

УДК 575.113.4:581.15:634.83

И.А. БАРЫШЕВА¹, М.И. ТУЛАЕВА², В.С. ЧИСНИКОВ²

¹ Институт стоматологии АМН Украины, Одесса

² Институт виноградарства и виноделия им. В.Е. Таирова, Одесса

ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРИСОРТОВОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ДНК ВИНОГРАДА ПДРФ И ПЦР МЕТОДАМИ



Проведена оценка полиморфизма ДНК среди сортов *Vitis vinifera* ПДРФ и ПЦР методами с целью подбора ДНК-технологии для детекции внутрисортовой изменчивости. Методами молекулярной гибридизации по Саузерну и амплификации изучен полиморфизм ДНК клонов сортов Рипария Глуар де Монпелье, Рипария × Рупестрис 101-14, Каберне Совиньон, Рислинг рейнский. Показано, что внутрисортовая вариабельность рДНК клонов сортов Рипария × Рупестрис 101-14 и Каберне Совиньон обусловлена модификациями в области сайтов рестрикции фермента *AbaI*. Детектирована также изменчивость ДНК произвольно амплифицированных и интер-SSR последовательностей клонов сортов Рипария Глуар де Монпелье, Рипария × Рупестрис 101-14, Каберне Совиньон. Получен ряд молекулярных ДНК-локусов, которые могут быть использованы для идентификации клонов винограда.

© И.А. БАРЫШЕВА, М.И. ТУЛАЕВА, В.С. ЧИСНИКОВ,
2003

Введение. В центрах селекции винограда Украины сосредоточен генофонд отечественных и интродуцированных сортов. Большинство давно размножаемых сортов представлены отдельными клонами или смесью клонов. Клоны одного сорта могут отличаться друг от друга одним или несколькими качественными и количественными признаками или быть однородными.

В настоящее время в селекции винограда взамен изучения большого массива признаков необходимо найти ДНК-маркеры, которые могли бы идентифицировать отдельный клон и были бы стабильны в процессе вегетативного размножения. Для этих целей можно использовать две системы ДНК-маркеров — ДНК-маркерную систему, основанную на гибридизации (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов, ПДРФ), и маркерную систему, основанную на амплификации ДНК в полимеразной цепной реакции (ПЦР). В первой системе (ПДРФ) полиморфизм ДНК определяется подбором комбинации проба/фермент, во второй системе (ПЦР) — последовательности праймера.

Цель настоящей работы состояла в оценке возможности использования различных типов ДНК маркеров для получения клоноспецифичных молекулярно-генетических характеристик у некоторых сортов винограда, произрастающих на территории Украины.

Для детекции внутрисортовой изменчивости ДНК винограда мы определили подход, который основывается на отборе проба/фермент ПДРФ комбинаций и ПЦР праймеров, при использовании которых выявляется значительное количество вариабельных локусов ДНК среди сортов *Vitis vinifera*. На наш взгляд, такой подход ускорит процесс молекулярного скрининга для идентификации клонов винограда, представляющих один сорт.

Материалы и методы. Материал для исследования предоставлен отделом клоновой и фитосанитарной селекции Института виноградарства и виноделия им. В.Е. Таирова. В исследование были взяты: 1) сорта *Vitis vinifera* — Каберне Совиньон, Рислинг рейнский, Ркацители, Мускат гамбургский, Мускат таировский; 2) 11 клонов подвойного сорта Рипария × Рупестрис 101-14 (Р×Р 101-14, межвидовой гибрид *Vitis riparia* × *V. rupestris*) (4923, 832, 992, 1182, 6733, 672, 4244, 6114, 2382, 12161, 22121),

3 клона подвойного сорта Рипария Глуар де Монпелье (*V. riparia*) (454, 852, 3121), 10 клонов технического сорта Каберне Совиньон (внутривидовой гибрид *V. vinifera*) (143113, 1441, 1473, 2043, 22103, 30231, 1076, 441, ИНРА, ЕНТАВ), 5 клонов технического сорта Рислинг рейнский (*V. vinifera*) (13101, 14161, 2071, 6846, 8121); 3) 10 индивидуальных растений клона 4923 сорта Рипария × Рупестрис 101-14, по 5 индивидуальных растений клонов 1076, 441, ЕНТАВ сорта Каберне Совиньон.

Результаты тестирования данного материала лабораторией вирусологии и микробиологии ИВиВ им. В.Е. Таирова показывают, что исследуемый материал свободен от бактериального рака и вирусов, вызывающих короткоузле, скручивание листьев, мраморность.

