

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК ДЛЯ СКРИНИНГА ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНАХ ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ ВИНОГРАДА

В.А. Полтораченко¹, Я.И. Алексеев^{1,2}, Вей Чен³, В.А. Володин², С.М. Гориславец²,
В.И. Рисованная², С.А. Блинова^{1,4}

¹– ООО «Синтол», Москва, Россия

² ВНИИ виноградарства и виноделия «Магарач» РАН, республика Крым, Ялта

³ Юньнаньский аграрный университет, Китай

⁴ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

Растения рода *Vitis* имеют большое значение для сельского хозяйства. Внутри рода наибольшее распространение в мировой винодельческой промышленности получил европейский вид *Vitis vinifera* L. Подавляющее большинство сортов винограда относятся к *Vitis vinifera vinifera* (2n=38), почти все сорта высокогетерозисные, гермафродитные и клейстогамные, но несмотря на это, легко переопыляются. Из-за высокой степени генетического разнообразия, частого внесения во вторичные центры одомашнивания и наличия возможных гибридных форм, тысячи сортов винограда обычно классифицируют от конечного получаемого продукта. Огромное количество синонимичных генотипов привело к тому, что в мировых коллекциях зародышевой плазмы по данным разных авторов находится от 10 000 до 14 000 образцов (This et al., 2006).

Среди основных молекулярно-генетических методов сортовой идентификации винограда особое место занимают маркеры простых нуклеотидных повторов (SSR), которые на сегодняшний день остаются одним из основных диагностических инструментов (Arroyo-García et al, 2006; Grassi et al., 2003). В последнее время все большее распространение для изучения сортового различия геномов винограда получают маркеры однонуклеотидных замен (SNP), представленные как заменами, так и делециями / инсерциями. Маркеры SNP обладают низким показателем ошибки генотипирования и низкой вероятностью появления мутаций по сравнению с SSR маркерами, в связи с чем их использование позволяет повысить точность и надежность генетического типирования сортов (Carmona et al., 2008; Emanuelli et al., 2013).

Изучение полиморфизма генов актуально для анализа эволюционных аспектов создания сорта, а также для определения зависимости наличия разнообразных мутаций от интенсивности проявления признака, полученные данные можно использовать также для проведения селекционного процесса.

Ранние изучения Крымских сортов привели к возникновению гипотезы о синонимичности аборигенных сортов винограда Кефесия, Эким Кара, а сорт Крона был выделен в отдельный, однако очень близкий к сорту Эким Кара. В более поздние годы были проведены фенотипические исследования, результаты которых ставят под сомнение сведения в синонимы указанных сортов. Спорное предположение о происхождении аборигенных крымских сортов Эким Кара, Кефесия и Крона явилось толчком к изучению взаимосвязей и генетического полиморфизма целевых сортов на основе направленного анализа данных массового параллельного секвенирования (МПС).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве целевых генов для идентификации родства сортов Кефесия, Эким Кара и Крона были выбраны 10 генов хозяйственно ценных признаков (Е.Т. Ильницкая, М.В. Макаркина, 2016). Среди них три гена, определяющих устойчивость винограда к возбудителю милдью, гены *Rpv3* и *Rpv3-1*, а также ген *Rpv10*, унаследованный от *Vitis amurensis*; ген устойчивости к оидиуму (возбудитель *Erysiphe necator* (ранее *Uncinula necator*)) – *Run2* (VVin16); маркер *p3-VvAGL11*, который является наиболее полезным в селекционных программах на бессемянность; ген *Rcg1*, определяющий устойчивость к возбудителю бактериального рака (*Agrobacterium* sp.); маркер *DXS7*, ассоциируемый с синтезом монотерпенов, придающих вину «мускатный вкус»; маркер *Vvib23*, тесно связанный с геном, определяющим пол цветка; маркер *VMC1E11* ассоциированный с началом созревания плодов и ген *UFGT*, кодирующий фермент антоцианидин 3-О-гликозилтрансферазу. Большое мультигенное семейство гликозилтрансфераз вовлечено в процессы конъюгации гормонов, вторичных метаболитов, биотических и абиотических гормонов, непосредственно воздействуя на клеточный гомеостаз. Экспрессия *UFGT* не происходит в неокрашенных сортах винограда из-за ретротранспозон-индуцированной мутации в кодирующем факторе транскрипции гена *VvmybA1*, что является молекулярной основой белой окраски винограда (Ford et al., 1998; Nicole et al., 2013).

