИНОГРАДА

Рисованная В.И., канд. биол. наук, **Гориславец С.М.**, канд. биол. наук
*Национальный институт винограда и вина «Магарач» национальной академии
аграрных наук Украины (Ялта)*

Реферат. Приведены результаты исследований использования молекулярно-генетических маркеров в генеративной и клоновой селекции винограда. Обсуждается возможность использования молекулярно-генетических паспортов как элемента регистрации новых сортов для повышения уровня защиты интеллектуальной собственности. Предложена система обозначения аллелей и записи генотипов винограда в соответствии с европейскими стандартами. Установлена возможность экспресс-оценки гибридных сеянцев на ранней стадии развития.

Ключевые слова: виноград, сорт, селекция, микросателлиты, молекулярно-генетические паспорта, база данных, ООС-критерий

Summary. The results of research of molecular-genetic markers use in generative breeding and clonal selection of grapevine are adduced. The possibility of molecular-genetic passports use as an element for registration of new grapes varieties to improve the level of intellectual property protection is discussed. A system of allele designation and genotype recording for grapevine in according with the European standards is suggested. The opportunity for rapid evaluation of grapevine hybrid seedlings at early developmental stage is established.

Key words: grapes, varieties, breeding selection, microsatellites, molecular-genetic passports, data base, DUS criteria

Введение. Для селекции винограда и плодовых культур актуальной проблемой остаётся идентификация разных форм, оценка саженцев гибридных сортов на ранней стадии развития, подвойных и привойных сортов при закладке маточников, клонов для создания банка клонов, посадочного материала, а также вопросы сертификации и защиты авторских прав.

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 в пределах одного растения, зависят от места произрастания и физиологического состояния. Такое варьирование морфологических признаков, в сочетании с фактором субъективности человеческой оценки, ограничивает возможности традиционных методов. Кроме того, посадочный материал распространяется в основном в «древесном виде» (саженцы, черенки), и это делает идентификацию культурного сорта почти невозможной. Ошибки идентификации, если они присутствуют, проявляются спустя годы после того, как виноградник заложен. В случае подвоев, ситуация является еще более трудной, поскольку после прививок развитие листьев на них не допускается, и это делает практически невозможной правильную ампелографическую идентификацию. Поэтому ошибочная идентификация подвойных сортов может привести к экономическим потерям.

Молекулярные методы на сегодняшний день занимают лидирующее положение в области идентификации и сертификации сортов различных культур растений. В связи с этим в настоящее время широко используется метод «микросателлитного профилирования», который считается наиболее информативным методом анализа генотипов растений. Этот метод базируется на генотипировании в специфических микросателлитных локусах (SSR – маркеры). Микросателлиты используются в качестве маркеров, поскольку обнару-

живают высокий полиморфизм, распространены по всему геному и обеспечивают дифференциацию гомозиготных и гетерозиготных генотипов.

Преимущества SSR-маркеров заключаются в 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 [1, 2].

Технология «микросателлитного профилирования» используется в европейских лабораториях, а с 2001 года – в лаборатории молекулярно-генетических исследований НИ-ВиВ «Магарач». Исследования были начаты при выполнении проекта Греция-Украина-Россия «Разработка мультимедийная web-backed генетической базы данных украинской, молдавской и российской зародышевой плазмы винограда *Vitis vinifera*» и продолжены в рамках международных проектов IPGRI, ECO-NET, COST FA 1003 [3]. Результаты, которые были получены в этих проектах, с очевидностью демонстрируют достижения международного сотрудничества в области молекулярных исследований винограда. Это особенно справедливо для исследований в области ассоциативной генетики и генетического картирования, целью которых является поиск маркеров, тесно связанных с хозяйственно-ценными генами для MAS селекции и для выделения этих генов посредством стратегий клонирования на основе генетических карт.