Клоны сорта Рипария × Рупестрис 101-14 выделены из насаждений сорта в 1983 г. в совхозе им. А.В. Суворова Болградского района Одесской области, клоны сорта Рипария Глуар де Монпелье — в 1986 г. в совхозах «Виноградовский» и «Кальникский» Закарпатской области, клоны сорта Рислинг рейнский — в 1986 г. в совхозе «Береговский» Закарпатской области. Клоны перечисленных сортов высажены на клоноиспытательные участки Института виноградарства и виноделия им. В.Е. Таирова. Клоны сорта Каберне Совиньон получены из разных климатических зон Украины: 1441, 1473, 441, 1076 выделены из насаждений сорта в Институте виноградарства и виноделия им. В.Е. Таирова; 2043, 22103 — в совхозе «Бурлюк» Крымской области; 143113, 22103 — в совхозе им. В.И. Ленина Херсонской области. Все перечисленные клоны сорта Каберне Совиньон были высажены на клоноиспытательные участки Института виноградарства и виноделия им. В.Е. Таирова в 1984 г. ИНРА, ЕНТАВ — интродуцированные клоны французской селекции, заложены в испытания в 1985 г.

У клонов сорта Рипария × Рупестрис 101-14 наблюдаются вариации с женскими и мужскими типами цветков и окраской верхушки побега (красная и зеленая). Клоны сорта Каберне Совиньон отличаются по форме грозди (гроздь с крылом и цилиндрико-коническая). Клоны сортов Рипария Глуар де Монпелье и Рислинг рейнский фенотипически сходны. Клоны перечисленных сортов представлены

первым вегетативным поколением кустов — родоначальников клонов.

Виноградную ДНК выделяли по методу, разработанному в отделе генной инженерии СГИ [1]. Концентрацию ДНК определяли при помощи флюориметра Hitachi F 400.

ПДРФ. ДНК гидролизовали рестриктазой *AluI*, фракционировали в 1 %-ном агарозном геле в 1×TBE буфере и проводили блоттинг по Саузерну. В качестве пробы использовали фрагмент гена рибосомальной ДНК, содержащей участки 18S и 26S, а также межгенный спайсер (рTU 3) [2]. Пробу метили ^{32}P , гибридизовали 24–36 ч. Отмывку проводили два раза по 20 мин 2×SSC, 0,1 % SDS, затем 0,1×SSC, 0,1 % SDS два раза по 10 мин. Длительность экспозиции от 2 до 10 дней.

ПП-ПЦР (произвольно праймированная ПЦР). В качестве праймеров были взяты 22 олигонуклеотида произвольной последовательности от 15 до 28 нуклеотидов в длину (таблица). Анализ продуктов амплификации осуществляли в 2%-ном агарозном геле в трис-боратном буфере, окрашивали этидиум бромидом и визуализировали в УФ-свете. Реакцию амплификации проводили в 2–3 повторностях. Реакционная смесь для амплификации содержала: 25 нг геномной ДНК, 200 мкМ каждого dNTP, 0,05M KCl, 0,02M три-НСl pH 8,4, 4,5 мМ MgCl₂, 0,01 % твин 20, 0,2 мкМ праймера, 1 ед. Таq-полимеразы. Параметры температурных циклов предусматривают инкубацию образцов при трех температурах, соответствующих трем этапам цикла амплификации — денатурации, гибридизации, синтеза. Амплификацию проводили в режиме: 1) 94 °C — 4 мин; 2) 42 °C — 1,8 мин, 72 °C — 2 мин, 94 °C — 1 мин (5 циклов); 3) 52 °C — 1,8 мин, 72 °C — 2 мин, 94 °C — 1 мин (35 циклов); 4) 52 °C — 4 мин, 72 °C — 10 мин. Для всех произвольных праймеров были выдержаны указанные условия амплификации.

ISSR-ПЦР (inter simple sequence repeats). В качестве праймеров были использованы 8 динуклеотидных и 8 тринуклеотидных повторов с вырожденными основаниями в качестве якоря (MWG, Germany) (таблица). Для каждого праймера были подобраны условия амплификации, в которых он воспроизводил четкие фрагменты. Реакционная смесь для амплифика-

ции содержала: 25 нг геномной ДНК, 200 мкМ каждого dNTP, 0,05М KCl, 0,02М трис-HCl pH 9,0, 1,5–3 мМ MgCl₂ (в зависимости от последовательности праймера), 0,01 % твин 20, 0,2 мкМ праймера, 1 ед. Таq-полимеразы. Амплификацию проводили в режиме: 1) 94 °C – 0,5 мин; 52–62 °C – 0,5 мин (в зависимости от последовательности праймера); 72 °C – 2 мин (35 циклов); 2) 72 °C – 5 мин. Анализ продуктов амплификации осуществляли в полиакриламидном геле (ПААГ, 6–8 %) в трис-боратном буфере. Результаты визуализировали окрашиванием геля азотнокислым серебром [3]. Реакцию амплификации проводили в двух повторностях.

Оценку достоверности разницы между средними арифметическими показателей двух групп праймеров проводили стандартными статистическими методами [4].

