

УДК 631.52 : 577.21

АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ЛОКУСА *VvZFPL* В ДНК СОРТОВ ВИНОГРАДА С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТИ

Ильницкая Е.Т., канд. биол. наук, Супрун И.И., 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. Последовательность гена *VvZFPL*, влияющего на формирование морозоустойчивости растений винограда, исследовали у восьми сортов винограда, обладающих различной степенью устойчивости к низкотемпературному стрессу и имеющих различное генетическое происхождение. Корреляции между обнаруженными однонуклеотидными заменами (SNP) в последовательностях гена у изученных образцов и уровнем их морозоустойчивости не обнаружено.

Ключевые слова: виноград, морозоустойчивость, *VvZFPL*, секвенирование

Summary. Sequence of *VvZFPL* gene, influencing the low temperature tolerance of grapevine plants, was studied on ten grapes varieties with different level of tolerance to low temperature stress and different genetic origin. Analysis of the obtained sequences has not revealed the correlation between single nucleotide substitutions (SNP) and the level of tolerance to low temperatures.

Key words: grapes, frost resistance, *VvZFPL*, sequencing

Введение. Согласно современным научным представлениям, устойчивость винограда к комплексу неблагоприятных зимних условий, условно определяемая как морозоустойчивость, зависит от генетических свойств сорта, физиологического состояния растения во время наступления холодов, условий и способов его выращивания, применяемой агротехники, возрастных этапов и характера проявления низких температур.

На результат перезимовки кустов оказывает влияние не только метеорологические условия осенних и зимних месяцев, но и условия вегетационного периода. Растениям винограда недостаточно вступить в состояние покоя, для сохранности лозы в зимний период необходимо пройти фазы закаливания низкими температурами. Повышается морозоустойчивость виноградной лозы в результате длительного охлаждения, однако оттепели в зимний период снижают её морозостойкость.

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. Морозоустойчивость глазков у возделываемых сортов различных эколого-географических групп находится в пределах от минус 18 °С (европейские сорта, восточная группа) до минус 27 °С (межвидовые гибриды), а некоторые сорта межвидового происхождения способны выдерживать и более низкие температуры. При этом, с точки зрения генетики, признак толерантности виноградного растения к низким температурам относится к одним из наименее изученных, ввиду «сложности» признака и понимания возможности управления процессом.

Из литературных источников известно, что изучение молекулярно-генетических основ морозоустойчивости виноградного растения выявило ряд локусов, детерминирующих факторы транскрипции, влияющих на физиолого-биохимические процессы и определяющих морозоустойчивость. В настоящее время гены *VvCBF2*, *VvCBF4*, *VvCBFL* (*Vitis vinifera* C-repeat-binding factors) и *VvZFPL* (*Vitis vinifera* B-box-type zinc finger protein) идентифицированы как гены, участвующие в формировании морозоустойчивости винограда [1-4].

Проводимые нами исследования направлены на поиск структурного полиморфизма гена *VvZFPL*, участвующего в контроле физиолого-биохимических процессов, обеспечивающих устойчивость винограда к низким температурам.

Объекты и методы исследований. Работа проведена с использованием ДНК сортов винограда, обладающих различной степенью устойчивости к низкотемпературному стрессу и имеющих различное генетическое происхождение. Образцы ДНК были выделены из типичных растений сортов Бархатный, Достойный, Красностоп АЗОС, Красностоп анапский, Кристалл, Филлоксероустойчивый Джемете, Курчанский, Яй изюм черный, произрастающих в насаждениях Российской ампелографической коллекции (г. Анапа).

ДНК выделяли из молодых листьев апикальной части побегов методом ЦТАБ [5]. Полимеразную цепную реакцию проводили по стандартной методике, амплификацию осуществляли на приборе Eppendorf Mastercycler gradient (Германия) по следующей схеме: 5 минут при 95 °С – начальная денатурации, далее 35 циклов: 10 секунд денатурации при 95 °С, 30 секунд – отжиг праймеров при 56 °С, 30 секунд – синтез при 72 °С; последний цикл синтеза – 3 минуты при 72 °С.

Секвенирование амплифицированных фрагментов ДНК проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 3130. Сравнение секвенированных последовательностей проводили в он-лайн приложении "Clustal Omega" (режим доступа - <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) с использованием генетического анализатора ABI Prism3130. Исследования выполнены на оборудовании ЦКП «Геномные и постгеномные технологии» СКЗНИИСиВ.

Обсуждение результатов. В целях 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 и выполнен анализ их специфичности к целевым участкам генома с помощью системы поиска BLAST базы данных NCBI, для того, чтобы исключить вероятность присутствия сайтов комплементарного отжига праймеров на нецелевые последовательности в геноме винограда. В результате из нескольких сконструированных олигонуклеотидов была отобрана и включена в работу праймерная комбинация, фланкирующая участок генома, соответствующий гену *VvZFPL* (табл. 1).

