АДАПТАЦИЯ МЕТОДИКИ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ СОРТОВ ВИНОГРАДА ПИНО БЕЛЫЙ, РИСЛИНГ И ИХ КЛОНОВ

Звягин А.С., Трошин Л.П., Мухина Ж.М., Супрун И.И.

Кубанский государственный аграрный университет (Краснодар)

Выведение новых сортов сельскохозяйственных культур основано на использовании природного или созданного человеком генетического разнообразия. Для обнаружения, оценки и охраны этого разнообразия, отбора растений, несущих хозяйственно ценные признаки, и отслеживания этих признаков в процессе селекции используют легко распознаваемые фенотипические проявления генов - маркеры.

Издавна применяемые в этих целях морфологические и биохимические маркерные признаки указывают на особенности формы, окраски или биохимического состава растения. Число их не так уж и велико, к тому же полигенная структура многих признаков строения и состава растений ограничивает возможности генетического картирования агрономически важных генов и контроля над переносом этих генов в новые формы растений.

Развитие методов молекулярной биологии, в частности, таких как рестрикционный анализ, полимеразная цепная реакция (ПЦР) - амплификация ДНК, сиквенс ДНК - определение последовательности ДНК - привело к появлению нового класса молекулярно-генетических маркеров — фрагментов ДНК, соответствующих нуклеотидным последовательностям, входящих непосредственно в структуру агрономически важного гена или сцепленного с этим геном. Высокая степень полиморфизма, характеризующая один из видов молекулярных маркеров – микросателитные последовательности (SSRs) - микросателитные ДНК-маркеры, позволяет использовать их при изучении генетического разнообразия виноградных клонов и сортов.

Целью работы являлся анализ генетического разнообразия сортов и их клонов винограда с использованием полиморфизма микросателлитных ДНК-маркеров.

Для проведения исследований были использованы генотипы винограда из коллекции учхоза «Кубань» КГАУ: сорт Пино белый и клон Пино белый Стадорнова, сорт Рислинг и клон Рислинг анапский.

Для выделения ДНК использовали бесхлорофилльные листья, получаемые путем проращивания черенков в камерах с водой в темноте, при температуре 25-27 ^{0}С.

Экстракцию ДНК проводили, используя три методики:

1) CTAB-метод (Doyle & Doyle, 1987);

2) экстракция ДНК с использованием сорбента SiO_2;

3) CTAB-метод, модифицированный для винограда (Doyle & Doyle, 1990) – эта методика была модифицирована за счет использования NaCl для удаления полисахаридов и PVP (Polyvinylpyrrolidone) - для удаления полифенолов по следующей схеме.

Литья растирали в жидком азоте до состояния светло-зеленой пудры, которую затем вносили в микропробирки, с прогретым до 60 °С 2*CTAB буфером, содержащим 2% CTAB (цетилтриметиламмоний бромид), 1,4 М хлористого натрия, 0,1 М Трис-гидрохлорид, 20мМ ЭДТА (этилендиаминотетраацетат). При этом соблюдали соотношение 500 мкл буфера на 0,1 г ткани. Образцы инкубировали 1 ч при 60 °С, после чего вносили равный объем хлороформа при перемешивании в течение 20 мин. На следующем этапе образцы центрифугировали 10 минут при 8 тыс.об. мин., отбирали супернатант и добавляли к нему 0,2 V 5*CTAB буфера, содержащего 5% CTAB и 350 мМ ЭДТА, и инкубировали 20 минут при 60 °С.

После инкубации в пробирки с образцами вносили равный объем хлороформа и инкубировали при перемешивании 20 минут, центрифугировали 10 минут при 5 тыс.об. мин., отбирали верхнюю фазу, в чистую пробирку добавляли равный объем буфера для преципитации (1% CTAB, 50мМ Трис-НС1, ЭДТА) и оставляли на ночь при комнатной температуре.

После преципитации ДНК осадок растворяли в 500 мкл солевого буфера (1 М NaC1, 10мМ Трис-НС1, 1мМ ЭДТА), добавляли 1 мл этилового спирта (96 %) и ставили в -20 °С на 2-3 ч. По истечении этого времени центрифугировали образцы 10 минут при 13 тыс.об.мин., после чего осадок промывали 70 % этиловым спиртом, высушивали и растворяли в 50 мкл ТЕ (ТРИС-ЭДТА 1м).

Концентрацию выделенной ДНК определяли спектрофотометрическим по стандартной методике (Маниатис и др., 1984), а также методом разведений полученных препаратов с последующим их электрофорезом в 2% агарозном геле, содержащем 1мкг/мл бромистого этидия и визуализацией в ультрафиолете. При этом исходили из того, что порог чувст-

вительности бромистого этидия в агарозных гелях составляет 10 нг ДНК (Остерман Л.А., 1981).

