

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА

Біологічний факультет

Кафедра генетики та молекулярної біології

**Дипломна робота
магістра**

на тему: **«Молекулярно-генетичний поліморфізм сортів винограду»**

« Molecular-genetics polymorphism of grape varieties»

Виконала: студентка денної форми
навчання

спеціальність 8.04010201 Біологія

Подгорна Христина Степанівна

Науковий керівник

доктор біологічних наук, с.н.с.

Чеботар Сабіна Віталіївна

Рецензент:

кандидат біологічних наук, доцент

Васильєва Тетяна Володимирівна

Рекомендовано до захисту:

Протокол засідання кафедри

№ _____ від « ____ » _____ р.

Завідувач кафедри

Чеботар С.В.

(підпис)

Захищено на засіданні ЕК № 1

Протокол № _____ від « ____ » _____ р.

Оцінка _____ / _____ / _____

(за національною шкалою, шкалою ECTS, бал)

Голова ЕК

(підпис)

Філіпова Т. О.

Одеса – 2017

АНОТАЦІЯ

Дослідження були проведені в 2014 - 2017 роках в лабораторії сектору молекулярної генетики «Інституту виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова», на базі лабораторії «Гермедтех» та на кафедрі генетики і молекулярної біології ОНУ імені І. І. Мечникова.

В результаті дослідження отримано якісні препарати ДНК безнасінних сортів винограду: Белградський безнасінневий, Мечта, Кишмиш ОСГІ, Русалка 1, Русалка 3, Флейм сідлес, Інтерлейкін, Ромулус, Рушакі, встановлено оптимальні умови для проведення ПЛР за мікросателітними локусами *ZAG62*, *ZAG79*, *VVMD27*, *VVMD28*, *VVMD32*. Було визначено поліморфізм та встановлено алелі мікросателітних локусів *ZAG62*, *ZAG79*, *VVMD27*, *VVMD28*, *VVMD32*, *VMC7f2*, *Chr14VO15* для дев'яти сортів винограду

Роботу викладено на 73 сторінках, робота містить 8 рисунків та 5 таблиць. Список літератури містить 59 джерел (34 кирилицею, 17 латиницею, 8 інтернет ресурсів).

Ключові слова: *Vitis vinifera*, ПЛР, мікросателітні маркери, поліморфізм, безнасінні сорти винограду.

The research was conducted in 2014 – 2017 years in the laboratory of the sector of molecular genetics of «The Institute of Viticulture and Wine V. Ye. Tairov», in the laboratory of «Germidech» and at the Department of Genetics and Molecular Biology of the ONU named after I. I. Mechnikov.

As a result of the research high quality DNA preparations of seedless grape were obtained for varieties: Belgradsky seedless, Mechta, Kishmish OSGI, Rusalka 1, Rusalka 3, Flame seedless, Interleykin, Romulus, Ruschaki, optimal conditions for PCR with microsatellite markers *ZAG62*, *ZAG79*, *VVMD27*, *VVMD28*, *VVMD32* have been dtermined, there have been revealed polymorphism and detected alleles of microsatellite loci *ZAG62*, *ZAG79*, *VVMD27*, *VVMD28*, *VVMD32*, *VMC7f2*, *Chr14VO15* for nine grape variety.

The work is presented in 73 pages, it has 8 figures and 5 tables. References contain 59 sources (34 Cyrillic, 17 Latin, 8 Internet resources).

Key words: *Vitis vinifera*, PCR, microsatellite markers, polymorphism, seedless varieties of grape

ЗМІСТ

ВСТУП

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	8
1.1. Таксономія винограду.....	8
1.2. Ботанічний опис винограду.....	9
1.3. Способи розмноження винограду.....	11
1.4. Організація геному винограду.....	13
1.5. Молекулярно-генетичний поліморфізм винограду.....	14
1.6. Роль мутацій в генетичному поліморфізмі винограду.....	15
1.7. Різноманітність <i>Vitis vinifera</i>	17
1.7.1. Безнасінні сорти винограду.....	19
1.8. Виноград як сільськогосподарська культура.....	21
1.9. Технологічні властивості винограду.....	24
1.10. Напрями застосування винограда.....	28
1.11. Основні хвороби та шкідники винограду.....	29
1.11.1. Мільдю винограду.....	30
1.12. Мікросателітні маркери в дослідженні винограду.....	35
1.12.1. Використання мікросателітних маркерів у вивченні винограду.....	37
2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	40
2.1. Виділення ДНК сортів винограду.....	40
2.2. Спектрофотометричне визначення кількості і якості ДНК за допомогою Nano Photometer Pear UV/Vis.....	42
2.3. Електрофорез екстрагованої ДНК в агарозному гелі.....	44
2.4. Підбір умов проведення ПЛР із застосуванням мікросателітних маркерів.....	45
2.5. Полімеразна ланцюгова реакція.....	46
2.6. Електрофорез продуктів ампліфікації в поліакриламідному гелі.....	49
2.7. Візуалізація продуктів ампліфікації в ПААГ за допомогою фарбування AgNO ₃	49
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	51