Объекты и методы исследований. В качестве материала для изучения генетического разнообразия зародышевой плазмы винограда были использованы крымские, молдавские и российские аборигены, дикие формы винограда, селекционные сорта и их родительские формы, сорта, официально зарегистрированные в национальном реестре Украины. ДНК была выделена из ткани молодых побегов и листьев, свободных от внешних признаков патологии. Чистоту и количество ДНК оценивали на спектрофотометре "Biophotometer plus" и методом электрофореза в 1% агарозном геле. Количество и чистота экстрагированной ДНК были достаточные для выполнения ПЦР. Полимеразная цепная реакция выполнена на амплификаторе "Mastercycler" фирмы Eppendorf с использованием набора праймеров для амплификации микросателлитных локусов *ssrVVS2*, *ssrVVMD5*, *ssrVVMD7*, *ssrVVMD25*, *VVMD27*, *ssrVVMD28*, *ssrVVMD32*, *ssrVrZAG62* и *ssrVrZAG79*, рекомендованных европейской базой данных винограда (GrapeGen06). Для визуализации продуктов амплификации F-праймер каждого локуса был помечен флюорохромами 6 - FAM, PET, NED или VIC. Размеры аллелей (ПЦР фрагментов) определялись автоматически на генетическом анализаторе 3130 Applied Biosystems с использованием программы GeneMapper 4.0 [4]. В основу анализа ПЦР фрагментов положена современная капиллярная технология электрофоретического разделения флуоресцентно-меченных фрагментов ДНК и определения их размеров. Детекция положения и количественная оценка фрагментов ДНК осуществляется с помощью лазерной системы прибора. Для анализа амплифицированных фрагментов использован набор из 4-х капилляров длиной 36 см, тип полимера POP 7.

Обсуждение результатов. Поскольку большинство древесных культур, в том числе *Vitis vinifera* L, имеют диплоидный набор хромосом, в каждом микросателлитном локусе можно ожидать наличие двух аллелей. После проведения анализа фрагментов амплификации на электрофореграмме следует ожидать наличия сигнала в виде двух пиков (гетерозиготный генотип) или одного пика (гомозиготный генотип), которые соответствуют размеру аллелей каждого локуса (рис.).