Таблица 1 – Нуклеотидная последовательность используемой праймерной пары

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

На первом этапе работ с использованием созданной праймерной комбинации были синтезированы ПЦР-продукты и проведено их секвенирование в целях изучения последовательностей гена *VvZFPL* у сортов винограда, контрастных по признаку морозостойкости – сорт Кристалл и Яй изюм черный. Сравнение сиквенса амплифицированных последовательностей гена *VvZFPL* сортов винограда Кристалл (американо-амурско-европейский гибрид, высокий уровень устойчивости к отрицательным температурам: - 28 °С) и Яй изюм черный (восточная группа *V. vinifera*, низкий уровень устойчивости: -20 – 21 °С) выявило 2 точки snp-полиморфизма [6]. На основании полученных данных была выдвинута гипотеза о возможной взаимосвязи выявленного полиморфизма с формированием признака морозостойкости.

Для проверки гипотезы расширили выборку анализируемых генотипов сортами, характеризующимися низкой, средней и повышенной устойчивостью к отрицательным температурам зимнего периода и имеющих различное генетическое происхождение, а также и общие родительские формы: Бархатный, Достойный, Красностоп АЗОС, Красностоп анапский, Филлоксероустойчивый Джемете, Курчанский (табл. 2).

Таблица 2 – Характеристика изучаемых сортов винограда по происхождению

Сорт	Происхождение
Бархатный	Кировабадский столовый x Мускат гамбургский; <i>V. vinifera</i>
Яй изюм черный	Дагестанский сорт бассейна Черного моря; <i>V. vinifera</i>
Красностоп анапский	Клоновая селекция сорта Красностоп золотовский; <i>V. vinifera</i>
Филлоксероустойчивый Джемете	Неизвестное происхождение; предположительно сеянец американского генотипа
Красностоп АЗОС	Филлоксероустойчивый Джемете x Красностоп анапский; предположительно межвидовой гибрид
Достойный	Филлоксероустойчивый Джемете x Мускат гамбургский; предположительно межвидовой гибрид
Курчанский	Мускат кубанский (Маленгр ранний x Мускат гамбургский) x Саперави северный (Северный (Сеянец Маленгра x амурский дикий <i>V. amurensis</i>) x Саперави); межвидовой гибрид
Кристалл	(<i>V. amurensis</i> x Чалоци Лайош) x Виллар Блан (56.19 % <i>V. vinifera</i> + 3.13 % <i>V. labrusca</i> + 29.16 % <i>V. rupestris</i> + 6.25 % <i>V. berlandieri</i> + 5.28 % <i>V. lincecumii</i>); сложный межвидовой гибрид

Уровень морозостойкости сортов можно охарактеризовать следующими критическими температурами: Кристалл -28 °С; Филлоксероустойчивый Джемете, Курчанский - 27 °С; Красностоп АЗОС, Достойный -26 °С; Красностоп анапский -24 °С; Яй изюм черный -20-21 °С; Бархатный -18-20 °С.

Было выполнено сравнение нуклеотидной последовательности локуса *VvZFPL* указанных сортов. Получены следующие результаты:

Ф/У Джемете GGCGCACGAAATCGCCGCCACGAGCGAGACGCGTAGAGGCAGAACGGTCAATTTGACTAA
 Красностоп анапский GGCGCACGAAATCGCCGCCACGAGCGAGACGCGTAGAGGCAGAACGGTCAATTTGACTAA
 Достойный GGCGCACGAAATCGCCGCCACGAGCGAGACGCGTAGAGGCAGAACGGTCAATTTGACTAA
 Яй изюм черный GGCGCACGAAATCGCCGCCACGAGCGAGACGCGTAGAGGCAGAACGGTCAATTTGACTAA
 Красностоп АЗОС GGCGCACGAAATCGCCGCCACGAGCGAGACGCGTAGAGGCAGAACGGTCAATTTGACTAA
 Кристалл GGCGCACGAAATCGCCGCCACGAGCGAGACGCGTAGAGGCAGAACGGTCAATTTGACTAA
 Бархатный GGCGCACGAAATCGCCGCCACGAGCGAGACGCGTAGAGGCAGAACGGTCAATTTGACTAA