Данные полной нуклеотидной последовательности, полученной методом МПС на приборе NovaSeq (Illumina, США) для сортов Кефесия (две биологические повторности), Эким Кара (одна биологическая повторность) и Крона (одна биологическая повторность), предоставили коллеги из ФГБУН ВНИИВиВ «Магараж» РАН в виде парно-концевых последовательностей в формате fastq. В качестве референсной последовательности был выбран геном *Vitis vinifera* cultivar PN40024 из базы данных NCBI.

Оценку качества прочтений проводили с помощью программы FastQC. Выравнивание прочтений на референсную последовательность осуществляли с помощью приложения Bowtie2, без мультикартирования (-k1). Обработка выходных данных проводилась программой samtools; однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), с дальнейшей фильтрацией, получали с помощью программы VarScan v. 2.3.9. Полученные результаты визуализировали в графическом геномном браузере IGV v. 2.8.2., в нём же проводили анализ полученных результатов (рис. 1).

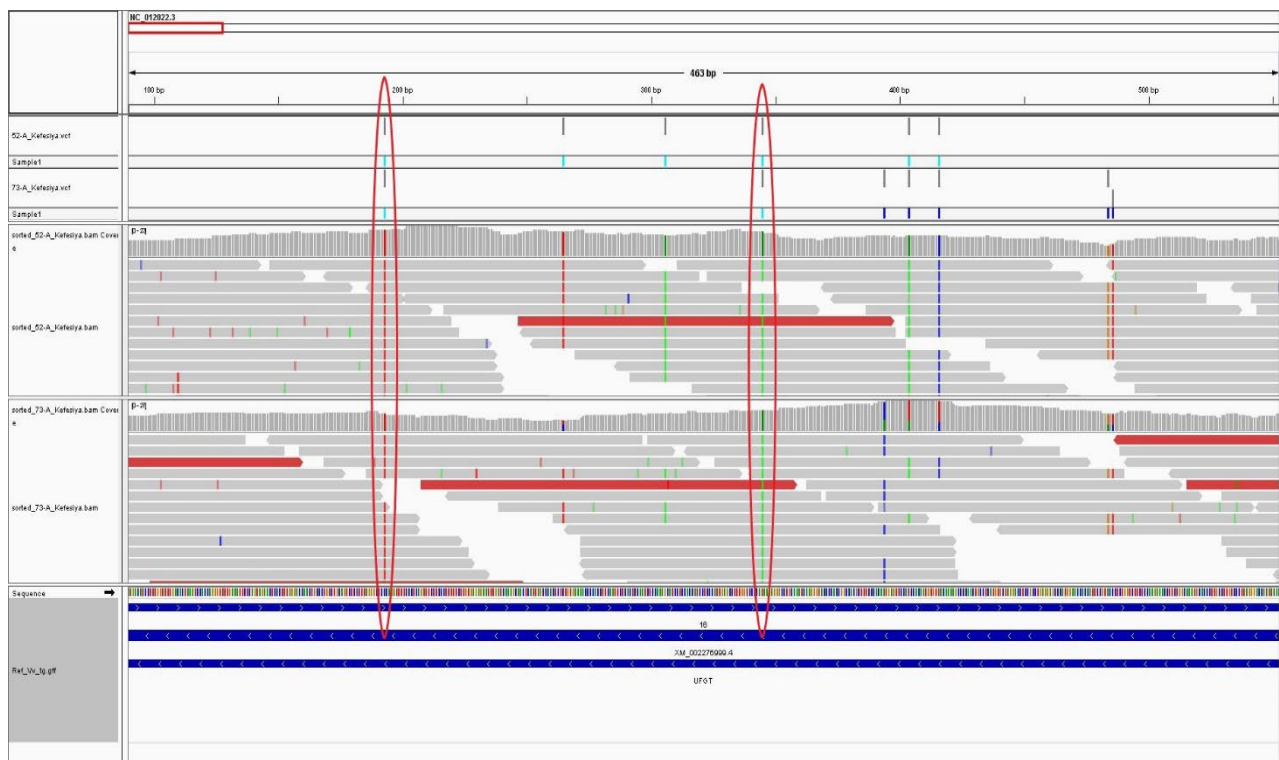


Рисунок 1. Пример анализа результатов поиска однонуклеотидных полиморфизмов в гене UFOT, в графическом геномном браузере IGV v. 2.8.2.

Растительный материал для выделения ДНК был получен из коллекции ФГБУН ВНИИВиВ «Магараж» РАН. Образец сорта Эким Кара был отобран в АО «Солнечная долина». Выделение нуклеиновых кислот проводили методом тотального осаждения, лизис с использованием цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ) и депротенинизацией хлороформом.

