

УДК 634.8 : 57.5 : 581.1.036

ОЦЕНКА ПОЛИМОРФИЗМА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА *VvZFPL*, УЧАСТВУЮЩЕГО В ФОРМИРОВАНИИ УСТОЙЧИВОСТИ ВИНОГРАДА К НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМУ СТРЕССУ

Супрун И.И., канд. биол. наук, Ильницкая Е.Т., канд. биол. наук,
Токмаков С.В., канд. биол. наук

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства» (Краснодар)

Реферат. Проведено сравнение сиквенсов последовательности гена *VvZFPL*, участвующего в формировании устойчивости винограда к низким температурам, в генотипах сортов винограда контрастных по признаку морозоустойчивости. Выявлен SNP-полиморфизм.

Ключевые слова: виноград, морозоустойчивость, ген *VvZFPL*, секвенирование, низкие температуры

Summary. The comparison of sequence of gene *VvZFPL*, follow, participated in the vine tolerance to cold, was compared in the genotypes of grapes varieties contrastive in frost tolerance. SNP-polymorphism was revealed.

Key words: Vine, frost tolerance, *VvZFPL* gene, sequencing, low temperatures

Введение. Согласно современным научным представлениям, устойчивость винограда к комплексу неблагоприятных зимних условий, условно определяемую как морозоустойчивость, зависит от генетических свойств сорта, физиологического состояния растения в период холодов, условий его выращивания, применяемой агротехники, возрастных этапов и характера проявления низких температур [1, 2].

Виноградное растение обладает генетически наследуемой способностью противостоять воздействию низких температур в определенных пределах. За этим пределом в растении проходят необратимые процессы, при которых отдельные органы или куст в целом вымерзают. Так, амурский виноград и северо-американские виды обладают большей морозоустойчивостью, чем европейский виноград. Это свойство успешно используется в селекции для создания сортов – межвидовых гибридов с целью повышения устойчивости европейского культурного винограда к низким отрицательным температурам.

Реализация наследственной морозоустойчивости сорта имеет зависимость от внешних условий года, особенно влияет период, когда происходит подготовка насаждений к перезимовке и условия сезона холодов. Так, благоприятные погодные условия для вызревания и закаливания лозы, постепенное снижение температуры и стабильные морозы среднего уровня в течение зимнего периода могут повысить морозоустойчивость у генотипически среднеустойчивого сорта. И напротив, неблагоприятные условия года, наряду с несоблюдением агротехники и неблагоприятным фитопатологическим состоянием, могут снизить уровень морозостойкости устойчивого сорта.

Изучение молекулярно-генетических основ морозоустойчивости выявило ряд генов, детерминирующих факторы транскрипции, влияющие на физиолого-биохимические процессы, определяющие морозоустойчивость растения. В настоящее время, исследованиями учёных гены *VvCBF2*, *VvCBF4*, *VvCBFL* (C-repeat-binding factors) и *VvZFPL* (B-box-type zinc finger protein) идентифицированы как участвующие в формировании морозоустойчивости винограда [3-6].

Объекты и методы исследований. Молекулярно-генетические исследования направлены на поиск структурного полиморфизма гена *VvZFPL*, участвующего в контроле физиолого-биохимических процессов, обеспечивающих устойчивость винограда к низким температурам. Исследования ведутся на базе лаборатории генетики и микробиологии СКЗНИИСиВ, сбор растительного материала и фенотипические наблюдения проведены на Всероссийской ампелографической коллекции. ДНК выделяли методом ЦТАБ [7].

Праймерные пары разработаны с помощью системы Primer Blast базы данных NCBI.

Температуру отжига каждого праймера рассчитывали по формуле:

$$T_a = 4^{\circ}\text{C} \times (G + C) + 2^{\circ}\text{C} \times (A + T) - 3,$$

где G, C, A, T – количество гуанидиновых, цитозиновых, адениновых и тиминовых оснований в нуклеотидной последовательности праймера, соответственно [8].

Секвенирование амплифицированных фрагментов ДНК проводилось на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 3130. Сравнение секвенированных последовательностей проводили в он-лайн приложение "Clustal Omega" (режим доступа - <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) с использованием генетического анализатора ABI Prism3130.

Обсуждение результатов. С целью создания пары праймеров, перекрывающей 100 % последовательности гена *VvZFPL*, в базе данных NCBI, с использованием системы поиска BLAST, был найден фрагмент геномного сиквенса винограда, содержащий данный ген *Vitis vinifera* contig VV78X200624.7, whole genome shotgun sequence (№ в базе данных NCBI AM486770.2).