Ф/У Джемете ACACACACCGAGCGCGTGAGAAGCCACGGATGTGCAACTACCATTTAGCCCCAGCTTTCT
 Красностоп анапский ACACACACCGAGCGCGTGAGAAGCCACGGATGTGCAACTACCATTTAGCCCCAGCTTTCT
 Достойный ACACACACCGAGCGCGTGAGAAGCCACGGATGTGCAACTACCATTTAGCCCCAGCTTTCT
 Яй изюм черный ACACACACCGAGCGCGTGAGAAGCCACGGATGTGCAACTACCATTTAGCCCCAGCTTTCT
 Красностоп АЗОС ACACACACCGAGCGCGTGAGAAGCCACGGATGTGCAACTACCATTTAGCCCCAGCTTTCT
 Кристалл ACACACACCGAGCGCGTGAGAAGCCACGGATGTGCAACTACCATTTAGCCCCAGCTTTCT
 Бархатный ACACACACCGAGCGCGTGAGAAGCCACGGATGTGCAACTACCATTTAGCCCCAGCTTTCT

Ф/У Джемете GCACCAATTTACTAAAATGTCTCCGCCTTCGCGTCCACGCTCGACCGTGCCCGAGGTTT
 Красностоп анапский GCACCAATTTACTAAAATGTCTCCGCCTTCGCGTCCACGCTCGACCGTGCCCGAGGTTT
 Достойный GCACCAATTTACTAAAATGTCTCCGCCTTCGCGTCCACGCTCGACCGTGCCCGAGGTTT
 Яй изюм черный GCACCAATTTACTAAAATGTCTCCGCCTTCGCGTCCACGCTCGACCGTGCCCGAGGTTT
 Красностоп АЗОС GCACCAATTTACTAAAATGTCTCCGCCTTCGCGTCCACGCTCGACCGTGCCCGAGGTTT
 Кристалл GCACCAATTTACTAAAATGTCTCCGCCTTCGCGTCCACGCTCGACCGTGCCCGAGGTTT
 Бархатный GCACCAATTTACTAAAATGTCTCCGCCTTCGCGTCCACGCTCGACCGTGCCCGAGGTTT
 *****_

Ф/У Джемете CGACGGAACCTCGAGTCCACGCCGAGACCGCAGACACTGAGCTCGTGAAGCCGGTCCT
 Красностоп анапский CGACGGAACCTCGAGTCCACGCCGAGACCGCAGACACTGAGCTCGTGAAGCCGGTCCT
 Достойный CGACGGAACCTCGAGTCCACGCCGAGACCGCAGACACTGAGCTCGTGAAGCCGGTCCT
 Яй изюм черный CGACGGAACCTCGAGTCCACGCCGAGACCGCAGACACTGAGCTCGTGAAGCCGGTCCT
 Красностоп АЗОС CGACGGAACCTCGAGTCCACGCCGAGACCGCAGACACTGAGCTCGTGAAGCCGGTCCT
 Кристалл CGACGGAACCTCGAGTCCACGCCGAGACCGCAGACACTGAGCTCGTGAAGCCGGTCCT
 Бархатный CGACGGAACCTCGAGTCCACGCCGAGACCGCAGACACTGAGCTCGTGAAGCCGGTCCT

Ф/У Джемете CTCCGCCTTCCGCCGCGAGACGCCGCCCTTCTCGGAGCGGACTCGGTGGTGGAAACGCA
 Красностоп анапский CTCCGCCTTCCGCCGCGAGACGCCGCCCTTCTCGGAGCGGACTCGGTGGTGGAAACGCA
 Достойный CTCCGCCTTCCGCCGCGAGACGCCGCCCTTCTCGGAGCGGACTCGGTGGTGGAAACGCA
 Яй изюм черный CTCCGCCTTCCGCCGCGAGACGCCGCCCTTCTCGGAGCGGACTCGGTGGTGGAAACGCA
 Красностоп АЗОС CTCCGCCTTCCGCCGCGAGACGCCGCCCTTCTCGGAGCGGACTCGGTGGTGGAAACGCA
 Кристалл CTCCGCCTTCCGCCGCGAGACGCCGCCCTTCTCGGAGCGGACTCGGTGGTGGAAACGCA
 Бархатный CTCCGCCTTCCGCCGCGAGACGCCGCCCTTCTCGGAGCGGACTCGGTGGTGGAAACGCA

Ф/У Джемете TGACGACGATGAAGACTTGGAGTCGTGATCGGTGGAGGTCTCCGACTCCACCTCTGACGA
 Красностоп анапский AGACGACGATGAAGACTTGGAGTCGTGATCGGTGGAGGTCTCCGACTCCACCTCTGACGA
 Достойный AGGCGACGATGAAGACTTGGAGTCGTGATCGGTGGAGGTCTCCGACTCCACCTCTGACGA
 Яй изюм черный AGACGACGATGAAGACTTGGAGTCGTGATCGGTGGAGGTCTCCGACTCCACCTCTGACGA
 Красностоп АЗОС AGACGACGATGAAGACTTGGAGTCGTGATCGGTGGAGGTCTCCGACTCCACTTCTGACGA
 Кристалл AGACGACGATGAAGACTTGGAGTCGTGATCGGTGGAGGTCTCCGACTCCACTTCTGACGA
 Бархатный AGACGACGATGAAGACTTGGAGTCGTGATCGGTGGAGGTCTCCGACTCCACTTCTGACGA

