REPORT ABOUT A TRAINING AT THE PUBLIC RESEARCH CENTREGABRIEL LIPMANN

Svetlana Gorislavets[1], Dr. Jean-Francois Hausman[2], Nathalie Nicot[2]

[1]Dept. of Grape Breeding, Genetics and Ampelography of the Institute Vine Wine "Magarach", Ukraine

e-mail:goricvet_2@rambler.ru

[2]Centre de Recherche Public-Gabriel Lippmann (CRP-GL)

Cellule de Recherche en Environnement et Biotechnologies (CREBS), Luxembourg

The training took place at the Public Research Centre Gabriel Lippmann (Research Unit in Environment and Biotechnologies) and lasted from 5th May till 30th July 2004. The aim of the training was to develop knowledge, experience and skill to perform molecular biology techniques in order to identify genetic diversity of grape. The work was done under the supervision of Dr. J-F. Hausman and Nathalie Nicot, one employee of the laboratory.

The program of the training encompassed the following issues.

1. A bibliography summary on molecular markers used to study plant genetic diversity.

According to the bibliography, a method based on microsatellites markers (Single Sequence Repeat) was considered as the easier technique to generate molecular informations on plant genetic diversity. Microsatellites data permitted ampelographic studies and also a better identification of varieties: their origins and relationships. It will later lead to the detection of synonyms and impurities in ampelographic collections.

2. Introduction to biotechnological methods used in the CRP-GL laboratory.

Microclonal propagation method on potato (*Solanum tuberosum*) was studied.

3. Mastering of usually used methods in molecular biology.

A plasmid carrying PCR DNA fragment of ash (*Fraxinus*) was used to study cloning technique.

The following methods were realised.

- Rapid cloning of the PCR product into the plasmid using the TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen);
- Transformation of competent cells of *E.coli* using the TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen);
- Extraction and purifycation of plasmid;
- Analysis of transformed plasmids by using restriction enzymes to confirm the DNA transformation;
- Analysis of transformants by PCR using different primers for direct evaluation of positives transformants;
- Protocols for purifying PCR products:

a) using Specific column (Protocol Mini Kit Qiagen);

b) by recovery DNA from agarose gel.

4. The standard DNA extraction protocol used in the laboratory was mastered.

DNA was extracted from potato leaves and tuber and from leaves of the Crimea autohthonous grape variety Kassara. The quality of DNA extraction was checked on agarose gel. The quantity and purity of extracted DNA were determined by spectrophotometry at 260 and 280 nm. Methods of DNA extraction with or without RNase were studied on a comparative basis.

Additional protocols were used on extracted DNA to decrease quantity of proteins (a) and to concentrate DNA (b).

a) phenol chloroform extraction;
b) ethanol precipitation

5. PCR (Polymerase Chain Reaction) was mastered, including the following tasks:
- calculation of concentrations and preparation of primers stock solutions and mix solution;
- optimisation of amplification conditions (temperatures, concentration of primers and dNTP).

The final step of the training was dedicated to DNA extraction and analysis of 7 varieties of grape:

The Georgia autochtonous variety Saperavi (Sp), varieties Cabernet Sauvignon (KS), Mayskii Cherniy (M), the interspecific hybrid Seyve Villard (Sv) and four hybrid varieties (see note) which have the former of four varieties in their pedigrees . These four hybrids were released from breeding activities of the Institute "Magarach". Young shoots were collected from plants grown in the ampelographic collection of this Institute. DNA was extracted from young leaves tissue according to the protocol mastered.

After the checking of quality and purity of extracted DNA , amplification was carried out.

Three microsatellite primers (VVS2, VVMD7, VVMD27) were chosen for studing and testing varieties according to the IPGRI recommendations. Amplification products were visualized on a 4% agarose gel electrophoresis with an ethidium bromide staining (Fig.). Polymorphism was detected for the three primers pairs used . The origins of some varieties could be identified by this way. Amplifications in two varieties were insufficient, which were probably due to primers mispairing or amplifications conditions.

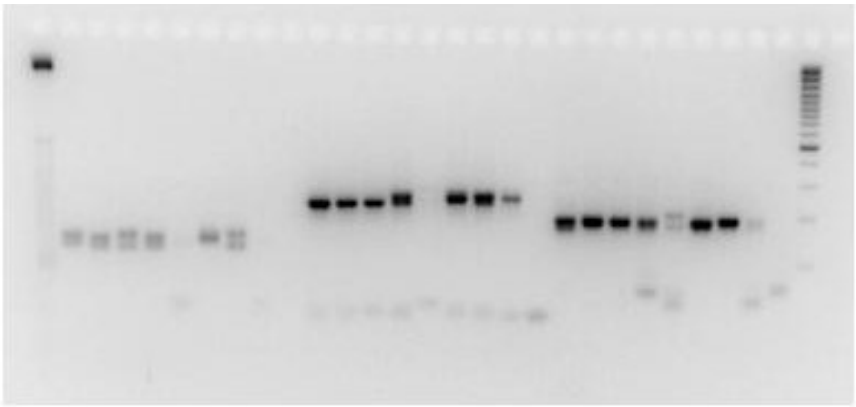

Fig. Polymorphism of grape varieties detected by three primer pairs: VVS2, VVMD7, VVMD27

Note. The cultivars Rubin Golodrigi (Rg); Antey magarachskii (At); Granatovii Magaracha (Gr); Rubin Golodrigi (RG).