С помощью системы Primer Blast базы данных NCBI были разработаны праймерные пары. В связи с вероятностью присутствия сайтов комплементарного отжига праймеров на нецелевых последовательностях в геноме винограда, после дизайна праймерных пар был выполнен анализ их специфичности к целевым участкам генома с помощью системы поиска BLAST базы данных NCBI. Разработана праймерная пара (VV78X), фланкирующая участок генома, соответствующий гену *VvZFPL*, то есть перекрывающая 100 % его последовательности (табл.).

Нуклеотидные последовательности разработанных праймерных пар

Целевой ген	Праймерная пара	Размер фрагмента, пар нуклеотидов
VvZFPL	VV78X F: CAC TGC GCT TCT GCC TTC TA R: TGG TCT CCG TCT CTC CAT CT	814

Выполнена апробация созданной праймерной пары и экспериментальная оптимизация параметров ПЦР. Изначально температуру отжига праймеров рассчитали по формуле: $T_a = 4^{\circ}\text{C} \times (G + C) + 2^{\circ}\text{C} \times (A + T) - 3$ [6]. В дальнейшем корректировали температуру отжига в зависимости от качества ПЦР-продукта, получаемого при рассчитанной температуре.

В качестве оптимальных были определены следующие условия прохождения полимеразно-цепной реакции:

– 5 минут при 94 °С – начальная денатурация;

- следующих 30 циклов: – 20 секунд денатурация при 94 °С; 40 секунд отжиг праймеров при 59 °С; 40 секунд синтез при 72 °С;
- последний цикл синтеза 5 минут при 72 °С. ДНК вносили в количестве 50-100 нг на реакцию.

Таким образом, экспериментально были подобраны условия ПЦР, обеспечивающие высокий выход амплифицированного продукта наряду с минимальным количеством синтезированных неспецифичных фрагментов ДНК. Праймерная пара VV78X, созданная на полную последовательность гена *VvZFPL* в геноме *Vitis vinifera*, была апробирована на ДНК сортов *V. vinifera* и межвидового происхождения. Получен положительный результат: целевой продукт синтезировался в обоих случаях (рис. 1).

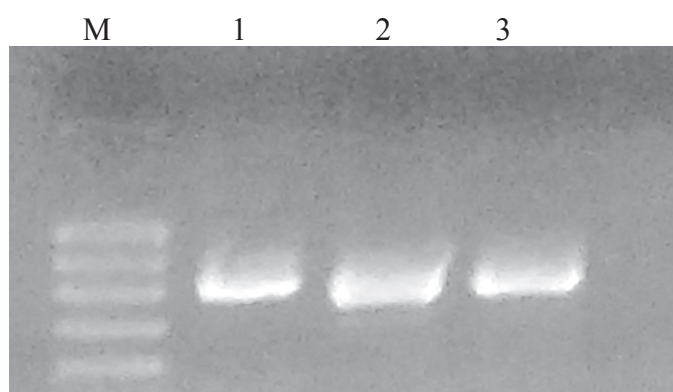


Рис. 1. Результаты ПЦР-анализа гена *VvZFPL*

Сорта винограда:

- 1 – Бианка (европейско-американский гибрид),
- 2 – Каберне-Совиньон (европейский сорт),
- 3 – Кристалл (амуро-европейско-американский гибрид);
- М – маркер молекулярного веса

С использованием созданной праймерной комбинации VV78X были синтезированы ПЦР-продукты и проведено их секвенирование с целью изучения последовательностей гена *VvZFPL* у сортов винограда, контрастных по признаку холодостойкость: сорт Кристалл (морозоустойчивость до -28 °С) и Яй изюм черный (-20-21 °С).

Сравнение сиквенса амплифицированных последовательностей гена *VvZFPL* контрастных сортов винограда, таких как Кристалл (американо-амурско-европейский гибрид, высокий уровень устойчивости к отрицательным температурам) и Яй изюм черный (восточная группа *V. vinifera*, низкий уровень устойчивости) выявило 2 точки snp-полиморфизма (рис. 2). Выявленный полиморфизм может быть связан с формированием признака морозостойкости, однако данное предположение требует дальнейших исследований.

Кристалл	GCCTTCGCGTCCACGCTCGACCGTGCCC	G GAGTTTCGACGGAAAC 296
Яй изюм черный	GCCTTCGCGTCCACGCTCGACCGTGCCC	A GAGTTTCGACGGAAAC 290

Кристалл	TGATCGGTGGAGGTCTCCGACTCCAC	T TCTGACGAGCAGGATCT 475
Яй изюм черный	TGATCGGTGGAGGTCTCCGACTCCAC	C TCTGACGAGCAGGATCT 469

Рис. 2. Точки snp-полиморфизма в структуре ДНК-последовательности гена *VvZFPL* в генотипах сортов винограда Кристалл и Яй изюм черный

Выборка анализируемых генотипов была расширена сортами, характеризующимися средней и повышенной устойчивостью к низким температурам и сортом Шардоне как представителем классических сортов *V. vinifera*.