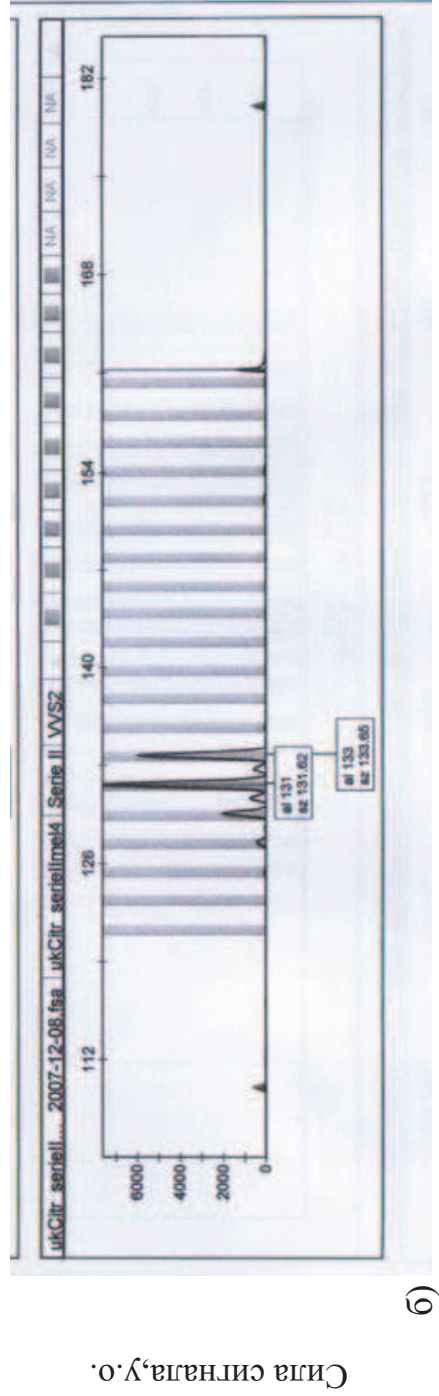
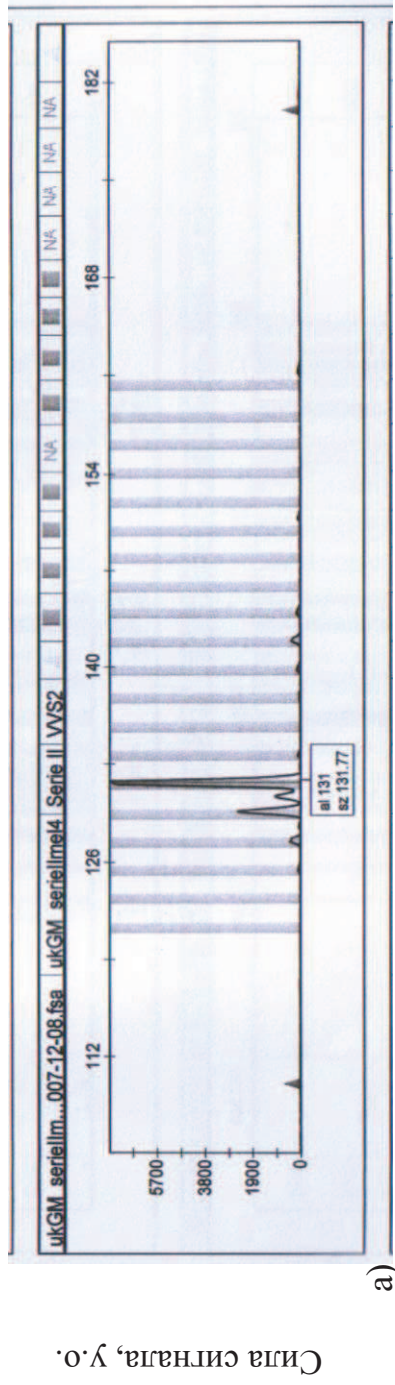


Рис. Молекулярно-генетические профили сортов винограда Гранатовый Магарач и Цитронный (локус VVS2), полученные методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе 3130AB:
 а) гомозиготный генотип; б) гетерозиготный генотип. Цифры соответствуют размеру ПЩР фрагмента.

В случае отсутствия генетического анализатора визуализация продуктов амплификации может быть выполнена методом гель-электрофореза.

Анализ ПЦР-фрагментов был выполнен с использованием контрольных (reference) сортов. По его результатам установлен аллельный состав микросателлитных локусов и их размеры (п.н.), что позволило получить молекулярно-генетические формулы сортов.

Полученные размеры ПЦР фрагментов записываются в виде формул генотипов или молекулярно-генетических паспортов: VVS₂₁₄₁₁₄₉ VVMD₅₂₂₃₂₂₉ VVMD₇₂₄₃₂₅₅ VVMD₂₅₂₄₈₂₄₈ VMD₂₇₁₇₈₁₉₁ VVMD₂₈₂₂₇₂₅₉ VVMD₃₂₂₅₁₂₇₁ VrZAG₆₂₁₈₈₂₀₄ VrZAG₇₉₂₅₀₂₆₀. Рядом с названием SSR-локуса обозначен размер идентифицированных аллелей (ПЦР фрагмента). Название локуса может быть закодировано латинскими буквами. Например, для сорта Португизер формула генотипа может быть записана следующим образом: A₁₄₁₁₄₉ B₂₂₃₂₂₉ C₂₄₃₂₅₅ D₂₄₈₂₄₈ E₁₇₈₁₉₁ F₂₂₇₂₅₉ G₂₅₁₂₇₁ H₁₈₈₂₀₄ I₂₅₀₂₆₀. Этот вариант записи формулы генотипа используется в Украине для кодировки сортов в основном злаковых культур [5]. Однако при анализе единого образца ДНК в разных лабораториях или на генетических анализаторах разных марок иногда выявляют «сдвиг» размеров ПЦР-фрагментов на 1-3 п.н. В связи с этим в рамках совместных европейских программ разработан стандарт для универсального маркирования генотипов винограда с использованием кодов эталонных аллелей [1]. Принцип кодирования заключается в следующем. Аллели каждого локуса генотипов проанализированных контрольных (reference) сортов сгруппированы по возрастанию размера, при этом размер аллеля наименьшей длины, идентифицированный в каждом локусе, обозначен как "n". Размеры всех фрагментов большей длины определены как n + x, где x – количество нуклеотидов, превышающее минимальный размер. Это позволяет преобразовать полученные микросателлитные профили в форму, удобную для сравнения результатов, полученных в разных лабораториях и на приборах разных марок.

