

УДК:634.8:581.167:631.532

## МАРКЕР-СУПУТНИЙ ДОБІР ЗА ОЗНАКОЮ БЕЗНАСІННЄВОСТІ У ВИНОГРАДУ У ГІБРИДНІЙ ПОПУЛЯЦІЇ КОБЗАР Х РУСАЛКА 3

Карастан О. М., Мулюкіна Н. А., Плачинда Г. В., Папіна О. С.,  
Ковальова І. А., Герус Л. В.

ННЦ «Інститут виноградарства і виноробства ім. В. Є. Таїрова»

*Отримано алельні профілі мікросателітних локусів (VVS2, ZAG62, VVMD28, р3\_VVAGL11) сортів Кобзар, Русалка 3 та гібридів від їх схрещування. Показана ідентичність за походженням генотипів сіянців генотипам їх батьківських форм. Серед сіянців гібридної комбінації визначено рослини, що будуть проявляти безнасінневий фенотип. Виявлено два алеля 198у п. н. мікросателітного локусу р3\_VVAGL11, які мають відмінну асоціацію із ознакою безнасінневості у виноград.*

**Ключові слова:** мікросателіт, виноград, *V. vinifera* L., маркер-сопутний добір, безнасіннівості, гібридна популяція.

**Вступ.** В останні десятиріччя використання молекулярних маркерів поступово виходить за межі сфери наукового генетичного аналізу та проникає у планування та реалізацію комерційних наукових програм.

Молекулярні технології роботи з ДНК використовуються в програмах селекції різних видів рослин з метою оптимізації та покращення добору та створення нових сортів, які практично не можливо було би отримати іншим шляхом [8].

Існує два напрямки використання методів молекулярної генетики у селекції: виявлення поліморфізму структурних генів (так звані маркери першого типу, «прямі маркери», технологія «Genotyping assisted selection») та використання поліморфізму анонімних нуклеотидних послідовностей (маркери другого типу, «непрямі маркери», «зчеплені маркери», технологія «Marker assisted selection») [4].

Прямі маркери представляють собою фрагменти генів інтересу та найбільш зручні у використанні, проте їх ідентифікація потребує значних вкладень праці та коштів у порівнянні із зчепленими маркерами. Непрямі маркери – це поліморфні ділянки ДНК, що локалізовані на відносно невеликій відстані (не більше 5 сМ) від генів інтересу та успадковуються спільно із ними.

Маркер-сопутний добір – це відносно нова технологія сучасного селекційного процесу, при якій добір за ознакою інтересу проводиться в лабораторних умовах безпосередньо по генотипах, на відміну від прийомів класичної селекції, що оперує фенотиповим проявом ознак.

Основні переваги залучення молекулярних маркерів у селекційну роботу полягають у відсутності впливу умов зовнішнього середовища та агротехнічних прийомів на прояв ознаки інтересу, незалежності від віку та статі рослин, можливості розрізняти гомо- та гетерозиготні форми, проводити цілеспрямовану гібридизацію та прогнозувати кінцеві результати.

Більшість сучасних технологій маркер-супутнього добору ґрунтовані на використанні мікросателітних послідовностей (англ. Simple Sequence Repeats, SSR) або одонуклеотидних поліморфізмів (англ. Single Nucleotide Polymorphism, SNP) на широкому спектрі сільськогосподарських культур.

Завдяки популярності у кінцевого споживача, безнасінність стала однією із перших ознак, що були використані для маркер-супутнього добору у винограду.

Ознака безнасінності у винограду контролюється домінантним алелем гена-кандидата VvAGL11, що входить родини генів MADS-box [7].

Маркери типу SCAR – SCC8 та SCF27 – були визнані придатними для прогнозування безнасінних рослин [6, 11, 12] серед гібридних сіянців винограду, проте наявність нульових алелів та слабе зчеплення із локусом SDI, обмежує їх застосування на багатьох генетичних фонах [5].