Результаты исследований и их обсуждение. Проведенное нами ранее исследование [5] полиморфизма ДНК сортов винограда методом ПДРФ продемонстрировало, что информативными являются данные, полученные при использовании комбинации pTU3/AluI, поэтому она применялась для изучения внутрисортовой изменчивости ДНК винограда. Известно, что Alu-повторы определяют гипервариабельные районы в геноме человека [6], вариабельность Alu-повторов показана также у растений [7].

Результаты ПДРФ-анализа подвойного сорта Рипария × Рупестрис 101-14 показали, что клоны этого сорта разделились на две группы. Одну группу составляют клоны 4923, 832, 2382, другую группу — клоны 1182, 992, 6733, 672, 12161, 22121, 6114, 4244. У первой группы клонов отсутствовали полосы гибридизации размером 2995, 2620, 1400 п.о. Клоны технического сорта Каберне Совиньон в пределах данной комбинации также представлены двумя группами: первая — 2043, 22103, 30231, вторая — 143113, 1441, 1473, 1076, 441, ИНРА, ЕНТАВ. Группы различались рядом полиморфных фрагментов гибридизации: 4530, 3320, 2620, 1660 п.о. Различий по рибосомальной ДНК среди клонов подвойного сорта Рипария Глуар де Монпелье и технического сорта Рислинга рейнского не наблюдалось.

Изменчивость длины и структуры рибосомальной ДНК, как известно, используется для оценки полиморфизма ДНК высших расте-

ний. Межгенный спейсер рДНК демонстрирует широкую гетерогенность в длину у цветущих растений на внутри- и межиндивидуальном уровне, обусловленную количеством субповторов [8, 9].

Для повторяющихся единиц рДНК винограда (*Vitis*) характерен полиморфизм длины, который составляет 9,14–12,15 т.п.о. в пределах и между видами. Число копий таких повторов в диплоидном геноме *V. champini* и *V. vinifera* (Каберне Совиньон) составляет 1,500 и 2,500 соответственно [10]. Варьирование структуры межгенного спейсера рДНК винограда показано Thomas и др. [10], Matsumoto и др. [11] при исследовании диких и культурных сортов с пробами, соответствующими фрагментам межгенного спейсера рДНК *V. champani* и *V. vinifera*. Семь изолированных клонов рДНК из библиотеки *V. champini* имели размер 9,14 т.п.о. и соответствовали единице повтора рДНК. Неоднородность повторов рДНК наблюдали у представителя сорта Каберне Совиньон (*V. vinifera*): из 10 клонов 4 различались размером полного повтора, обусловленного вариабельностью в области межгенного спейсера [10]. Нами обнаружены изменения последовательности области сайтов рестрикции фермента AluI рДНК в пределах сортов Рипария × Рупестрис 101-14 и Каберне Совиньон, в результате чего каждый сорт представлен двумя типами повторов рДНК.

Для изучения генетического разнообразия клонов методом амплификации с произвольными и ISSR праймерами нами осуществлен скрининг праймеров (таблица) на основе анализа полиморфизма ДНК сортов Каберне Совиньон, Рислинг рейнский, Мускат гамбургский, Ркацители и Мускат таировский. Сорта представлены из разных эколого-географических групп. Первые три сорта относятся к западно-европейской эколого-географической группе, Ркацители и Мускат таировский — к группе бассейна Черного моря. В то же время Мускат гамбургский и Мускат таировский являются близкородственными сортами [12].

Нами исследовано 322 амплифицированных ДНК локуса, из которых 173 полиморфных. Между Мускатом гамбургским и Мускатом таировским из 22 произвольных праймеров 13 выявили 24 полиморфных ДНК-локуса. Большое

число вариабельных ДНК-локусов амплифицировалось в ПЦР с праймерами P5, P8, P12, P14, P18, P23, P63 (таблица). На следующем этапе эти праймеры использовали для детекции изменчивости клонов. С 4 праймерами (P5, P8, P14, P18) в реакции амплификации получили продукты, определяющие различия среди представленных клонов.

Анализ продуктов амплификации ДНК клонов сорта Рипария × Рупестрис 101-14 с произвольными праймерами показал разделение на две группы, которые можно дискриминировать по набору электрофоретических полиморфных полос: 736 п.о. (P8); 808 п.о. (P14); 1136, 812, 1274 п.о. (P5). Эти результаты согласуются с результатами ПДРФ-анализа. Одна группа клонов сорта Каберне Совиньон (2043, 22103, 30231) отличалась от другой группы (143113, 1441, 1473, 1076, 441, ИНРА, ЕНТАВ) фрагментами амплификации ДНК размером 539, 1387, 788 п.о. (P14) (рис. 1); 1556, 699 п.о. (P18). Но

продукт амплификации 788 п.о. (P14) дополнительно дифференцировал французские клоны и клоны, полученные в ИВиВ им. В.Е. Таирова. Обнаружено отличие среди клонов сорта Рипария Глуар де Монпелье. Фрагмент амплификации 934 п.о. (P5) присутствовал только у клона 454. Идентичные спектры продуктов амплификации ДНК наблюдали у клонов сорта Рислинг рейнский при использовании в ПЦР всех отобранных праймеров.