Код генотипа, например, сорта Шардоне записывают как: VVS_{2n+14 n+20} VVMD_{5n+12 n+16} VVMD_{7n+8 n+12} VVMD_{25n+4 n+20} VVMD_{27n+6 n+14} VVMD_{28n+2 n+12} VVMD_{32n+4 n+37} VrZAG_{62n+14 n+22} VrZAG_{79n+6 n+8},

а сорта Мерло: VVS_{2n+16 n+28} VVMD_{5n+4 n+14} VVMD_{7n+8 n+16} VVMD_{25n+4 n+14} VVMD_{27n+14 n+16} VVMD_{28n+12 n+19} VVMD_{32n+5 n+5} VrZAG_{62n+20 n+20} VrZAG_{79n+22 n+22}.

Второй вариант записи кодов: поскольку в качестве эталонных аллелей были избирательно выбраны ДНК- фрагменты стандартных (контрольных) сортов, в связи с этим эталонные аллели названы по названию сортов, в генотипах которых они были обнаружены. Например, кодами CF1, TR1 обозначена аллель меньшего размера (1), идентифицированная в генотипе сорта Каберне фран (Cabernet franc, CF), и Траминер (Traminer, TR), соответственно. Коды CF2 или TR2 обозначены аллели большего размера, идентифицированные в генотипах этих же сортов и т.д. Эти же аллели могут быть обнаружены в генотипах разных анализируемых сортов.

Например, формула сорта Шардоне может быть записана:

VVS_{2CH1 CH2} VVMD_{5CH1 CH2} VVMD_{7CF1 TR1} VVMD_{25CS1 CF2} VVMD_{27CF1 CS2} VVMD_{28CH1 CH2} VVMD_{32CS1 MU2} VrZAG_{62CH1 CH2} VrZAG_{79CH1 CH2}.

Однако этот вариант записи генотипа используется значительно реже.

Полученные молекулярно-генетические паспорта могут быть использованы для оценки генетических расстояний между родительскими формами планируемой комбинации скрещивания.

На всех этапах селекционного процесса одним из наиболее важных моментов является оценка наследования и последующий отбор генотипов гибридных семян. Однако оценить гибридный материал на ранних стадиях развития достаточно сложно. В ювенальный период фенотипическое выражение традиционных ампелографических признаков, по которым ведётся селекция, может быть минимальным или вообще отодвинуту на более

поздний период (например, на период созревания урожая). Наиболее эффективно эту проблему можно решить с помощью молекулярно-генетических маркеров.

