

УДК 601.4

СОЗДАНИЕ СОВРЕМЕННОЙ ТЕХНОЛОГИИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ СОРТОВ И ФОРМ ВИНОГРАДА НА ОСНОВЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА**А.В. Секридова¹, О.П. Малюченко¹, А.Г. Прилипов², Е.Н. Кислин³, И.А. Шилов¹**¹ *Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия*² *Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия*³ *Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия***ВВЕДЕНИЕ**

Виноград – одна из древнейших и значимых сельскохозяйственных культур, неизменно сопутствующая человечеству на всем протяжении его исторического развития. Одним из важных и необходимых этапов селекции винограда является точная идентификация сортов и диких форм. Традиционно отнесение образца к тому или иному сорту (форме) осуществлялась ампелографически (описательно) с помощью большого числа биоморфологических признаков. Часто встречающиеся ампелографические ошибки связаны как с субъективностью человеческой оценки, так и с варьированием оцениваемых признаков не только в зависимости от принадлежности растения к сорту (форме), но и от факторов среды произрастания, возраста растения и его физиологического состояния. Молекулярно-генетическая идентификация с помощью микросателлитного анализа является современным, точным, хорошо стандартизируемым и имеющим высокую дифференцирующую способность методом. Создание удобной технологии на основе данного метода актуально для селекционной работы по выбору кандидатов для скрещивания, оценки посадочного материала при закладке виноградников, оценки подвойных и привойных сортов, определения генетической дистанции и происхождения различных сортов и форм винограда, а также для сертификации и защиты авторских прав.

В настоящее время набор из 9-ти микросателлитных маркеров (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVMD28, VVMD25, VVMD32, VrZAG62, VrZAG79) признан большинством исследователей как наиболее удобный для генетической идентификации европейских сортов и форм винограда [1, 2]. Было установлено, что данные маркерные локусы обладают высоким уровнем аллельного полиморфизма (PIC) и разрешающей способности ($PD = 0.92 \div 0.96$) [3]. Однако, их использование имеет существенные ограничения, связанные с ди-нуклеотидной природой повторов. Большому количеству детектируемых аллелей по каждому локусу сопутствует близкое расположение соответствующих им пиков в получаемых генетических профилях. Таким образом вероятность ошибки при необходимости дифференцировки двух соседних аллелей, отличающихся на два нуклеотида, является чрезвычайно высокой [4].



Рисунок 1

Разрабатываемая нами технология генотипирования сортов и форм винограда основана на применении 9-ти указанных микросателлитных маркерах. Была отработана методика выделения ДНК из виноградных листьев. Количество и чистота получаемой ДНК воспроизводимо отвечали технологическим требованиям. В связи с необходимостью упрощения работы с большим количеством селекционного материала, нуждающегося в генетической идентификации, нами была создана мультиплексная PCR-система для одновременного получения фрагментов по всем 9-ти локусам в одной пробирке. Определение длин получаемых фрагментов осуществляли методом электрофореза с помощью автоматического генетического анализатора Applied Biosystems® 3130. Электрофорез по всем используемым локусам проводили в одном капилляре, что существенно уменьшает затраты необходимых реактивов. В качестве референса длин использовали коммерчески доступный стандарт LIZ600. Для предотвращения ошибок, вызванных возможным отличием профилей по каждому локусу на два нуклеотида, и увеличения точности системы разрабатывался дополнительный стандарт длин – аллельная лестница. Получали индивидуальные генетические профили следующего вида. (Рис. 1.)

Таким образом, нами была разработана вся технологическая цепочка идентификации сортов и форм винограда на основе микросателлитного анализа. Результат нашей работы направлен на усовершенствование селекционного процесса, а также имеет значение для фундаментальных генетических исследований и практических задач виноградарства.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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. V. 109. P. 1448–1458.
2. Malenica N., Šimon S., Besendorfer V., Maletić E., Kontić J.K., Pejić I. Whole genome amplification and microsatellite genotyping of herbarium DNA revealed the identity of an ancient grapevine cultivar // Naturwissenschaften. 2011. V. 98. P. 763–772.
3. Jakše J., Štajner N., Tomić L. and Javornik B. Application of Microsatellite Markers in Grapevine and Olives. // The Mediterranean Genetic Code – Grapevine and Olive. Croatia: INTECH. 2013. P. 27–50.
4. Cipriani G., Marrazzo M.T., Di Gaspero G., Pfeiffer A., Morgante M. and Testolin R. A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (*Vitis* spp.) genotyping // BMC Plant Biology [Open access]. 2008. V. 8:127. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/8/127>.

УДК 663/66

ВЛИЯНИЕ ФП ЦЕЛЛОЛЮКС-А НА ВЫХОД СБРАЖИВАЕМЫХ УГЛЕВОДОВ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ЭТАНОЛА ИЗ ЯЧМЕНЯ

А.Н. Яковлев¹, Г.В. Агафонов¹, Т.С. Ковалева¹, С.Ф. Яковлева¹, Т.Н. Тертычная²

¹ Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

² Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I, г. Воронеж, Россия

При производстве этанола из ячменя трудность заключается в высоком содержании гемицеллюлоз. Гемицеллюлозы ячменя способны к быстрому неограниченному набуханию, что влияет на вязкость промежуточных продуктов производства алкоголя. Использование дополнительных ферментных препаратов значительно увеличивает степень гидролиза растительного сырья до сбраживаемых дрожжами углеводов, сокращает сроки брожения, значительно улучшает показатели готовой бражки и конечного продукта.

Сырьём является очищенный ячмень с крахмалистостью 52 и влажностью 14,5 %. При проведении водно-тепловой и ферментативной обработки замеса использовали ферментные препараты Ликвафло – препарат, содержащий бактериальную термостабильную α -амилазу, произведенный генетически модифицированным штаммом микроорганизма *Bacillus licheniformis* и ЦеллоЛюкс – А, источник β -глюканазы, ксиланазы и целлюлазы.

Готовили замес с гидромодулем 1:3. В предварительно взвешенную коническую колбу на 1 дм³ поместили 100 г. измельченного сырья, добавили 300 мл воды температурой 60–65 и внесли рассчитанное количество ферментных препаратов Ликвафло в дозировке 0,30 ед. АС/г и ЦеллоЛюкс-А в дозировке 0,35 ед. ЦС/г. Тщательно перемешивали замес в течение 30 мин при температуре 50–55°C.