



*В.И.Рисованная, к.б.н., зав. лабораторией молекулярно-генетических исследований,
отдел селекции, генетики винограда и ампелографии,
Национальный институт винограда и вина «Магарач»*

ОЦЕНКА ЧИСТОТЫ ГЕНЕРАТИВНОГО ПОТОМСТВА ВИНОГРАДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

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 ювенильный период фенотипическое выражение традиционных ампелографических признаков или признаков, по которым ведётся селекция, может быть минимально или вообще отодвинуто на более поздний период (например, на период созревания урожая). Наиболее эффективно эту проблему можно решить с помощью молекулярно-генетических маркеров. По мнению некоторых авторов, к ним можно отнести не только молекулярные (ДНК-маркеры), но биохимические маркеры. Другие авторы выделяют их в два самостоятельных класса генетических маркеров [1, 2]. Длительное время, до наступления "эры молекулярных маркеров", к наиболее распространенному типу биохимических маркеров при изучении генетической изменчивости относили локусы, кодирующие изоферментные спектры. Изоферментные локусы являются более значимыми генетическими маркерами в сравнении с большей частью морфобиологических признаков. Раннее нами было установлено, что изоферментный состав изученных ферментов (GPI, IDH, 6PGD, SOD) определяется генетическими факторами, стабилен при вегетативном размножении и подчинен менделевским принципам наследования. Исследования были проведены на сортах винограда разных эколого-географических групп *Vitis vinifera sativa occidentalis* Negr., *Vitis vinifera sativa orientalis* Negr., *Vitis vinifera sativa orientali-mediterranea* Gram., *Vitis vinifera sativa pontica* Negr. [3-6]. Однако при этом они имеют некоторые слабые моменты. Не все ферментные системы отличаются стабильностью, их спектр может зависеть от типа анализируемой ткани, а также от стадии развития растений. Кроме того, локусы изоферментов контролируют незначительную часть изменчивости генома и безусловно уступают по информативности ДНК-маркерам. Тем не менее, биохимические маркеры остаются востребованными, для решения некоторых вопросов, актуально их использование в качестве оценки, предшествующей анализу с использованием ДНК-маркеров. Необходимо отметить, что биохимический маркер представляет собой "генетически детерминированный полиморфизм отдельного белка, отражающий изменчивость определенного структурного гена", а не просто содержание тех или иных химических или биохимических веществ у гибридных семян [1]. К методам молекулярного маркирования можно отнести методы молекулярной и биохимической генетики - PCR, SSR-анализ и электрофоретическое разделение белков. Электрофоретическое разделение белков позволяет обнаруживать аллельные варианты генов, контролируемых множественные молекулярные формы белков.

Предложен экспресс-метод оценки генетической чистоты селекционных семян или качества гибридизации по биохимическим и молекулярным маркерам.

Идея нашей работы заключалась в тестировании на ранней стадии развития гибридных семян на предмет анализа наследования ими родительского генотипа для оценки проведенной гибридизации. В основу оценки положен анализ отношения родитель - потомок с помощью биохимических и молекулярных генетических маркеров. К наиболее популярным в настоящее время молекулярным маркерам относятся SSR-маркеры, которые представляют собой определенные фрагменты ДНК [7].

Характеристика растительного материала. Материалом для исследования послужили родительские формы Кишмиш черный, Чауш белый (женский тип цветка), СВ12375, СВ20365, Антей магарачский и 33 гибридных семян, полученные от следующих комбинаций скрещивания:

- СВ12375 x Кишмиш черный;
- Чауш белый x СВ12375;
- Чауш белый x СВ20365;
- Магарач 11-57-130 x Антей магарачский.