Идея нашей работы заключалась в тестировании, на ранней стадии развития, гибридных семян на предмет анализа наследования ими родительского генотипа для оценки чистоты проведённой гибридизации. Поскольку микросателлитные локусы наследуются по кодоминантному типу, то характер наследования можно определить по результатам сравнительного анализа спектров аллелей (или микросателлитных профилей) потомка и его родительских форм. Анализ наследования генотипа с помощью SSR-маркеров: VVIn16, VVIp60, VVIv67, VVMD7, VVMD21, VVMD27, VVMD28, VVIq52, VVIv37, VVS2 был выполнен на примере комбинации скрещивания Магарач 11-57-130 × Антей магарачский, в результате которой был получен сорт Гранатовый Магарача. Сорт Гранатовый Магарача представлен в нашем исследовании несколькими образцами, посаженными в коллекцию в разное время. По результатам анализа было установлено, что генотипы 2-х образцов этого сорта отличались по одному из аллелей локусов VVIn16, VVIv67 и VVMD28. Общая доля аллелей в генотипах этих образцов составила 0,7, что свидетельствует о близком их родстве. Вероятно, они были получены вследствие вегетативного размножения двух семян от одного скрещивания. Позднее этот вывод был подтверждён результатами исследования по хлоропластным микросателлитным локусам [6].

Анализ наследования в комбинациях скрещиваний СВ12375 × Кишмиш чёрный, Чауш белый × СВ12375, Чауш белый × СВ20365, Магарач 11-57-130 × Антей магарачский позволил выделить среди гибридных семян ожидаемые генотипы, в соответствии с менделевскими законами расщепления и наследования, которые содержат как материнские, так и отцовские генетические компоненты.

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 основе оценки регистрируемых сортов на соответствие их генотипов критериям ООС-теста (DUS criteria) методом SSR-ПЦР лежит подбор оптимального количества наиболее полиморфных микросателлитных локусов, позволяющих тестировать не только однородность, но и отличимость заявленных сортов. Девять микросателлитных локусов *ssrVVS2*, *ssrVVMD5*, *ssrVVMD7*, *ssrVVMD25*, *VVMD27*, *ssrVVMD28*, *ssrVVMD32*, *ssrVrZAG62* и *ssrVrZAG79*, как было указано выше, были предложены европейской рабочей группой по винограду как необходимый минимальный набор для генотипирования, идентификации, дифференциации и классификации сортов винограда [1].

Определение критерия отличимости заключается в тестировании заявленных сортов на их отличие от близких им генотипов (родительские сорта, сортоотипы, сортогруппы) путем сравнительного анализа спектров микросателлитных локусов. Суть критерия однородности или единообразия заключается в том, что генетически однородные генотипы должны иметь одинаковые ДНК-спектры 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. Однако некоторые сорта обнаруживают внутрисортную изменчивость, которую можно объяснить либо почковыми мутациями, возникающими при вегетативном размножении от одного материнского растения, либо из близкородственных и морфологически сходных семян. В первом случае анализ ДНК при помощи микросателлитов, по-видимому, не способен обнаружить генетические различия, обусловленные почковыми мутациями в процессе неполового размножения из одного материнского растения [7, 8, 9].

Единственные исключения, о которых имеются сообщения, включают различия между биотипами группы Пино, которые могут быть периклинальными химерами и имеют более двух аллелей в одном и том же локусе SSR [10]. Аналогичный результат был получен для сорта винограда Поливитис [3]. В литературе приводятся лишь несколько случаев генетических различий между биотипами, происходящими из одного материнского растения, обнаруженных с использованием AFLP маркеров, которые потенциально лучше подходят для этой цели [9,10,11]. Изменчивость, генерируемая несколькими близкородственными сеянцами, распознаётся SSR маркерами, поскольку, по сути, является не столько внутрисортной, сколько межсортной с высокой степенью сходства [7, 8, 10].

В наших исследованиях идентифицирован один клон сорта Каберне Совиньон, генотип которого отличался от остальных по одному из 25 проанализированных микросателлитных локусов (неопубликовано). В классической работе Moncada et al (2006) автором были проанализированы 59 клонов сорта Каберне Совиньон из семи европейских стран по 84 микросателлитным маркерам. Выделены две группы клонов, сходство генотипов которых составило 98%.