Для анализа генетического разнообразия клонов коллекции были использованы 6 нейтральных микросателлитных маркеров: VRZAG79, VVMD5, VVMD7 (Bowers and Meredith, 1997), VRZAG62 и VVS2 (Thomas and Scott, 1993).

Праймерные пары, фланкирующие указанные микросателлитные локусы, были синтезированы фирмой ЗАО «Синтол», Россия.

В ходе исследования для всех маркеров были использованы одинаковые условия ПЦР, позволяющие получить максимальное количество продукта реакции. Наряду с этим при таких условиях реакции возможен повышенный выход неспецифически-амплифицированных фрагментов, однако для определения наличия-отсутствия разницы в размерах продуктов реакции, а не ее величины, это не является серьезной помехой.

Ниже приведены параметры ПЦР, использованные в данном эксперименте: 9 минут при 94 ^{o}C - начальная денатурация, следующих 35 циклов:

30 секунд денатурация при 94 ^{o}C,
1 минута отжиг праймеров при 55 ^{o}C,
2 минуты синтез при 72 ^{o}C;
последний цикл синтеза 5 минут при 72 ^{o}C.

Изначально температура отжига праймеров была рассчитана по формуле: T= 4 °C x (C + G) + 2 °C X(A + T)-3, где G, C, A, T - количество гуанидиновых, цитозиновых, адениновых и тиминовых оснований, соответственно. В дальнейшем эмпирически подобрали оптимальную температуру для каждой праймерной пары путем уменьшения или увеличения ее, в зависимости от качества получаемого ПЦР-продукта.

ПЦР-смесь включала: вода для ПЦР - 11,5 мкл, буфер – 2,5, dNTP (дезокситуклеотидтрифосфатов) – 3 мкл, 3 мкл ДНК, 2 мкл каждого праймера, 1 мкл Taq-полимеразы, в общем объеме 25 мкл.

Амплификация была проведена в амплификаторе Терцик МС-2, производства НПО «ДНК-технологии», Россия.

Для электрофоретического разделения продуктов ПЦР использовали 8%-ный акриламидный гель на основе 1 х Трис-боратного буфера (0,09 М Трис, 0,09 М борной кисло-

ты, 2мМ ЭДТА, pH=8,2). Полимеризацию геля проводили при комнатной температуре в течение 1 ч. 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.

После окончания полимеризации лунки геля промывали электродным буфером (1^xТрис-боратный буфер) и проводили предварительный электрофорез без внесенных образцов, для удаления из геля остатков катализаторов и незаполимеризовавшегося акриламида, при напряжении 150У, в течение 1 ч. После чего вносили в лунки геля по 10 мкл продуктов амплификации в неденатурирующем буфере нанесения (40 % сахароза, 0,025% бромфеноловый синий, 0,025% ксиленцианол) , при этом соблюдали соотношение: продукты ПЦР/буфер нанесения = 5/1.

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

Идентификацию и определение размеров аллелей микросателлитных локусов проводили с использованием программы Gel-Pro Ana1yzer 3.1.

Анализ данных показал, что генотипы сортогруппы Пино заметно различались по исследованным маркерам: по VVMD5 размер аллелей у сорта Пино белый составил 276 пар нуклеотидов (пн), у клона Пино белый Стадорнова - 258 пн; по маркеру VVMD7 - у Пино белого 248 пн, а у Пино белого Стадорнова 254 пн; по маркеру VVMD27 - соответственно по Пино белому 185 пн, а у Пино белого Стадорнова 197 пн. У образцов сортогруппы Рислинг по маркеру VRZAG79: у сорта - 247 пн, у клона Рислинг анапский – 251 пн (таблица).

ДНК-фингерпринт клонов винограда

	Рислинг	Рислинг анапский	Пино белый	Пино белый Стадорнова
VVMD5	252	252	276	258
VVMD7	256	256	248	254
VRZAG79	247	251	261	261
VRZAG62	205	204	204	205
VVS2	152	152	151	150
VVMD27	186	186	185	191

Это свидетельствует о наличии полиморфизма исследуемых популяций – клоны различаются по данным микросателлитным локусам и потому их обоснованно можно передавать как высокопродуктивные мутанты на госиспытания.

Вывод: Уровень полиморфизма, выявленный в результате данного исследования, позволяет говорить о перспективности использования микросателитных ДНК-маркеров для паспортизации генотипов винограда, созданных клоновой селекцией.

Опубликовано в сборнике

«Новации и эффективность производственных процессов в виноградарстве и виноделии».

– Т. II. Виноградарство.

– Краснодар, 2005. – С. 113-117.