По результатам генетического анализа 10 произвольно выбранных индивидуальных растений клона 4932 сорта Рипария × Рупестрис 101-14 (P5, P8, P14), 5 индивидуальных растений клонов 441, 1076, ЕНТАВ сорта Каберне Совиньон (P14, P18) с помощью ПЦР различий между ДНК отдельных кустов сорто-клонов не найдено. Это говорит о гомогенности популяций клонов и их генотипической выравненности.

Известно, что в геноме винограда микросателлитные повторы довольно многочисленны.

Характеристика произвольных и ISSR праймеров, выявляющих полиморфизм ДНК сортов *V. vinifera*

Код	Последовательность (5'-3')	Общее количество ПЦР локусов	Уровень полиморфизма, %	Код	Последовательность (5'-3')	Общее количество ПЦР локусов	Уровень полиморфизма, %
Произвольные праймеры							
P2	GACAGACAGACAGACA	7	28,5	P1*	(GTG) ₉ A	21	57
P3	GATTAGGTGACACTATAG	6	43	P2	(AGC) ₉ T	1	0
P5*	AGGTCTTAACCTGACTAACAT	15	60	P3	(TGC) ₉ A	—	—
P6	CAGCAAGTTCAGCCTGG	4	25	P4*	(ACC) ₉ G	15	27
P8*	CAGGAAACAGCTATGAC	22	72	P5	(GCT) ₉ A	1	0
P9	ACACACAGGAGAGTAAGAGG	21	19	P6*	(GAG) ₉ C	23	73
P10	CCACCCCTGCTTACAGCAATG	8	37,5	P7	(AGC) ₉ C	10	50
P11	ATGGAAACGGAGAAATTATG	22	36	P8	(GTG) ₉ C	9	11
P12	CCTTCTCACTTGGCAAATAC	24	83	P9	(TG) ₉ A	12	42
P13	TGTGAGTAGAGGAGACCTCACATT	6	17	P10	(AC) ₉ T	10	40
P14*	AGGTGAGACATTACTCAATCCAAG	29	89	P11*	(AG) ₉ C	12	75
P15	GAAACTGGCCTCCAAACACTG	2	0	P12	(TG) ₉ C	7	28
	CCCCCG			P13	(GT) ₉ C	—	—
P17	CGAAGAGTGAAGTGCACAGG	3	0	P15	(AC) ₉ C	10	40
P18*	CACAGTCTTATTCTTCAGCG	19	63	P16*	(GA) ₉ C	14	64
P19	GGGCCCTGTCTCAGCTGGGA	22	54,5	P17	(CA) ₁₀ G	7	33
P20	TGGCCTGGCTGCCCTGAGCAG	3	0				
P22	TTATGAAAACGACGGCCAGT	14	43				
P23	TTCTCTGAATCGGA	18	72				
P62	TGCAGGACACCCGCCCAA	10	10				
P63	CTGCCGCACTTGATACGTTG	23	83				
P64	TGACCGGCAGCAAAATG	21	43				
P76	CCACACAAAGAAGCAATGG	23	39				

* Клоноспецифические праймеры.

Исследованиями Wang и др. [13] показано, что динуклеотидные микросателлиты превалируют в растениях над тринуклеотидными и тетрануклеотидными повторами. Аналогичная ситуация отмечена Thomas и др. [10] у винограда. При использовании в качестве зонда собственно повторов в методе ПДРФ образуется спектр фрагментов в виде пятна [10]. Большое количество микросателлитных повторов предполагает, что в случае применения такого повтора в качестве праймера результатом амплификации ДНК также будет неразличимый спектр электрофоретических фрагментов. Поэтому для выявления четких продуктов амплификации мы использовали 3'-монозаякоренные праймеры (таблица), что по результатам ISSR-анализа [14] обеспечивает большую специфичность по сравнению с 5'-заякоренными праймерами.

На основании анализа амплификации ДНК сортов винограда с 16 ISSR праймерами, обнаружен 151 ДНК-локус, из которых 75 полиморфны. Между ДНК двух близкородственных сортов Муската гамбургского и Муската таировского при использовании в ПЦР 7 праймеров выявляли 15 полиморфных локусов. Высокий уровень вариабельности ДНК среди сортов тестирован по фрагментам амплификации, образованным с праймерами P₁, P₆, P₉, P₁₀, P₁₁, P₁₅, P₁₆ (таблица). Эти праймеры использованы нами для исследования изменчивости ДНК клонов. Для получения хорошо читаемых электрофоретических спектров продуктов амплификации ДНК мы проводили отработку условий реакции с изменением концентрации MgCl₂ и температуры гибридизации праймера с ДНК винограда, при этом применение праймеров P₃ и P₁₃ не позволило получить видимых результатов.