Методы. Родители и их потомки первых 3 комбинаций скрещивания были проанализированы по спектрам 4 ферментных систем и 7 полиморфным локусам их кодирующим: 6-фосфоглюконатдегидрогеназа 1, 2 (6PGD1,2); глюкозофосфатизомеразы 2 (GPI2); супероксиддисмутаза 1, 2, 3 (SOD1,2,3); изоцитратдегидрогеназа (IDH). Электрофоретическое разделение белков проводили в вертикальных блоках полиакриламидного геля в трис-ЭДТА-боратной буферной системе по методике [3]. Сеянцы сорта Гранатовый Магарача, полу-

ченные в результате скрещивания гибридной формы Магарач 11-57-130 и сорта Антей магарачский, были отобраны на ампелографической коллекции и проанализированы методом SSR PCR по 10 микросателлитным локусам: VVS2, VVMD7, VVMD21, VVMD27, VVMD28, VVIn16, VVIp60, VVlq52, VVlv67, VVlv37. PCR была выполнена на амплификаторе фирмы Eppendorf, а SSR-анализ - на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130XL (Applied Biosystems) [8].

Анализ наследования родительского генотипа гибридными сеянцами для контроля чистоты проводимой гибридизации с использованием биохимических (изоферментных) и молекулярных маркеров предполагает знание генотипов родительских форм и их потомства по ферментным и микросателлитным локусам. Исследовательская работа была выполнена в три этапа. На первом этапе был обоснован методический подход к оценке характера наследования изоферментов. Для этой цели с ампелографической коллекции НИВиВ «Магарач» было отобрано 55 сортов, включающих 24 селекционных и 31 родительский сорт. Поскольку все селекционные сорта, взятые нами для исследования, являются гибридами и известны их родительские формы, то характер наследования изоферментов определяется по результатам сравнительного анализа спектров изоферментов сортов-гибридов и их исходных форм. Все сорта были проанализированы по спектрам ферментов GPI1, GPI2, 6PGD1, 6PGD2, SOD1, SOD2, SOD3 и IDH. В результате проведенного анализа наследования изоферментов выявлены различные примеры моногенной гипотезы наследования изоферментов. Установлено, что изоферменты, принадлежащие к одной ферментной системе, в основном наследуются по законам Менделя и контролируются кодоминантными аллелями соответствующего локуса. Некоторые "отклонения" объясняются тем, что в анализ был включен коллекционный материал, в силу специфики формирования коллекций, разнообразие генотипов ограничено в сравнении с тем, которое наблюдается у гибридных семян.

Таблица

Микросателлитные профили образцов сорта Гранатовый Магарача, и их отцовского сорта Антей магарачский

| Сорт | Микросателлитные локусы | | | | | | | | | |
|-------------------------|-------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|
| | VVIn16 | VVIp60 | VVlv67 | VVMD7 | VVMD21 | VVMD27 | VVMD28 | VVlq52 | VVlv37 | VVS2 |
| Антей магарачский ♂ | 147/151 | 315/315 | 334/369 | 239/249 | 247/247 | 176/186 | 235/235 | 79/79 | 149/159 | 131/143 |
| Гранатовый Магарача (1) | 147/151 | 315/319 | 334/353 | 239/243 | 247/247 | 176/178 | 235/235 | 79/79 | 149/159 | 131/131 |
| Гранатовый Магарача (2) | 147/149 | 315/000 | 334/369 | 239/243 | 247/247 | 176/178 | 235/245 | 79/79 | 149/159 | 131/131 |

Оценка чистоты гибридных сеянцев на ранней стадии развития. На основании полученных результатов был проведен анализ характера наследования изоферментов гибридными сеянцами в трех указанных вариантах скрещивания. Электрофоретическое разделение смеси белков, экстрагированных из ткани листа родительских форм и гибридных сеянцев, выполнено в одном блоке полиакриламидного геля, в результате чего получены их спектры изоферментов. Генотипы были определены по спектрам изоферментов и локусам их кодирующим: Gpi₁, Gpi₂, 6Pgd₁, 6Pgd₂, Sod₁, Sod₂, Sod₃ и Idh. Анализ наследования позволил выделить среди гибридных сеянцев ожидаемые генотипы, в соответствии с законами моногенного расщепления и наследования, которые содержат как материнские, так и отцовские генетические компоненты. Кроме того, были выделены и образцы, имеющие нетипичные спектры изоферментов и, следовательно, нетипичные генотипы, что связано с генетическим или механическим загрязнением. По отдельным локусам были выявлены:

- генотипы сеянцев, характерные для материнской формы. Следовательно, вместо перекрестного опыления родительских форм произошло самоопыление материнской формы;

- генотипы сеянцев, содержащие один компонент идентичный материнскому, а второй компонент не идентичный отцовскому, что связано с присутствием чужеродной пыльцы;

- генотипы сеянцев не содержат ни материнского, ни отцовского компонента, что может быть связано с механической примесью.