Было проведено секвенирование амплифицированных последовательностей гена *VvZFPL* у сортов: Достойный, Красностоп АЗОС, Первенец Магарача, Молдова, Кутузовский, Шардоне. Уровень морозостойкости сортов можно охарактеризовать следующими критическими температурами: Кристалл -28 °С, Красностоп АЗОС, Достойный -26 °С, Первенец Магарача -25-24 °С, Молдова, Кутузовский -24 - 22 °С, Шардоне -22 °С, Яй изюм черный -20-21 °С.

Было проведено сравнение всех секвенированных последовательностей в он-лайн приложении "Clustal Omega" (режим доступа - <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Получены следующие результаты:

Кристалл	AAAATGTCCTCCGCCTTCGCGTCCACGCTCGACCGTGCCCGGAGTTTCGACGGAAAC 296
Достойный	AAAATGTCCTCCGCCTTCGCGTCCACGCTCGACCGTGCCCGGAGTTTCGACGGAAAC 293
Красностоп АЗОС	AAAATGTCCTCCGCCTTCGCGTCCACGCTCGACCGTGCCCGGAGTTTCGACGGAAAC 291
Кутузовский	AAAATGTCCTCCGCCTTCGCGTCCACGCTCGACCGTGCCCGGAGTTTCGACGGAAAC 292
Первенец Магарача	AAAATGTCCTCCGCCTTCGCGTCCACGCTCGACCGTGCCCGGAGTTTCGACGGAAAC 290
Молдова	AAAATGTCCTCCGCCTTCGCGTCCACGCTCGACCGTGCCCGGAGTTTCGACGGAAAC 289
Яй изюм черный	AAAATGTCCTCCGCCTTCGCGTCCACGCTCGACCGTGCCCGGAGTTTCGACGGAAAC 290
Шардоне	AAAATGTCCTCCGCCTTCGCGTCCACGCTCGACCGTGCCCGGAGTTTCGACGGAAAC 288

Кристалл	GCGAGACGCCGCCCTTCCTCGGAGCGGACTCGGTGGTGGAAACGCAAGACGACGAT 416
Достойный	GCGAGACGCCGCCCTTCCTCGGAGCGGACTCGGTGGTGGAAACGCAAGACGACGAT 413
Красностоп АЗОС	GCGAGACGCCGCCCTTCCTCGGAGCGGACTCGGTGGTGGAAACGCAAGACGACGAT 411
Кутузовский	GCGAGACGCCGCCCTTCCTCGGAGCGGACTCGGTGGTGGAAACGCAAGACGACGAT 412
Первенец Магарача	GCGAGACGCCGCCCTTCCTCGGAGCGGACTCGGTGGTGGAAACGCAAGACGACGAT 410
Молдова	GCGAGACGCCGCCCTTCCTCGGAGCGGACTCGGTGGTGGAAACGCAAGACGACGAT 409
Яй изюм черный	GCGAGACGCCGCCCTTCCTCGGAGCGGACTCGGTGGTGGAAACGCAAGACGACGAT 410
Шардоне	GCGAGACGCCGCCCTTCCTCGGAGCGGACTCGGTGGTGGAAACGCAAGACGACGAT 408

Кристалл	GACTTGAGTCGTGATCGGTGGAGGTCTCCGACTCCACCTCTGACGAGCAGGATCT 475
Достойный	GACTTGAGTCGTGATCGGTGGAGGTCTCCGACTCCACCTCTGACGAGCAGGATCT 472
Красностоп АЗОС	GACTTGAGTCGTGATCGGTGGAGGTCTCCGACTCCACCTCTGACGAGCAGGATCT 471
Кутузовский	GACTTGAGTCGTGATCGGTGGAGGTCTCCGACTCCACCTCTGACGAGCAGGATCT 471
Первенец Магарача	GACTTGAGTCGTGATCGGTGGAGGTCTCCGACTCCACCTCTGACGAGCAGGATCT 469
Молдова	GACTTGAGTCGTGATCGGTGGAGGTCTCCGACTCCACCTCTGACGAGCAGGATCT 468
Яй изюм черный	GACTTGAGTCGTGATCGGTGGAGGTCTCCGACTCCACCTCTGACGAGCAGGATCT 469
Шардоне	GACTTGAGTCGTGATCGGTGGAGGTCTCCGACTCCACCTCTGACGAGCAGGATCT 467