Дослідниками [3] була показана можливість використання в маркер-супутньому доборі алеля 198 п. н. мікросателіта VMC7F2, розташованого за 463 п. н. від відкритої рамки зчитування гена VvAGL11.

Проте виявлення даного алеля у деяких насінних сортів (здебільшого нащадків сорту Мускат александрійський [5]), не дозволяє говорити про 100 % придатність для раннього скринінгу безнасінних рослин. Тому було Караач Е. із співав. [5] для запобігання вибору фальш-позитивних рослин було запропоновано використання гаплотипу алелів 198 п. н., 157 п. н. та 212 п. н. трьох фланкуючих ген-кандидат VvAGL11 мікросателітних маркерів – VMC7f2, VVIN16 та UDV-108, відповідно.

Бергаміні із спів. [1] на фоні 475 генотипів винограду було протестовано інтрагенний мікросателітний маркер p3\_VvAGL11, вперше виявлений та запропонований для використання в маркер-супутньому доборі за ознакою безнасінності Меїа та ін. [7] при дослідженні ролі гена VvAGL11 у стеноспермокарпічній безнасінності винограду.

Алель 198 п. н. мікросателіта p3\_VvAGL11 асоційований із домінантним алелем гена VvAGL11 при інтрагенному розташуванні мав би демонструвати 100 % асоціацію із безнасінним фенотипом . Проте дослідниками було виявлено вісім випадків «фальш-позитивних» зразків із алелем 198 п. н. та насінним фенотипом. Причини цього явища не аналізувалися.

Незважаючи на незначний відсоток (1,68 %) фальш-позитивних випадків, виявлений в роботі Бергаміні та ін., маркер p3\_VvAGL11, завдяки відсутності нульових алелів, інтрагенному розташуванню та відтворюваності результатів, на сьогоднішній день є найбільш оптимальним для проведення раннього скринінгу за ознакою безнасінності у винограду.

Таким чином, мета нашої роботи полягала у виявленні носіїв ознаки безнасінності шляхом ідентифікації сіянців гібридної комбінації схрещування Кобзар х Русалка 3 мікросателітним маркером p3\_VvAGL11.

**Матеріали та методи дослідження.** Рослинний матеріал був представлений 23 гібридними сіянцями комбінації схрещування Кобзар х Русалка 3 та батьківськими формами винограду *V. vinifera* L., люб'язно наданими відділом Селекції, генетики та ампелографії Національного наукового центру «Інститут виноградарства і виноробства ім. В. Є. Таїрова» (далі ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова»).

Листовий матеріал був відібраний на виноградних насадженнях колекції інституту та заморожений при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Для виділення ДНК було використано комерційний набір DNA Plant Kit (QIAGEN) згідно рекомендацій виробника.

Реакційна суміш для проведення ПЛР (обсягом 25 мкл) включала: буфер для ПЛР, 20 нг геномної ДНК, 200 мкМ кожного дНТФ, 2 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 од. Тор-полімерази, 0,2 мкМ прямого та зворотного праймерів до мікросателітних локусів (p3\_VvAGL11 [7], VVS2, ZAG62, VVMD28 [9]).

ПЛР була проведена на термоциклері «Терцик» (ДНК-технологія, РФ) у режимі: початковий цикл – 5 хв. при  $94^{\circ}\text{C}$ ; основний етап 35 циклів – 30 с при  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 с при  $64^{\circ}\text{C}$ , 30 с при  $72^{\circ}\text{C}$ ; фінальний етап 10 хв. при  $72^{\circ}\text{C}$ ; зберігання при  $4^{\circ}\text{C}$ . Концентрація  $\text{MgCl}_2$  та температура відпалювання праймерів встановлена експериментально (дані не наведені).