Выводы. К настоящему времени разработана и принята на европейском уровне система обозначения аллелей и записи генотипов винограда, которая позволяет сравнивать генотипы сортов проанализированных в разных лабораториях.

Для создания формулы генотипа (молекулярно-генетического паспорта) необходимо проанализировать сорта по 9 микросателлитным локусам: *ssrVVS2*, *ssrVVMD5*, *ssrVVMD7*, *ssrVVMD25*, *VVMD27*, *ssrVVMD28*, *ssrVVMD32*, *ssrVrZAG62* и *ssrVrZAG79*. Таким образом генетический паспорт сорта отражает аллельный состав 9 проанализированных локусов. Полученные молекулярно-генетические паспорта изученных нами образцов винограда объединены в базу данных и могут быть использованы в селекционном процессе для более эффективного подбора родительских пар при генеративной селекции.

Селекционные сорта идентифицируют на основе оценки происхождения, при этом общая доля аллелей у потомка с родителем в F1 должна составлять более 50%.

Установлено, что в некоторых случаях, например для генотипирования и/или идентификации близкородственных сортов, а также оценки происхождения селекционных сортов или гибридных форм, может возникнуть необходимость в увеличении количества SSR маркеров до 22-25. Однако для оценки гетерогенности клонов использование этих маркеров ограничено. Для подобных исследований используются преимущественно RAPD, ISSR, AFLP.

Установлено, что генетическую чистоту гибридных сеянцев на ранней стадии их развития, то есть качество гибридизации, можно оценить экспресс-методом, основанным на использовании молекулярно-генетических маркеров. Это позволит проводить выбраковку примеси среди сеянцев и избежать финансовых потерь, связанных с их дальнейшей многолетней селекцией.

Молекулярно-генетические паспорта как элемент регистрации сортов позволяют повысить уровень защиты интеллектуальной собственности.

Литература

1. This P., Jung A., Boccacci 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. – 59. – P. 169-178.

4. Методика генотипирования, идентификации и регистрации генотипов винограда с помощью анализа микросателлитных локусов (SSR-PCR)// РД 00 384830 – 064 – 2010. – 21 с.
5. Сиволап, Ю.М. Методические рекомендации. Ідентифікація і реєстрація генотипів м'якої пшениці, ячменю, кукурудзи, соняшника за допомогою аналізу микросателітних локусів / Ю.М. Сиволап, В.В. Волкодав, М.С. Бальвінська [и др.]. – Одесса.– 2004. – 14 с.
6. Goryslavets S., Risovanna V., Bacilieri R., Hausman J.F. and Heuertz M. A parentage study of closely related Ukrainian wine grape varieties using microsatellite markers //Cytology and Genetics. – 2010. – Vol. 44. – №.2. – P. 95–102.
7. Thomas, M.R. & N.S. Scott, 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequencetagged sites (STSs) // Theor Appl Genet 86: 985–990
8. Bowers, J.E., G.S. Dangl, R. Vignani & C.P. Meredith, 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.)// Genome 39: 628–633.
9. Cervera, M.T., J.A. Cabezas, J.C. Sancha, F.Martinez de Toda&J.P. Martinez-Zapater, 1998. Application of AFLPs to the characterisation of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain) // Theor Appl Genet 97: 51–59.
10. Filippetti, C. Intrieri, M. Centinari, B. Bucchetti and C. Pastore: Molecular characterization of officially registered Sangiovese clones and other Sangiovese-like biotypes in Tuscany, Corsica and Emilia-Romagna // Vitis, 2005 44(4), 167-172)
11. Scott, E.M. Ablett, L.S. Lee1 & R.J. Henry.AFLP markers distinguishing an early mutant of Flame Seedless grape K.D // Euphytica 113: 245–249, 2000.
12. Moncada X., Pelsy F., Merdinoglu D. and Hinrichsel P. Genetic diversity and geographical dispersal in grapevine clones revealed by microsatellite markers// Genome/ - 2006- 49:1459 – 1472.