Разделение клонов сортов Рипария × Рупестрис 101-14, Каберне Совиньон, Рислинг рейнски на группы по ISSR-локусам и ПДРФ-локусам совпадало. У клонов сорта Рипария × Рупестрис 101-14 наблюдалась полиморфные фрагменты при амплификации ДНК с праймерами: P₁ (553 п.о.) (рис. 2), P₆ (850, 706, 360 п.о.), P₁₁ (406 п.о.), P₁₆ (610, 617, 654 п.о.). Две группы клонов сорта Каберне Совиньон различались по набору специфических продуктов амплификации ДНК: 267, 672 п.о. (P₁); 1109,

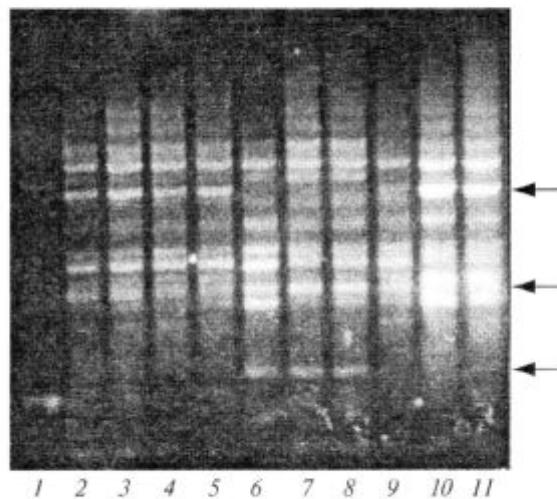


Рис. 1. Электрофорез продуктов амплификации ДНК клонов сорта Каберне Совиньон с праймером P14 в агарозном геле: 1 — pUC18:R TaqI; 2 — 1076; 3 — 143113; 4 — 1441; 5 — 1473; 6 — 2043; 7 — 22103; 8 — 30251; 9 — 441; 10 — ЕНТАВ; 11 — ИНРА. Стрелкой указаны положения полиморфных фрагментов амплификации ДНК

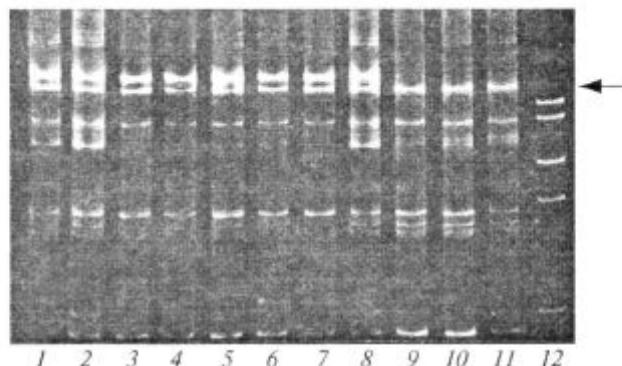


Рис. 2. Электрофорез продуктов амплификации ДНК клонов сорта Рипария × Рупестрис 101-14 с праймером P1 в ПААГе: 1 — 6114; 2 — 672; 3 — 4244; 4 — 992; 5 — 1182; 6 — 22121; 7 — 12161; 8 — 6733; 9 — 4923; 10 — 2382; 11 — 832; 12 — pUC18:R MspI. Стрелкой указаны положения полиморфных фрагментов амплификации ДНК

850, 447, 407 п.о. (P₆); 1138 п.о. (P₁₁). Среди клонов Рипария Глуар де Монпелье так же, как по результатам ПП-ПЦР, выделялся клон 454 наличием индивидуальных электрофоретических фрагментов: 266, 970 п.о. (P₁); 873 п.о. (P₆). Несмотря на то, что по данным амплификации ДНК с праймером P₄, межсортовой уровень полиморфизма ДНК составил 27 % (таблица), с помощью этого праймера выявлено

по одному полиморфному фрагменту амплификации ДНК среди клонов сортов Каберне Совиньон (фрагмент 527 п.о. у образцов 2043, 22103, 30231) и Рипария Глуар де Монпелье (фрагмент 1254 п.о. у образца 454).