Візуалізацію продуктів ампліфікації було проведено шляхом електрофорезу у 8 % нативному поліакриламідному гелі (30 % розчин акриламідну та бісакриламідну (29 : 1), 5 х ТВЕ, 3 % APS і TEMED) з подальшим забарвленням у розчині 0,012 М аргентум нітрату (10 % етанол, 5 хв.; 1 %  $\text{HNO}_3$ , 3 хв.; 0,012 М  $\text{AgNO}_3$ , 20 хв.; 0,28 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  та 0,019 % формальдегід; 10 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$  – 2 хв.).

Розмір продуктів ампліфікації визначали за допомогою маркера молекулярної маси – pBR322 DNA / Bsu R1 (Hae III) (Fermentas) та комп'ютерної програми “Launch Vision WorksLS”.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Наразі в гібридному фонді ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» представлені чотири гібридні комбінації схрещування типу «насінневий х безнасінневий», що в подальшому будуть використані в селекційному процесі: Загадка х Безнасінневий Магарача, Аркадія х Белградський безнасінневий, Кобзар х Русалка 3 та Кобзар х Кишмиш таїровський.

Для проведення дослідження було обрано гібридну комбінацію схрещування Кобзар х Русалка 3, представники якої вже вступили у стадію плодоношення.

В роботі представлені результати мікросателітного аналізу чотирьох локусів 23 сіянців гібридної комбінації Кобзар х Русалка 3, а також їх батьківських форм (Табл.1).

**Таблиця 1**

**Мікросателітні профілі та фенотипи за ознакою безнасінності гібридних форм та їх батьківських сортів**

Батьківські сорти:	Алелі мікросателітних локусів, п. н.				Фенотип
	VVS2	ZAG62	VVMD28	p3_VVAGL1	
♀ Кобзар	137:157	190:196	242:242	188:198	насінневий
♂ Русалка 3	147:157	190:202	242:250	188:198	безнасінневий
Гібридні сіянці:					
1	137:157	190:196	242:242	188:198	-
2	137:157	190:196	242:242	188:198	насінневий
3	137:137	190:202	242:250	188:198	-
4	157:157	190:190	242:242	188:188	насінневий
5	157:157	190:196	242:242	188:188	насінневий
6	137:137	190:190	242:242	186:186	-
7	150:162	190:198	246:246	188:192	насінневий
8	157:157	190:190	242:242	188:198	насінневий
9	157:157	190:196	242:242	188:188	насінневий
10	137:157	190:202	242:242	198:198	безнасінневий
11	137:157	190:196	242:242	188:198	-
12	139:139	190:196	244:244	186:186	-
13	157:157	190:190	242:250	188:188	насінневий
14	137:157	190:190	242:242	198:198	-
15	137:157	190:198	244:244	184:184	-
16	147:157	190:190	242:242	188:198	-
17	137:157	196:202	242:250	188:188	насінневий
18	137:147	190:202	242:242	198:198	-
19	157:157	190:190	242:250	188:198	-
20	137:157	196:202	242:242	188:198	-
21	137:137	190:196	242:242	188:188	-
22	137:147	190:196	242:250	188:188	-
23	157:157	190:202	242:242	198:198	-

Примітка: рисою позначено відсутність даних щодо фенотипу.

Штучна гібридизація передбачає участь людського фактору, тому розповсюдженою практикою сучасної селекції є перевірка її результатів молекулярно-генетичними методами.

На першому етапі проведення маркер-супутнього добору ідентифікація сіянців гібридної комбінації для підтвердження їх походження від заявленої пари сортів є обов'язковою умовою.

З цією метою в дослідженні було використано молекулярно-генетичний аналіз за чотирма мікросателітними локусами (VVS2, ZAG62, VVMD28, p3\_VvAGL11) батьківських форм та їх нащадків.

Серед 23 представників гібридної сім'ї Кобзар х Русалка 3 чотири зразки (6, 7, 12, 15) було виключено з дослідження через невідповідність при порівнянні із генотипами батьківських сортів. На думку деяких авторів [8], даний факт може бути пов'язаний із помилкою при переміщенні гібридних сіянців до місць постійного культивування.

Другий етап маркер-супутнього добору передбачає ідентифікацію досліджуваних зразків за маркером (або кількома маркерами), які зчеплені із ознакою інтересу.