Для подтверждения найденных с помощью анализа полного генома нуклеотидных замен было проведено секвенирование по Сенгеру. Дизайн праймеров был проведен таким образом, чтобы в зону расшифровки попали исследуемые однонуклеотидные замены. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в реакционном буфере, в состав которого входили 3 mM $MgCl_2$, 0,25 mM смеси дНТФ, 2,5 единицы активности *SynTaq* ДНК-полимеразы (ООО «Синтол», Россия), концентрация праймеров F/R в реакционной смеси составляла 0,4 мкМ, при общем объеме реакционной смеси – 50 мкл. В реакцию брали 20 нг выделенной ДНК матрицы. Использовали следующую программу амплификации: 95 °C – 5 мин, (95 °C – 15 сек, 60 °C – 20 сек, 72 °C – 30 сек) 35 циклов, финальная элонгация 72 °C – 10 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате анализа, достоверных отличий между сортами по исследуемым признакам обнаружено не было. Однако, однонуклеотидные полиморфизмы по отношению к референсному геному сорта Пино Нуар, приводящие к аминокислотным заменам, были обнаружены в трёх из десяти исследованных мишеней – генах UFGT, Rpv10(GF09–46) и маркере VMC1E11 (Таблица 1).

Таблица 1. Однонуклеотидные полиморфизмы в целевых генах, приводящие к аминокислотным заменам.

UFGT – NC_012022.3 – 16 chr – 2333144...2334712 – 1569 b.p. Anthocyanidin-3-O-glucosyltransferase 2 – Berry skin colour						
Позиция	Реф.	Изм.	Реф. кодон	Изм. кодон	Реф. аминокислота	Изм. аминокислота
253	G	C	GCU	CCU	Аланин	Пролин
873	A	G	AUA	GUA	Изолейцин	Валин
1225	A	T	UAU	UUU	Тирозин	Фенилаланин
1377	G	A	GGA	AGA	Глицин	Аргинин
VMC1E11 – NC_012011.3 – 9 chr – 13707950...13712118 – 4169 b.p. Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase Atsg10290 – Veraison						
Позиция	Реф.	Изм.	Реф. кодон	Изм. кодон	Реф. аминокислота	Изм. аминокислота
2215	G	A	GGA	AGA	Глицин	Аргинин
3580	T	G	UUG	GUG	Лейцин	Валин
Rpv10(GF09–46) – NC_012024.3 – 18 chr – 769295...771986 – 2692 b.p. Subtilisin-like protease SBT1.4 – Mildew						
Позиция	Реф.	Изм.	Реф. кодон	Изм. кодон	Реф. аминокислота	Изм. аминокислота
319	G	A	GCC	ACC	Аланин	Треонин

Информация о биоинформатически выявленных полиморфизмах была проверена поиском по базам данных белков, а также по литературным данным.

VMC1E11, ДНК-маркер, ассоциированный с геном, отвечающим за начало созревания винограда, кодирует рецепторо-подобную серин / треонин-протеин киназу Atsg10290. Информация по найденным в этом маркере двум однонуклеотидным заменам, приводящим к заменам соответствующих аминокислот в белковых базах данных найдено не было, так как для *Vitis vinifera* данные об этом белке в белковых базах данных отсутствуют.

Продукт гена Rpv10(GF09–46) – субтилизин-подобная протеаза SBT1.4, является одним из ключевых компонентов, участвующих в механизме устойчивости к ложной мучнистой росе винограда (Милдью). В базе данных Uniprot, тип доказательства белка – выведен из гомолога, белок не кристаллизован (Uniprot [электронный ресурс]). Данных по найденным аминокислотным заменам в литературных источниках и белковых базах данных нет.

Ген UFGT – отвечает за окраску ягод винограда. В базе данных Uniprot тип доказательства белка – экспериментальные данные на уровне белка, белок кристаллизован. Фермент, кодируемый геном UFGT осуществляет реакцию гликозилирования с накоплением антоциановых пигментов, в присутствии необходимых цветовых факторов. Он участвует в образовании красных винных пигментов. Экспрессия UFGT в белом винограде не обнаружена (С.М. Ford et al, 1998). Замена в позиции 1225 описана в базе данных и является заменой на природный аминокислотный вариант. Замена в позиции 1377 так же описана в базе данных, в природном варианте по отношению к сорту Пино Нуар замена глицина на аргинин, что также подтверждено в нашем исследовании. Аминокислота находится в спиральной части вторичной структуры белка, влияние на каталитическую активность не описано. Замена в позиции 873 в базе данных также описана как замена на природный вариант аминокислоты. Замена в позиции 253 в базе данных Uniprot не описана, в кристаллизованном варианте в данной позиции находится аминокислота пролин, что также подтверждено в данном исследовании. В ферменте, кодируемом геном UFGT сорта Пино Нуар, в этой позиции находится аминокислота аланин. Влияние на каталитическую активность не описано.