Анализ наследования генотипа с помощью SSR-маркеров рассмотрим на примере комбинации скрещивания Магарач 11-57-130 x Антей магарачский в результате которой был получен сорт

Гранатовый Магарача. Сорт Гранатовый Магарача представлен в нашем исследовании несколькими образцами, подсаженными в коллекцию в разное время.

Различные аппликоны (фрагменты ДНК), полученные в результате амплификации (PCR) ДНК сорта Антей магарачский (♂) и образцов сорта Гранатовый Магарача, были секвенированы. Результаты секвенирования представлены в виде длин аллелей микросателлитных локусов и регистрируются в парах нуклеотидных оснований (пн) (табл.).

Поскольку микросателлитные локусы наследуются по доминантному типу, то характер наследования можно также определить по результатам сравнительного анализа спектров аллелей (или микросателлитных профилей) потомка и его родительских форм. По результатам анализа один из образцов сорта Гранатовый Магарача не соответствовал остальным образцам и родительскому сорту практически по всем микросателлитным локусам и был исключён из дальнейшего анализа как вероятная примесь. Далее было установлено, что генотипы остальных образцов наследуют по одному аллелю от Антея магарачского по всем микросателлитным локусам.

Генотипы этих образцов сорта Гранатовый Магарача отличались между собой по одному из аллелей локусов VVIn16, VVlv67 и VVMD28. Таким образом, общая доля аллелей в генотипах двух образцов сорта Гранатовый Магарача составила 0,7, что свидетельствует об их близком родстве. Вероятно они были получены вследствие вегетативного размножения двух сеянцев от одного скрещивания. Позднее этот вывод был подтверждён результатами исследования по хлоропластным микросателлитным локусам.

Наши исследования показали, что генетическую чистоту гибридных сеян-

цев на ранней стадии их развития, т.е. качество гибридизации, можно оценить экспресс-методом, основанным на использовании молекулярно-генетических маркеров. Это позволит проводить выбраковку примеси среди сеянцев, т.е. избежать финансовых потерь, связанных с их дальнейшей многолетней селекцией, а также указывать в родословной селекционных форм и сортов точные данные об исходных формах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. - М.: Агропромиздат, 1985. - 271 с.
2. Глазко В.И., Созинов А.И., 1993. Генетика изоферментов животных и растений. - К.: Урожай, 1999. - 528 с.
3. Ключева В.И., Трошин Л.П., Шуршал А.В., Ракитская, Т.А., Животовский, Л.А. Идентификация видов, сортов и клонов винограда по белкам как маркерам генов: Метод. рекомендации. - М., 1990. - 35 с.
4. Рисованная В.И., Трошин Л.П., Ракицкая Т.А., Лазерный О.Е., Шуршал А.В., 1996. Идентификация фенотипов винограда по спектрам изоферментов // Виноград и вино России. - 1996. - №4. - С.14-17.
5. Рисованная В.И., Полулях А.А., Трошин Л.П., 1996. Изменчивость сортов *Vitis vinifera* *ponica* Negr. по изоферментным спектрам // Проблемы дендрологии, цветоводства, плодородия, виноградарства и виноделия: Матер. междунар. конф. - Ялта: ИВиВ «Магарач». - С.87-92.
6. Рисованная В.И., Трошин Л.П. Анализ фенотипа винограда методами биохимической генетики // Научные труды КГАУ. - Вып. 394(422). - Краснодар, 2002.
7. This P., Jung A., Voccacci P. et al. 2004. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. Theor. Appl. Genet. - 109. - 2004. -P.1448-1458.
8. S. Goryslavets, V. Risovanna, R. Bacilieri, J.-F. Hausman, M. Heuertz A parentage study of closely related Ukrainian wine grape cultivars using microsatellite markers //Cytology and Genetics (in press). - 2009.

Поступила 04.02.2009
©В.И.Рисованная, 2009