Інтрагенний мікросателітний маркер p3\_VvAGL11, на першому етапі маркер-супутнього добору був використаний для дослідження ідентичності за походженням. Виявлені генотипи зразків на другому етапі було проаналізовано на предмет наявності у цьому локусі алеля 198 п. н., який корелює із проявом ознаки безнасінності.

Проаналізувавши мікросателітні профілі маркеру p3\_VvAGL11, отримані нами при дослідженні 45 сортів колекції ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова» (дані не наведені) та доступні літературні джерела [1, 7, 13], ми дійшли до висновку, що алель 198 п. н. локусу p3\_VvAGL11 існує у двох варіантах, один з яких корелює із проявом ознаки безнасінності, та, ймовірно за все, виник в результаті тієї ж мутації у сорту Султаніна, що обумовила появу й ознаки безнасінності [2]. Інший алель 198 п. н. не пов'язаний із проявом ознаки безнасінності та призводить до виявлення «фальш-позитивних» результатів, при якому досліджувані зразки містять алель, проте проявляють насінневий фенотип.

Аналогічне явище існування двох алелів одного розміру, що корелювали із різним впливом на ознаку безнасінності було виявлено дослідниками [5] для мікросателітного маркеру VMC7F2.

Враховуючи значний рівень варіабельності мікросателітних локусів існування алелів одного розміру, проте різного походження, може бути цілком ймовірним, але, за нашою думкою, можливість розрізняти між собою такі алелі існує лише у випадку їх асоціації із певним фенотиповим проявом.

Для можливості розрізняти дані алелі, ми позначили символом «+», алель 198 п. н., асоційований із проявом ознаки безнасінності, та символом «-» – алель 198 п. н. не пов'язаний із даною ознакою.

В нашому випадку, алель 198<sup>-</sup> п. н. був виявлений у складі генотипу насінневого батьківського сорту Кобзар, що призвело до виявлення «фальш-

позитивних» рослин при аналізі сіянців досліджуваної комбінації схрещування.

Загалом, алель 198<sup>-</sup> п. н. був визначений у складі генотипів 12 з 19 гібридних зразків (63,2 %), що приблизно відповідає розщепленню генотипів у гібридному потомстві за законами Г. Менделя, характерне для схрещування гетерозигот. Відхилення від менделівського розщеплення може бути пов'язано із низькою життєздатністю нащадків комбінацій схрещування «насіenneвий x безнасіenneвий» [2, 12].

Фальш-позитивними з 12 генотипів-носіїв алеля 198 п. н. буде певна кількість гетерозигот, проте їх точне число може бути визначене лише за результатами фенотипування.

З 19 гібридних сіянців винограду у фазі плодоношення знаходилися вісім зразків, серед яких сім рослин показали насіenneвий фенотип, а одна рослина – безнасіenneвий.

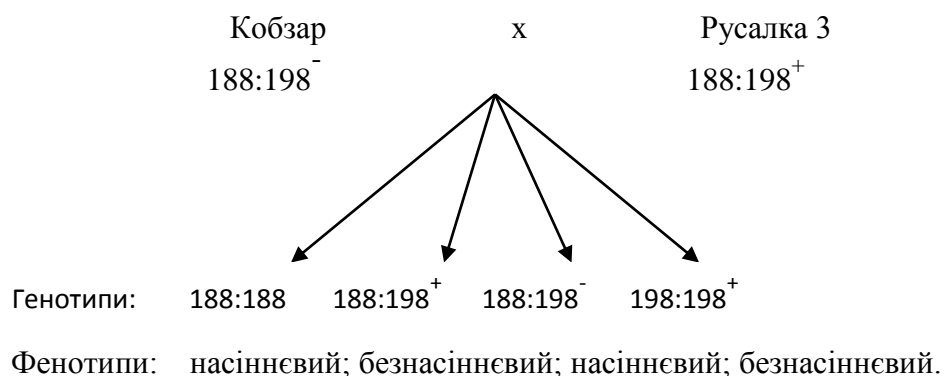
Аналогічний результат був отриманий авторами при схрещуванні сортів Блек Монукка (безнасіenneвий) та Альфонс Лавалле (насіenneвий): з дев'ятнадцяти сіянців лише один мав безнасіenneвий фенотип [11]

Генотипи насіenneвих сіянців очікувано представляли варіанти: 188:188 п. н. та 188:198<sup>-</sup> п. н.