Ф/У Джемете GCAGGATCTACAGATCAGCCGGTGC GGCTGAAACCCGACGCCGAAGAACGTGTCCCCTGC
 Красностоп анапский GCAGGATCTACAGATCAGCCGGTGC GGCTGAAACCCGACGCCGAAGAACGTGTCCCCTGC
 Достойный GCAGGATCTACAGATCAGCCGGTGC GGCTGAAACCCGACGCCGAAGAACGTGTCCCCTGC
 Яй изюм черный GCAGGATCTACAGATCAGCCGGTGC GGCTGAAACCCGACGCCGAAGAACGTGTCCCCTGC
 Красностоп АЗОС GCAGGATCTACAGATCAGCCGGTGC GGCTGAAACCCGACGCCGAAGAACGTGTCCCCTGC
 Кристалл GCAGGATCTACAGATCAGCCGGTGC GGCTGAAACCCGACGCCGAAGAACGTGTCCCCTGC
 Бархатный GCAGGATCTACAGATCAGCCGGTGC GGCTGAAACCCGACGCCGAAGAACGTGTCCCCTGC

Ф/У Джемете	CAAACCGTTGCATTCTGAGCACAGAGTGTGGCGGACGTGGCGAG-CCACC-AGAAAATTG
Красноstop анапский	CAAACCGTTGCATTCTGAGCACAGAGTGTGGCGGATGTGGCGAG-CCACC-AGAAAATTG
Достойный	CAAACCGTTGCATTCTGAGCACAGAGTGTGGCGGACGTGGCGAG-CCACC-AGAAAATTG
Яй изюм черный	CAAACCGTTGCATTCTGAGCACAGAGTGTGGCGGACGTGGCGAG-CCACC-AGAAAATTG
Красноstop АЗОС	CAAACCGTTGCATTCTGAGCACAGAGTGTGGCGGACGTGGCGAG-CCACC-AGAAAATTG
Кристалл	CAAACCGTTGCATTCTGAGCACAGAGTGTGGCGGACGTGGCGAG-CCACC-AGAAAATTG
Бархатный	CAAACCGTTGCATTCTGAGCACAGAGTGTGGCGGACGTGGCGAG-CCACC-AGAAAATTG

Различия, выявленные при сравнении последовательностей гена *VvZFPL* морозостойких и неморозостойких генотипов, вероятно являются сортоспецифическими. Выявленный полиморфизм в нескольких различных точках в последовательности гена *VvZFPL* исследуемых генотипов не коррелирует с уровнем морозостойкости сортов. Возможно, различия, связанные с локусом *VvZFPL* в разных по устойчивости к низким температурам генотипах, находятся в регуляторных областях данного гена.

Полученные данные могли бы быть полезны в селекционной работе для отслеживания последовательности локуса *VvZFPL* от донора морозоустойчивости в расщепляющихся популяциях, учитывая межсортовой полиморфизм, однако создание универсального ДНК-маркера, сцепленного с «морозостойкой» аллелью гена *VvZFPL*, не является возможным по результатам проведенной работы.

Сопоставление последовательностей изучаемого локуса в генотипах только сортов *V. vinifera*, которые различаются порогом критических зимних температур: Бархатный (-18-20 °C), Яй изюм черный (-20-21 °C) и Красноstop анапский (-24 °C), показало три точки полиморфизма, по одной в каждом генотипе, однако делать какие-либо выводы возможно лишь при дополнительных исследованиях в рамках генотипа *V. vinifera*.

Заключение. Проведено изучение нуклеотидной последовательности локуса *VvZFPL* в генотипах сортов винограда с различным уровнем морозоустойчивости и разной генетической основой. Корреляции в выявленном SNP-полиморфизме с морозоустойчивостью сортов не обнаружено. Можно предположить, что различия, связанные с локусом *VvCBF4* в разных по устойчивости к низким температурам генотипах, находятся не в структурной части данного гена, а в его регуляторных областях.

Литература

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Супрун, И.И. Ильницкая Е.Т., Токмаков С.В., Полиморфизм последовательности гена *VvZFPL*, участвующего в формировании устойчивости винограда к низкотемпературному стрессу / И.И. Супрун, Е.Т. Ильницкая, С.В. Токмаков // *Научные труды СКЗНИИСиВ.* – Том 7. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2015. – С. 20-24.