Следует отметить, что среди ISSR праймеров имеются такие, что отличаются только якорным нуклеотидом (P_1 и P_8 , P_2 и P_7 , P_9 и P_{12} , P_{10} и P_{15}) (таблица). Характеристика количества амплифицированных локусов и уровня полиморфизма ДНК позволяет заключить, что якорный нуклеотид 3'-конца праймера играет роль в выборе сайтов праймирования и, следовательно, в количестве ДНК-локусов, уровне полиморфизма. Для успешной амплификации необходимо, чтобы праймер правильно состыковывался с матрицей, особенно на 3'-конце праймера, с которого полимераза начинает синтез второй цепи. Домен из первых 6–8 нуклеотидов заключает район наибольшей ответственности за направление процесса амплификации. Изменение одного основания внутри домена по направлению к 3'-концу значительно изменяет спектр продуктов амплификации [15, 16]. При использовании в реакции амплификации таких праймеров (P_1 и P_8 , P_2 и P_7 , P_9 и P_{12}) проявляются различия в количестве амплифицированных локусов и уровне полиморфизма ДНК у сортов. Величина t -критерия Стьюдента разницы между средними арифметическими показателей двух групп праймеров (1 – P_1 , P_7 , P_9 , P_{15} , 2 – P_8 , P_2 , P_{12} , P_{10}) достоверна только для уровня полиморфизма ДНК и составляет $t = 2,83$ при уровне значимости $P < 0,05$.

Полученный нами набор полиморфных фрагментов гибридизации и амплификации ДНК позволяет четко дифференцировать клоны сортов Рипария × Рупестрис 101-14, Рипария Глуар де Монпелье и Каберне Совиньон и может быть использован в качестве молекулярных маркеров исследованных клонов. Наблюдалась согласованность результатов, полученных ПДРФ и ПЦР методами. Два типа ПЦР-маркеров дополнительно дифференцировали клоны сорта Рипария Глуар де Монпелье, ПП-ПЦР-маркеры – интродуцированные французские клоны ИНРА, ЕНТАВ и клон, полученные в ИВИ им. В.Е. Таирова. Различия в дифференцирующей способности маркеров (ПДРФ, ПП-ПЦР,

ISSR) могут быть связаны как со структурной организацией самих маркерных последовательностей, так и со спецификой их распределения в геноме винограда.

Интересно отметить, что клоны сорта Рипария × Рупестрис 101-14 имели морфологические отличия. У клонов 4923, 832, 2382 мужской тип цветка и красная окраска верхушки побега. Их генотип по распределению ДНК фрагментов (ПДРФ, ПЦР) отличался от генотипа клонов 992, 1182, 6733, 672, 4244, 6114, 12161, 2212 с женским типом цветка и зеленой окраской верхушки побега.

Две группы клонов сорта Каберне Совиньон различались по форме грозди. Гроздь с крылом имели клоны 441, 1473, ИНРА, у остальных – гроздь цилиндроконическая. Деление клонов на группы по ДНК-локусам и морфологическому признаку не совпадали.

В практике исследования внутрисортовой изменчивости установлена гетерогенность некоторых сортов с использованием разного типа маркеров.

Попытка дифференцировать близкородственные сорта Пино SSR-маркерами (simple sequence repeats) оказалась безуспешной. Сорта Пино были получены на основе вегетативной изменчивости и отличаются окраской ягоды (белый, серый, черный). Их генетическое различие подтверждено RAPD-маркерами (random amplified polymorphic DNA) [17–19]. Внутрисортовая изменчивость по SSR-маркерам отмечена только в одном случае у клонов сорта White Riesling [20]. По мнению одних авторов [21], микросателлиты скринируют небольшую фракцию генома, определяя один локус на гаплоидный геном, по мнению других [17], расположение этих маркеров в некодирующих областях затрудняет обнаружение полиморфизма, особенно в случаях морфологических признаков (например, у сортов группы Пино). Более эффективно для этих целей использование многолокусных ПЦР технологий – RAPD, ISSR, AFLP. Из трех типов ДНК-маркеров (SSR, ISSR, RAPD), применяемых для исследования морфологически различных клонов сорта White Riesling, RAPD-маркеры позволили обнаружить наибольший уровень полиморфизма [20]. Как отмечают Regner и др. [20], RAPD метод можно использовать только для диффе-

ренциации клонов. Два других метода можно рассматривать как потенциальные источники ДНК-маркеров клонов.

По мнению многих авторов [22, 23], метод ПЦР с произвольными праймерами является менее надежным в сравнении с другими ПЦР методами и характеризуется невоспроизводимостью, особенно в отношении слабо интенсивных фрагментов, а также фрагментов размером менее 200 п.о. и более 1600 п.о. При этом от 5 до 20 % фрагментов ДНК одного размера у исследуемых образцов могут быть негомологичными [24, 25]. Температура, при которой происходит гибридизация произвольных праймеров, ниже, чем в других типах ПЦР. Возможно, что это есть одна из причин плохой воспроизводимости метода. Но, как утверждают This и др. [26], отработка условий для проведения реакции, скрининг праймеров и фрагментов амплификации позволяют применять этот метод для идентификации сортов и других целей исследования.