Результаты секвенирования по Сенгеру для гена Rpv10(GF09–46) показали, что у всех исследуемых сортов в позиции 319, выявлен аденин, что подтверждает данные МПС. Помимо этого, в полученной в результате секвенирования по Сенгеру последовательности Пино Нуар, также оказался аденин, в отличие от референсной последовательности Пино Нуар, взятой из геномной базы данных.

Это говорит о том, что такой нуклеотидный вариант возможен для сорта Пино Нуар в качестве альтернативной аллели. Для гена, с которым ассоциирован ДНК-маркер VMC1E11, в позиции 2215 подтвердился альтернативный аденин, в двух сортах из трёх исследуемых, для третьего сорта не удалось получить качественную расшифровку результатов секвенирования. В позиции 3580 альтернативный гуанин подтвердился для всех трёх сортов, а также в полученной геномной последовательности сорта Пино Нуар, в указанной позиции был выявлен тимин, как и в референсном геноме Пино Нуар.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основная цель данной работы заключалась в попытке выяснить являются ли сорта Кефесия, Эким Кара и Крона синонимами, а не обособленными сортами винограда. Исходя из проведенного анализа полученных результатов нельзя сказать, что указанные сорта не являются синонимами, достоверных отличий по исследуемым генам выявлено не было. Для того, чтобы повысить точность установления степени родства между этими сортами необходимо расширить спектр исследуемых генов и маркеров генов, а также увеличить количество биологических повторностей.

Был проведен биоинформатический анализ полногеномных данных для поиска различий между близкими сортами винограда, а также поиск однонуклеотидных полиморфизмов в генах, отвечающих за хозяйственно ценные признаки. Результаты биоинформатического анализа были подтверждены классическим секвенированием.

В дальнейшем планируется продолжить поиск однонуклеотидных полиморфизмов и других изменений в генах, с целью анализа их возможного влияния на уровень экспрессии генов, каталитическую активность ферментов, а также на фенотип Крымских сортов винограда.

ЛИТЕРАТУРА

- Arroyo-Garcia R., Ruiz-Garcia L., Bolling L. et al. Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms // *Mol Ecol.* – 2006; 15. – p. 3707–3714. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03049.x.
- Carmona M.J., Chaib J., Martinez-Zapater J.M. et al. A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine // *J Exp Bot.* – 2008. 59. – p. 2579–2596. doi: 10.1093/jxb/ern160.
- Emanuelli F., Lorenzi S., Grzeskowiak L. et al. Genetic diversity and population structure assessed by SSR and SNP markers in a large germplasm collection of grape // *BMC Plant Biol.* – 2013; 13. – 39 P. doi: 10.1186/1471-2229-13-39.
- Ford C.M., Boss P.K., Hoj P.B. Cloning and characterization of *Vitis vinifera* UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize Bronze-1 locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins in vivo // *Biol Chem.* – 1998; 273(15). – p. 9224–9233. doi: 10.1074/jbc.273.15.9224.
- Grassi F., Labra M., Imatio S. et al. Evidence of a secondary grapevine domestication centre detected by SSR analysis // *Theor Appl Genet.* – 2003; 107. – p. 1315–1320. doi: 10.1007/s00122-003-1321-1.
- Nicole S., Barcaccia G., Erickson D.L. et al. The coding region of the UFGT gene is a source of diagnostic SNP markers that allow single-locus DNA genotyping for the assessment of cultivar identity and ancestry in grapevine (*Vitis vinifera* L.) // *BMC Res Notes.* – 2013; 6. – 502 P. doi: 10.1186/1756-0500-6-502
- This P., Lacombe T., Thomas R.M. Historical origins and genetic diversity of wine grapes // *Trends Genet.* – 2006; 22. – p. 511–519. doi: 10.1016/j.tig.2006.07.008.
- Ильницкая Е.Т., Макаркина М.В. Применение ДНК-маркеров в современных селекционно-генетических исследованиях винограда // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* – 2016; 20(4). – с. 528–536 DOI 10.18699/VJ16.163.
- Uniprot [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.uniprot.org/>. – (Дата обращения 02.06.2020)