Кристалл	GATCAGCCGGTGCGGCTGAAACCCGACGCCGAAGAACGTGTCCCCTGCCAAACCGT 534
Достойный	GATCAGCCGGTGCGGCTGAAACCCGACGCCGAAGAACGTGTCCCCTGCCAAACCGT 531
Красностоп АЗОС	GATCAGCCGGTGCGGCTGAAACCCGACGCCGAAGAACGTGTCCCCTGCCAAACCGT 531
Кутузовский	GATCAGCCGGTGCGGCTGAAACCCGACGCCGAAGAACGTGTCCCCTGCCAAACCGT 530
Первенец Магарача	GATCAGCCGGTGCGGCTGAAACCCGACGCCGAAGAACGTGTCCCCTGCCAAACCGT 528
Молдова	GATCAGCCGGTGCGGCTGAAACCCGACGCCGAAGAACGTGTCCCCTGCCAAACCGT 527
Яй изюм черный	GATCAGCCGGTGCGGCTGAAACCCGACGCCGAAGAACGTGTCCCCTGCCAAACCGT 528
Шардоне	GATCAGCCGGTGCGGCTGAAACCCGACGCCGAAGAACGTGTCCCCTGCCAAACCGT 526

Из вышеприведенных данных видно, что отличия, выявленные при сравнении последовательностей гена *VvZFPL* наиболее морозостойкого и наименее морозостойкого сортов винограда, являются сортоспецифичными – выявленные snp-замены не повторились в других генотипах.

Однако, был выявлен полиморфизм и в других точках в последовательности гена *VvZFPL* в сортах Достойный (2 точки snp-полиморфизма) и Красностоп АЗОС (1 точка). Данные сорта обладают повышенной морозостойкостью. Дальнейшие исследования будут продолжены.

Выводы. Проведено сравнение последовательности ДНК гена *VvZFPL*, участвующего в формировании устойчивости винограда к низким зимним температурам, в генотипах 8 сортов винограда, различающихся по уровню морозоустойчивости.

Выявлены две точки snp-полиморфизма в последовательности гена у сортов Кристалл и Яй изюм чёрный, контрастных по проявлению признака морозоустойчивости, а также в сортах Достойный и Красностоп АЗОС, характеризующихся повышенной толерантностью к низким температурам.

Возможно, выявленный полиморфизм связан с формированием признака морозоустойчивости виноградного растения.

Литература

1. Ильина, И.А. Физиолого-биохимические исследования морозоустойчивости межвидовых гибридов винограда в осенне-зимний период / И.А. Ильина, Н.И. Ненько, В.С. Петров, М.А. Сундырева, Н.М. Запорожец, Т.В. Схаляхо // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2013. – № 23 (5). – С. 19-32. – Режим доступа: <http://www.journal.kubansad.ru/pdf/13/05/03.pdf>.
2. Петров, В.С. Формирование адаптивного сортимента винограда в нестабильных условиях среды / Петров В.С. // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2013. – № 20 (2). – С. 15-30. – Режим доступа: <http://www.journal.kubansad.ru/pdf/13/02/03.pdf>.
3. Kobayashi, M. Characterization of thermotolerance-related genes in grapevine (*Vitis vinifera*) // M. Kobayashi, H. Katoh, T. Takayanagi, S. Suzuki // J Plant Physiol. – 2010. – V. 167. – P. 812-819.
4. Takuhara, Y. Low-temperature-induced transcription factors in grapevine enhance cold tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants / Y. Takuhara, M. Kobayashi, S. Suzuki // Journal of plant physiology. – 2011. – V. 168. – P. 967-975.
5. Kobayashi, M. Characterization of grape C-repeat-binding factor 2 and B-box-type zinc finger protein in transgenic *Arabidopsis* plants under stress conditions / M. Kobayashi, H. Horiuchi, K. Fujita, Y. Takuhara, S. Suzuki // Molecular biology reports. – 2012. – V. 39. – P. 7933-7939.
6. Xiao, H. CBF4 is a unique member of the CBF transcription factor family of *Vitis vinifera* and *Vitis riparia* / H. Xiao, E.A. Tattersall, M.K. Siddiqua, G.R. Cramer, A. Nassuth // Plant Cell Environ. – 2008. – V. 31. – P. 1-10.
7. Rogers, S. O. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues / S. O Rogers, A. J. Bendich // Plant Molecular Biology. – 1985. – V. 19. – № 1. – P. 69-76.
8. Dieffenbach, C.W. General Concepts for PCR Primer Design / C.W. Dieffenbach., T.M. Lowe, G.S. Deksler // Nucleic Acids Res. – 1995. – V. 18. – P. 999-1005.