3.1. Оцінка кількості та якості виділеної ДНК.....	51
3.2. Аналіз оптимальних умов роботи мікросателітних маркерів.....	54
3.3. Ідентифікація генотипів безнасі́нних сортів винограду.....	61
Узагальнення.....	64
ВИСНОВКИ.....	66
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	67

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ І УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

БФС – бромфеноловый синий

ЕДТА – етилендіамінтетраоцетова кислота

МС – мікросателіти

Об./хв – оборотів в хвилину

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

т.п.н. – тисяч пар нуклеотидів

ТВЕ – Трис-борат – ЕДТФ буфер

тис. т. – тисяч тон

тис.га – тисяч гектар

ц/га – центер/гектар

APS – пероксодисульфат амонію

PVP – полівінілпирролідон

SSR – simple sequence repeat

TEMED – тетраметілетілендіамін

ВСТУП

Одна з важливих особливостей популяції рослин сорту - це її неоднорідність і внутрішньопопуляційна мінливість. З погляду генетики така мінливість називається поліморфізмом. Поліморфізм припускає одночасне існування алеля дикого типу і серії мутантних алелей у досліджуваній популяції [14, 18].

З наростанням процесу селекції збільшувалося різноманіття сортів винограду, та водночас з тим зростав рівень поліморфізму в результаті комбінативної та мутаційної мінливості при штучній і природній гібридизації. Цьому сприяв штучний і природний добір форм з кращими ознаками. Найбільш перспективним напрямком в селекції винограду на створення безнасінних сортів є поєднання в одному генотипі безнасінності зі стійкістю до, хвороб і шкідників. [29].

Захворювання мілдью, одне з найбільш значущих грибних захворювання для європейського виноградарства, викликається біотрофним оомицетом *Plasmopara viticola*. Пошук і підбір генотипів, що володіють природною стійкістю до інфекції - актуальне завдання селекції [12].

Метою нашого дослідження було вивчення молекулярно-генетичного поліморфізму сортів винограду

Виконання поставленої мети передбачало розв'язання таких завдань:

- отримати якісні препарати ДНК досліджуваних сортів;
- знайти оптимальні умови для ПЛР-аналізу мікросателітних локусів;
- визначити молекулярно-генетичний поліморфізм за маркерами до мікросателітних локусів, що можуть в подальшому використовуватися для диференціації і ідентифікації сортів винограду та пов'язаних з агрономічно важливими ознаками.

Об'єкт дослідження – генетичний поліморфізм винограду.

Предмет досліджень – поліморфізм за мікросателітними локусами в геномі безнасінних сортів винограду.

ВИСНОВКИ

1. Отримано якісні припарати ДНК дев'яти безнасінних сортів винограду – Белградський безнасінневий, Мечта, Кишмиш ОСГІ, Русалка 1, Русалка 3, Флейм сидлс, Інтерлейкін, Ромулус, Рушакі.

2. Підібрано оптимальні умови для проведення ПЛР-аналізу мікросателітних локусів ДНК винограду: *ZAG62*, *ZAG79*, *VVMD27*, *VVMD28*, *VVMD32*.

3. Визначено молекулярно-генетичний поліморфізм за маркерами – *ZAG62*, *ZAG79*, *VVMD27*, *VVMD28*, *VVMD32*, *VMC7f2*, *Chr14VO15* та отримано алельні характеристики для дев'яти безнасінних сортів винограду, що може в подальшому використовуватися для диференціації й ідентифікації сортів винограду.