Генотип безнасіenneвої рослини містив обидва алелі 198 п. н., тобто був гомозиготним (198<sup>+</sup>:198<sup>-</sup> п. н.).

Можна прогнозувати, що гібридні сіянці 10, 14, 18 та 23, які також виявилися гомозиготними за алелем 198 п. н. локусу r3\_VVAGL11 будуть демонструвати безнасіenneвий фенотип.

В цілому, згідно з менделівським розщепленням, приблизно половина зразків з генотипом 188:198 п. н. можуть бути носіями безнасіenneвого фенотипу (схема 1).



**Схема 1. Розщеплення за генотиповими та фенотиповими класами гібридних сіянців комбінації схрещування Кобзар x Русалка 3.**

Таким чином, можна говорити, що маркер-супутній добір на ранніх стадіях розвитку, в першу чергу дозволить скоротити від 25 (при наявності у одного з батьківських форм алелю 198<sup>-</sup> п. н.) до 50 % (за відсутності у батьків

алеля 198<sup>-</sup> п. н.) кількість гібридних рослин, і відповідно, площі гібридних розсадників та видатки на культивування, що є особливо актуальним при масштабних селекційних програмах із залученням сотень гібридних сіянців комбінацій схрещувань «насінневий х безнасінневий».

По-друге, за думкою авторів [5], ранній скринінг дозволяє створити велику ефективну популяцію гібридних сіянців та зменшити тривалість процесу виведення безнасінневих сортів від 2 до 4 років.

Проте незважаючи на перспективність застосування зазначеного маркера, слід брати до уваги, що при наявності алеля 198 п. н., не зчепленого із ознакою безнасінневості у обох батьківських форм гібридизаційної пари, ефективність раннього добору маркером p3\_VvAGL11, для виявлення безнасінневих рослин, суттєво зменшиться.

### Висновки.

Отримані алельні характеристики мікросателітних локусів p3\_VVAGL11, VVS2, ZAG62 та VVMD28 сіянців комбінації схрещування Кобзар х Русалка 3 та їх батьківських форм.

Підтверджена асоціація алеля 198<sup>+</sup> п. н. інтрагенного мікросателітного локусу p3\_VvAGL11 із безнасінневим фенотипом у винограду.

Виявлений алель 198<sup>-</sup> п. н. локусу p3\_VvAGL11, що не пов'язаний із проявом ознаки безнасінневості у винограду.

В подальшому планується проведення маркер-супутнього добору за ознакою безнасінневості з урахуванням виявлених особливостей процесу на інших гібридних комбінаціях схрещування типу «насінневий х безнасінневий»: Загадка х Безнасінневий Магарача, Аркадія х Белградський безнасінневий та Кобзар х Кишмиш таїровський.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Bergamini C., Cardone M. F., Anaclerio A. [et al.] Validation assay of p3\_VvAGL11 marker in a wide range of genetic background for early selection of stenospermocarp in *Vitis vinifera* L. // Mol Biotechnol. – 2013. – Vol. 54, № 3. – P. 1021-1030.
2. Bouquet A. Inheritance of seedlessness in grapevine (*Vitis vinifera* L.) / A. Bouquet, Y. Danglot // Vitis. – 1996. – Vol. 35. – P. 35-42.
3. A genetic analysis of seed and berry weight in grapevine // Genome. – 2006. – Vol. 49, № 12. – P. 1572-1585.
4. Cabezas J. A., Cervera M. T., L. Ruiz-Garcia, [et al.] De Gortari M. J., B. A. Freking, S. M. Kappes [et al.] Extensive genomic conservation of cattle microsatellite heterozygosity in sheep // Animal Genetics. 1997. – Vol. 28. – P. 274-290.