Сравнение результатов, характеризующих воспроизводимость RAPD и ISSR методов, показало лучшую воспроизводимость ISSR метода [14]. При подсчете всех RAPD полос воспроизводимость составила 76 % по сравнению с 83 % для ISSR полос. Когда фрагменты слабой интенсивности были исключены из подсчета, воспроизводимость составила 85,8 и 91,8 % соответственно. Различия в воспроизводимости методов до и после удаления полос, вероятно, могли быть следствием температуры гибридизации, более высокой и специфичной для ISSR.

Что касается AFLP метода, то его применение позволяет одномоментно проанализировать значительную часть генома. В результате реакции амплификации образуется до 100–150 фрагментов. Поэтому обнаружение соматических мутаций клонов винограда AFLP методом эффективнее по сравнению с другими молекулярно-генетическими методами [27].

Проведенное нами исследование показало, что у винограда рода *Vitis* AluI-повторы проявили вариабельность рДНК на различных таксономических уровнях: видовом, сортовом [5] и внутрисортовом. Внутрисортовая изменчивость детектирована также по произвольно праймированным и ISSR-локусам. У клонов

нами выявлено больше полиморфных фрагментов ДНК ISSR методом, чем ПП-ПЦР. На основе статистической обработки данных показано, что якорный нуклеотид на 3'-конце ISSR праймеров влияет на уровень полиморфизма ДНК сортов.

Таким образом, оценка внутрисортовой изменчивости межвидового гибрида Рипария × Рупестрис 101-14 (*V. riparia* × *V. ripestrис*), сорта Рипария Глуар де Монпелье (*V. riparia*) и внутристорового гибрида Каберне Совиньон (*V. vinifera*) свидетельствует о том, что клоны, представляющие данные сорта, гетерогенны. Разделение клонов сорта Рипария × Рупестрис 101-14 (*V. riparia* × *V. ripestrис*) по морфологическим признакам и ДНК-локусам совпадают. Подобранные проба/фермент комбинация, произвольные и ISSR праймеры можно рекомендовать для изучения генетического разнообразия клонов других сортов винограда.

Использование ПДРФ и ПЦР методов для исследования внутрисортовой изменчивости клонов винограда продемонстрировало, что ПЦР-маркеры, проявляющие доминантный тип наследования, оказываются полезными в сравнительных анализах и служат дополнением к кодоминантным ПДРФ-маркерам, что позволяет четко идентифицировать генотип растения.

SUMMARY. Evaluation of DNA polymorphism among *Vitis vinifera* varieties using RFLP and PCR methods has been performed to choose a DNA technology for detection of grape intracultivar variation. DNA polymorphism of clones of the varieties Riparia Gluar, Riparia × Rupestris 101-14, Cabernet Sauvignon, Riesling reinskiy has been studied using Southern hybridization and amplification techniques. It has been shown that grape intracultivar variability of rDNA in Riparia × Rupestris 101-14 and Cabernet Sauvignon clones was caused by the modification in AluI restriction sites of rDNA. DNA variability of the randomly amplified and inter-SSR sequences of the Riparia Gluar, Riparia × Rupestris 101-14, Cabernet Sauvignon clones was also detected. A set of molecular DNA loci which can be used for grape clone identification has been obtained.

РЕЗЮМЕ. Проведено оцінку полімофізму ДНК серед сортів *Vitis vinifera* ПДРФ та ПЛР методами з метою добору ДНК технології для детекції внутрішньосортової мінливості. Методами молекулярної гібридизації по Саузерну та ампліфікації досліджено полімофізм ДНК клонів сортів Ріпарія Глуар де Монпельє, Ріпарія × Рупестріс 101-14, Каберне Совіньон, Ріслінг