4. У сортів Кишмиш ОСГІ, Русалка 1, Інтерлейкін, Ромулус, Рушакі за мікросателітним локусом *VMC7f2* виявлено алель 198 п.н. в гомозиготному стані, який асоціюється з ознакою відсутність насіння.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Атабекова А. И., Устинова Е. И. Цитология растений. – М.: Колос, 1967. – 246 с.
2. Балахонов П.И. К вопросу о вспышках милдью виноградной лозы. «Болезни растений», XVII, 1928, М 1—2..
3. Бальвинская М. С. ПЦР-анализ молекулярно-генетического полиморфизма ячменя (*Hordeum vulgare* L.): дис. кандидата биол. наук : 03.00.26 . – Одесса, 2002. – 161 с.
4. Бочарова В. Р. Генетико-морфологічний поліморфізм рослин винограду як показник диференціації для використання в селекції: дис. кандидата біол. наук: 03.00.17. – Одеса, 2011. – 183 с.
5. Вердеревский Д., Войтович К. Милдью винограда: Карта Молдовеняскэ. – 1970.- 160 с.
6. Власов В. В., Штирбу А. В., Булаева. Ю. Ю. Современное состояние и тенденции развития отрасли виноградарства Украины // Виноградарство і виноробство. – 2013. – Випуск 48. – С.67 – 69.
7. Власов В. В., Малюкінна Н. А., Джабурія Л. В. Перспективи біотехнологічних досліджень винограду // Вісник аграрної науки. Генетика, селекція, біотехнологія. – 2007. – Випуск 10. – С. 38 – 41.
8. Дудко Д. Болезни и вредители, обработка виноградника [Електронний ресурс] / Материал сайта: <http://www3.syngenta.com> – Режим доступа до моногр.: <http://www.vinogradnik.by/bolezni-vinograda-i-mery-po-borbe-s-nimi/mildyu.html>
9. Жизнь растений / под ред. Тахтаджяна А. Л. – М.: Просвещение, 1981. – Т. 5(2). – С. 335 – 337.
10. Заманиди. П. К. Трапса перспективный винный высококачественный чернаягодный сорт винограда Греции // Научный журнал КубГАУ. – 2008. – №42(8). – С.1 – 15.
11. Зеленянська Н. М., Джабурія Л. В., Теслюк Н.І. Розробка способів збільшення строків зберігання колекцій цінних клонів винограду в

- культури *in vitro* // Виноградарство і виноробство. Міжвідомчий тематичний науковий збірник. Спеціальний випуск – Одеса: Українська академія аграрних наук ННЦ Таїрово, 2009. – С. 53 – 56.
12. *Ильницкая Е. Т., Макаркина М. В.* Применение ДНК-маркеров в современных селекционно-генетических исследованиях винограда // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2016. – С. 528 – 536.
 13. *Инге-Вечтомов С. Г.* Генетика с основами селекции: учеб. для биол. спец. ун-тов. – М.: Высшая школа, 1989. – 591 с.
 14. *Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях (научно-методическое руководство) / под ред. Ю. М. Сиволапа* // Молекулярно-генетической полиморфизм винограда. - К: Аграрная наука, 1998. – 157 с.
 15. *Карашатов И.Д.* Лечебные средства традиционной медицины. – Бухара: 2012. – 154 с.
 16. *Карев В.Б.* Виноград, обрезка и уход. – Саратов: «Степные просторы» 2000. – 80 с.
 17. *Классификация семейства виноградовые – Vitis* [Електронний ресурс] / Материал сайта: <http://vinograd.info/> Режим доступу http://vinograd.info/info/vinogradarstvo/klassifikaciya-semeistva-vinogradovye_3.html
 18. *Кулиев В. М.* Генетические методы автополиплоидии у винограда // Научный журнал КубГАУ – 2010. №61(07). – С. 1 – 7.
 19. *Моргун В.В.* Проблема регуляторів росту у світі та її вирішення в Україні / В. В. Моргун, В. Л. Яровська, І. В. Драгозов // Физиология и биохимия культ. растений. – 2002.- Т. 34, №5. – С. 371 – 376.
 20. *Мухина Ж.М.* Молекулярные маркеры и их использование в селекционно генетических исследованиях // Научный журнал Куб ГАУ. – 2011. – №66(02) – С.1 – 5.
 21. *Нечитайло В.А., Кучерява Л.Ф.* Ботаніка. Вищі рослини: підручник підготовлений за матеріалами лекцій, які були прочитані на кафедрі