5. Karaagac E. , Vargas A., De Andres M. T. [et al.] Marker assisted selection for seedlessness in table grape breeding // Tree Genetics & Genomes. – 2012. – Vol. 8, № 5. – P. 1003-1015.
6. Lahogue F. Identification of a codominant scar marker linked to the seedless character in grapevine // F. Lahogue, P. This, A. Bouquet // Theor. Appl. Genet. – 1999. – Vol. 97. – P. 950-959.
7. Mejia T, B. Soto, M. Guerrero Molecular, genetic and transcriptional evidence for a role of VvAGL11 in stenospermocarpic seedlessness in grapevine / [et al.] // BMC Plant Biology. – 2011. – Vol. 11, № 57. – P. 1-18.
8. Molecular marker systems in plant breeding and crop improvement / Eds: H. Lords, G. Wenzel. – 2005. – XXII. – 476 p. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.springer.com/978-3-540-20689-7>
9. National Center for Biotechnology Information [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
10. Sarensen A. P. Potentials for MAS in general: genetics, crops traits, economy / A. P. Sorensen, N. V. Keygene // Proceedings Workshop on the role of marker assisted selection in breeding varieties for organic agriculture (Wageningen, NL, 25-27 February, 2009): Wageningen, 2009. - P. 23.
11. Sokkurt M., A. Cakir, M. Shidfar [et al.] Using seedlessness-related molecular markers in grapevine breeding for seedlessness via marker-assisted selection into Muscat of Hamburg x Sultani progeny // Turkish Journal of Biology. – 2013. – Vol. 37. – P. 101-105.
12. Usefulness of two SCAR markers for marker-assisted selection of seedless grapevine cultivars / A. F. Adam-Blondon, F. Lahogue-Esnault, A. Bouquet [et al.] // Vitis. – 2001. – Vol. 40. – P. 147-155.
13. Zarouri B., Vargas A. M , Gaforio L. [et al.] Whole-genome genotyping of grape using a panel of microsatellite multiplex PCRs // Tree Genetics & Genomes. – 2015. – Vol. 11, № 17. – P. 1-15.

#### Аннотация

*Карастан О. М., Мулюкина И. А., Плачинда Г. В., Папина Е. С. Маркер-сопутствующий отбор по признаку бессемянности у винограда в гибридной популяции кобзарь x русалка 3. Получены аллельные профили микросателлитных локусов (VVS2, ZAG62, VVMD28, p3\_VVAGL11) сортов Кобзарь, Русалка 3 и гибридов их комбинации скрещивания. Показана идентичность по происхождению генотипов семян генотипам родительских форм. Среди семян гибридной комбинации определены растения, которые будут проявлять бессемянный фенотип. Выявлено два аллеля 198 п. н. микросателлитного локуса p3\_VVAGL11, которые демонстрируют разную ассоциацию с признаком бессемянности у винограда.*

*Ключевые слова: микросателлит, виноград, V. vinifera L., маркер-сопутствующий отбор, бессемянность, гибридная популяция.*



## Summary

*Karastan O., Mulyukina N., Plachinda G., Papina O. Marker-assisted selection of grape seedlessness into hybrid population kobzar x rusalka 3. Microsatellite loci (VVS2, ZAG62, VVMD28, p3\_VVAGL11) allele profiles for cultivars Kobzar, Rusalka 3 and their progeny were obtained. Identity of seedlings genotypes to parental genotypes was shown. Plants, which will be demonstrate seedless phenotypes were detected among seedlings. There was found two alleles 198 b. p., which has different association with grape seedlessness trait in loci p3\_VVAGL11.*

*Key words: microsatellite, grape, V. vinifera L., marker-assisted selection, seedlessness, hybrid population.*