рейнський. Відзначено, що внутрішньосортова варіаційність рДНК клонів сортів Pinaria × Ruprecht 101-14 і Каберне Совіньон обумовлена модифікаціями в області сайтів рестрикцій фермента AluI. Детектовано також мінливість ДНК довільно ампліфікованих та інтер-SSR послідовностей клонів сортів Pinaria Глуар де Монпельє, Pinaria × Ruprecht 101-14, Каберне Совіньон. Отриманий ряд молекулярних ДНК-локусів може бути використаний для ідентифікації клонів винограду.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сиволап Ю.М., Вербицкая Т.Г., Прокопенко С.Н., Тулаева М.И. Исследование внутривидового полиморфизма *Vitis vinifera* // Цитология и генетика. — 1993. — 27, № 3. — С. 11–15.
2. Вахитов В.А. Структурно-функциональная организация генов ядерных рибосомных РНК у пшеницы и ее диких сородичей : Автoref. дис. ... д-ра биол. наук. — Киев, 1989. — 35 с.
3. Budowle B., Chakraborty R., Giusti A.M., Eisenberg A.J., Allen R.C. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE // Amer. J. Hum. Genet. — 1991. — 48. — P. 137–144.
4. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. — Минск : Выш. шк., 1973. — С. 80–100.
5. Сиволап Ю.М., Вербицкая Т.Г., Тулаева М.И., Барышева И.А. Анализ генетических дистанций ПДРФ у винограда // Цитология и генетика. — 1993. — 27, № 6. — С. 24–29.
6. Zietkiewicz E., Małgorzata L., Sinnett D., Glorieux F.H., Labuda D. Linkage mapping by simultaneous screening of multiple polymorphic loci using Alu oligonucleotide-directed PCR // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1992. — 89. — P. 8448–8451.
7. Alix K., Paulet F., Glaszmann J.-C., D'Hont A. Inter-Alu-like species-specific sequences in the *Saccharum* complex // Theor. Appl. Genet. — 1999. — 99. — P. 962–968.
8. Flavell R.B., O'Dell M., Sharp P., Nevo E., Beiles A. Variation in intergenic spacer of ribosomal DNA of wild wheat, *Triticum dicoccoides* in Israel // Mol. Biol. Evol. — 1986. — 3. — P. 547–558.
9. Appels R., Dvorak J. The wheat ribosomal DNA spacer region: its structure and variation in population and among species // Theor. Appl. Genet. — 1982. — 63. — P. 337–348.
10. Thomas M.R., Matsumoto S., Cain P., Scott N.S. Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification // Theor. Appl. Genet. — 1993. — 86. — P. 173–180.
11. Matsumoto S., Tsuchiya T., Hoshi N., Soejima J., Thomas M.R., Scott N.S., Ejiri S. Polymorphism of ribosomal RNA genes in *Vitis* and *Malus* // Techniques on gene diagnosis and breeding in fruits trees. Fruit tree research station. — Tsukuba, Japan, 1993. — P. 14–25.
12. Сорта винограда / Под. ред. Е.Н. Докучаевой. — Киев : Урожай, 1986. — 272 с.
13. Wang Z., Weber G.L., Zhong G., Tanksley S.D. Survey of plant short tandem DNA repeats // Theor. Appl. Genet. — 1994. — 88. — P. 1–6.
14. Moreno S., Pedro J.P., Ortiz J.M. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm // Euphytica. — 1998. — 101. — P. 117–125.
15. Caetano-Anolles G. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers // PCR Meth. and Appl. — 1993. — 3. — P. 85–94.
16. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucl. Acids Res. — 1990. — 18. — P. 6531–6535.
17. Regner F., Stadlbauer A., Eisenheld C., Kaserer H. Genetic relationship among Pinots and related cultivars // Amer. J. Enol. Vitic. — 2000. — 51, № 1. — P. 7–14.
18. Regner F., Stadlbauer A., Kaserer H., Eisenheld C. Evaluation of Pinot clones with regard to agronomical and genetic aspects // Mitt. Klosterneuburg. — 1998. — 48. — P. 193–202.
19. Reish B.I., Weeden N.F., Spiegel-Roy P., Beckmann J., Ben-Hayyim G. Genetic analysis in *Vitis* using molecular markers // United States-Israel Binational Agricultural Research and Development Fundation (BARD). — 1995. — 150 p.
20. Regner F., Wiedeck E., Stadlbauer A. Differentiation and identification of White Riesling clones by genetic markers // Vitis. — 2000. — 39, № 3. — P. 103–107.
21. Siret R., Boursiquot J.M., Merle M.H., Cabanis J.C., This P. Toward the authentication of varietal wines by analysis of grape (*Vitis vinifera* L.) residual DNA in must and wine using microsatellite markers // J. Agric. Food Chem. — 2000. — 48. — P. 5035–5040.
22. Vidal J.R., Moreno S., Gogorcena Y., Masa A., Ortiz J.M. On the genetic relationship and origins of six grape cultivars of Galicia (Spain) using RAPD markers // Amer. J. Enol. Vitic. — 1999. — 50, № 1. — P. 69–75.
23. Adams R.P., Rieseberg L.H. The effects of non-homology in RAPD bands on similarity and multivariate statistical ordination in *Brassica* and *Helianthus* // Theor. Appl. Genet. — 1998. — 97. — P. 323–326.
24. Williams J.G.K., Hanafey M.K., Rafalski J.A., Tingey S.V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers // Meth. Enzymol. — 1993. — 218. — P. 704–740.
25. Thormann C.E., Ferreira M.E., Camargo L.E.A., Ti-vang J.G., Osborn T.C. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species // Theor. Appl. Genet. — 1994. — 88. — P. 973–980.
26. This P., Cuisset C., Boursiquot J.M. Development of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationship // Amer. J. Enol. Vitic. — 1997. — 48, № 4. — P. 492–501.
27. Scott K.D., Albert E.M., Lee L.S., Henry R.J. AFLP markers distinguishing an early mutant of Flame Seedless grape // Euphytica. — 2000. — 113. — P. 245–249.

Поступила 28.11.02