- ботаніки біологічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка протягом 1977-2000 рр. – Київ: Фітосоціоцентр, 2000. – 432 с.
22. *Принц. Я. И.* Вредители и болезни виноградной лозы [Электронный ресурс] / Материал сайта: <http://wine.historic.ru> "Виноделие как искусство" – Режим доступа до моногр. <http://wine.historic.ru/books/item/f00/s00/z0000001/st028.shtml>
23. *Простосердов Н. Н.* Ампелография: Изучение винограда для определения его использования (увология). – Москва, 1963. – 263 с.
24. *ПЦР-смеси* для научно-исследовательских лабораторий [Электронный ресурс] / Материал сайта: www.syntol.ru/about Режим доступа <http://www.syntol.ru/catalog/ptsr-smesi-dlya-nauchno-issledovatel'skikh-laboratoriya>
25. *Ребрикова Д. В.* ПЦР в реальном времени. – Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний 2014. – 223 с.
26. *Рисованная В. И.* Молекулярные аспекты оценки сортов и диких форм винограда и сохранение их в условиях *in vitro* [Электронный ресурс] / Материал сайта: <http://vinograd.info/>. – Режим доступа до моногр.: <http://vinograd.info/stati/stati/molekulyarnye-aspekty-ocenki-sortov-i-dikih-form-vinograda-i-sohranenie-ih-v-usloviyah-in-vitro.html>
27. *Гориславец С* // Режим доступа до рес.: <http://vinograd.info/stati/stati/molekulyarnye-aspekty-ocenki-sortov-i-dikih-form-vinograda-i-sohranenie-ih-v-usloviyah-in-vitro.html>
28. *Сиволап Ю. М.* Геном растений и его улучшение. – К.: Урожай, 1994. – 192 с.
29. *Сиволап Ю. М., Балашова И. А., Трошин Л. П.* Исследование генетического полиморфизма винограда при помощи RAPD-анализа // Цитология и генетика. – 1996. – Т. 30. – №6. – с. 33 – 36.

30. Сиволап Ю. М., Вербицкая Т. Г., Прокопенко С. Н., Тулаева М. И. Исследование видового полиморфизма ДНК у винограда *Vitis vinifera* // Цитология и генетика. – 1992. – Т. 26. - № 3. – С. 11–15.
31. Смирнов К. В., Калмыкова Т. И., Морозова Г. С. Виноградарство / под ред. К.В. Смирнова. – Изд. 2-е, перер. и дополн. // М.: Агропромиздат, 1987. – 365 с.
32. Соломонов С.С. Всё о винограде // Приложение к газете Хозяин. – 2005. – С. 1 – 64.
33. Стеценко В. М., Держаков Н. В. Виноградарство по новому. – АСТ: Полиграфиздат, 2011. – 415 с.
34. Стрельчук С. И. Основы экспериментального мутагенеза. – Киев: Вища школа, 1981. – 216 с.
35. Тимуш И. А. Энциклопедия виноградарства [Электронный ресурс] – 1986. – Режим доступа: <http://vinograd.info/spravka/slovar/selekcija-vinograda.html>
36. Топалэ Ш. Г., Даду К.Я., Филлоксероустойчивые подвои [Электронный ресурс] / Материал сайта: <http://vinograd.info> – Режим доступа до моногр.: vinograd.info/info/vinogradarstvo-bolgariya/fillokseroustoychivye-podvoi.html
37. Трошин Л. П. Новации винограда России. Бессемянные сорта винограда // Научный журнал Куб ГАУ – 2010. – №56(02). – С. 1-4.
38. Трошин Л.П. Ампелография и селекция винограда. – Краснодар: Вольный мастер, 1999. – 125 с.
39. Тулаева М. Ю., Хилько В. Ф., Чисников В.С. Результаты клоновой селекции винограда // Виноградарство и виноделие века. Материалы Международного симпозиума. – Одесса: Optimum, 2005. – С. 18 – 20.
40. Физиология винограда и основы его возделывания /; под. рук. и ред. акад. К.Стойкова // М.: София, 1981. – Том 1 – 245 с.
41. Хлесткина Е. К. Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов и геномов высших растений //

- Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – Том 15, №4 – С.758 – 760.
42. *Щедров В.А.* Виноделие от А до Я. – Ростов н/д: Феникс, 2006. – 283 с.
 43. *Akkurt M., Çakır A., Shidfar M., Çelikkol B. P., Söylemezoğlu G.* Using SCC8, SCF27 and VMC7f2 markers in grapevine breeding for seedlessness via marker assisted selection // *Genetics and Molecular Research*. 2012. – Vol 11(3). – P. 2288 – 2294.
 44. *Blasi P., Blanc S., Wiedemann-Merdinoglu S., Prado E., Rühl E.H., Mestre P., Merdinoglu D.* Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of *Rpv8*, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew // *Theor. Appl. Genet.* – 2011. – Vol. – 123(1). – P. 43 – 53.
 45. *Bowers J. E., Dangl G. S., Vignani R., & Meredith C. P.* Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). // *Genome*. – 1996. – Vol. – 39(4). – P. 628 – 633.
 46. *Cipriani, G., Frazza, G., Peterlunger, E., & Testolin, R.* Grapevine fingerprinting using microsatellite repeats // *Vitis*. – 1994. – Vol. – 33(4) – P. 211 – 215.
 47. *Cipriani G., Marrazzo M. T., Di Gaspero G., Pfeiffer A., Morgant, M., Testolin, R.* A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (*Vitis* spp.) genotyping // *Bmc Plant Biology*. – 2008. Vol. 8. – P. 1 – 20.
 48. *Eda K., Alba M., Carreno I., Ibanez J., Martine J. M.* Marker assisted selection for seedlessness in table grape breeding // *Nucleic Acid Research*. – 2012. – V. 31. – P. 37 – 61.
 49. *Eisen, J. A.* Mechanistic basis of microsatellite instability // in D. B. Goldstein and C. Schlotterer, eds. *Microsatellites: evolution and application*. – Oxford Univ. Press, Oxford, U. K.. – 1999. – P. 34 – 48.
 50. *Laucou V., Lacombe T., Dechesne F., Siret R., Bruno J. P., Dessup M., Dessup T., Ortigosa P., Parra P., Roux C., Santoni S., Vares D., Peros J. P., Boursiquot J. M., This P.* High throughput analysis of grape genetic diversity

- as a tool for germplasm collection management // *Theor Appl Genet.* – 2011. – Vol. 122. – P. 1233 – 1245.
51. *Litt M., Luty J. A.* A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac-muscle actin gene// *American Journal of Human Genetics.* – 1989. – Vol. 44(3). – P. 397-401.
 52. *Merdinoglu D., Wiedeman-Merdinoglu S., Coste P., Dumas V., Haet-ty S., Butterlin G., Greif C.* Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia* // *Grape Genetics and Breeding.* – 2003. – Vol. 15 (4). – P. 451 – 456
 53. *Merdinoglu D., Butterlin G., Bevilacqua L., Chiquet V., Adam-Blondon A. F., Decroocq S.* Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera L.*) suitable for multiplex PCR // *Molecular Breeding.* – 2005. – Vol. 15 (4). – P. 349 – 366.
 54. *Nebel B. R.* Zur zytologie von Malusund Vitis. – *Gartenbauwissenschaft*; 1929. – P. 1 – 6.
 55. *Regner F., Stadlbauer A., Eisenheld C.,* Heunisch x Frankisch, einwichtiger Genpool europaischer Rebsorten (*Vitis vinifera L. sativa*). // *Vitic. Enol. Sci.* – 1998. – Vol. 53. – P. 114 – 118.
 56. *Schwander F., Eibach R., Fechter I., Hausmann L., Zyprian E., R. Töpfer.* *Rpv10*: a new locus from the Asian Vitis gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine // *Theor. Appl. Genet.* – 2012 – Vol. 124. – P. 163 – 176.
 57. *This, P., Jung, A., Boccacci, P., Borrego, J., Botta, R., Costantini, L., et al.* Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars // *Theoretical and Applied Genetics.* – 2004. – Vol. 109 (7). – P. 1448 – 1458.
 58. *Thomas, M. R., & Scott, N. S.* Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequence-tagged sites (STSS) // *Theoretical and Applied Genetics.* – 1993. – Vol. 86 (8). – P. 985 – 990.

59. Velasco R., Zharkikh A., Troggio M., Cartwright D. A., Cestaro A., Pruss, D., et al. A High Quality Draft Consensus Sequence of the Genome of a Heterozygous Grapevine Variety // Plos One. – 2007. Vol. 2 (12). – P. 67 – 79.