Acknowledgements:

I acknowledge Dr.J.Turok and Dr J.-F. Hausman for the possibility of training in a well equipped laboratory, for support and assistance of highly-qualified specialists of the Cellule de Recherche en Environnement et Biotechnologies laboratory, especially Nathalie Nicot, Daniel Reisen, Sandra Gigliotti, Daniel Evers and Laurent Solinhac.

ОТЧЕТ О СТАЖИРОВКЕ IPGRI В ЦЕНТРЕ ГОСУДАРСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ GABRIEL LIPPMANN

Гориславец С.М.[1], Dr. Jean-Francois Hausman[2], Nathalie Nicot[2]

[1]*Институт Винограда и Вина "Магарач"*

[2]*Centre de Recherche Public-Gabriel Lippmann (CRP-GL)*

Cellule de Recherche en Environnement et Biotechnologies (CREBS), Luxembourg

Стажировка проходила с 5 мая по 30 июля 2004 года в Центре Государственных исследований – Gabriel Lippmann Люксембург.

Цель стажировки – освоение современных молекулярных методов идентификации генетического разнообразия винограда. Руководитель стажировки Dr. J.-F. Hasman. Работа выполнялась под непосредственным руководством Nathalie Nicot.

Стажировка включала следующие основные пункты:

1. Анализ научных публикаций о методах изучения генетического разнообразия растений с использованием молекулярных маркеров.

Анализ научных публикаций показал, что в настоящее время одним из наиболее информативных методов изучения генетического разнообразия растений на молекулярном уровне считается метод анализа ДНК с использованием микросателлитных (SSR) маркеров. Применение этого метода для изучения винограда, в дополнение к его ампелографическому изучению позволяет более точно идентифицировать сорта, их происхождение и взаимосвязь, выявлять синонимы и примеси на коллекции.

2. Ознакомление с биотехнологическими методами, используемыми в данной лаборатории

Метод микроклонального размножения на примере картофеля (*Solanum tuberosum*).

3. Освоение методов обычно используемых молекулярной биологии.

В качестве объекта исследования использовали плазмиду с клонированной ДНК тополя (*Fraxinus Rubrus*).

В процессе работы мною освоены следующие методы:

- Клонирование ПЦР продукта в плазмиду с использованием быстрого протокола TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen);
- Трансформация химически компетентных клеток *E.coli* с использованием протокола TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen);
- Экстракция и очистка плазмид;
- Анализ трансформированных плазмид с помощью рестрикционных ферментов для подтверждения наличия трансформации ДНК.
- Анализ трансформантов посредством ПЦР с различными праймерами для прямой оценки позитивной трансформации;
- Методы очистки ПЦР продуктов:

а) с использованием Specific colomn (Protocol Mini Kit Qiagen):

б) восстановлением ДНК из агарозного геля.

4. Освоение методики экстракции ДНК из ткани растений.

Собрана и проанализирована литература о методах экстракции ДНК из ткани растений.

Освоена методика экстракции ДНК из ткани листа и клубня картофеля и ткани листа крымского аборигенного сорта Кассара по стандартной методике, отработанной в этой лаборатории. Качество экстракции ДНК было проанализировано в агарозном геле.

Количество и чистота экстрагированной ДНК была оценена на спектрофотометре при 260 и 280 нм. Проведен сравнительный анализ методов экстракции ДНК с использованием РНКазы и без нее. Освоены дополнительные протоколы экстракции ДНК для уменьшения количества белков (а) и концентрации ДНК (б)

а) Фенол хлороформ экстракция;

б) Преципитация этанолом

5. Освоен метод Полимеразной Цепной Реакции (ПЦР):

- расчет концентраций обычно используемых стокових растворов праймеров и их приготовление;

- подбор оптимальных условий проведения реакции амплификации (температурный режим; концентрации праймеров и набора трифосфатов

Заключительный этап стажировки был посвящен экстракции и анализу ДНК винограда.

В качестве объекта исследований были использованы грузинский аборигенный сорт Саперави, сорт Каберне Совиньон и 5 гибридных сортов, для которых они являются родительскими формами. Эти 5 сортов получены в результате селекционной работы, проведенной в ИВиВ "Магарач". Молодые побеги винограда были отобраны на ампелографической коллекции ИВиВ "Магарач".

ДНК из ткани молодого листа экстрагировали по освоенной методике.

После оценки чистоты и качества ДНК, была проведена реакция амплификации.

Для изучения отобранных сортов были использованы 3 микросателлитных праймера, рекомендованных IPGRI: VVS2; VVMD7; VVMD27. Продукты амплификации проанализированы методом электрофореза в 4% агарозном геле и визуализированы с использованием Етидиум Бромида (EtBr) (ethidium bromide staining) (Рис). На рисунке представлены спектры продуктов амплификации. Отмечено наличие полиморфизма у изученных сортов по всем 3 праймерам. Для некоторых сортов по ПЦР продуктам можно проанализировать их происхождение. Некоторые сорта показали недостаточный уровень амплификации, что возможно связано с условиями амплификации или праймерами.

Опубликовано в:
It is published in:

"Development of National Programmes on Plant Genetic Resources in Southeastern Europe - Conservation of Grapevine in the Caucasus and Northern Black Sea Region". Second Project Meeting, 16-18 September 2004, Yalta, Ukraine. Book of abstracts English/Russian. Institute Vine & Wine Magarach and International Plant Genetic Resources Institute." – PP. 55-59.