

**АПРОБАЦИЯ ДНК-МАРКЕРА p3_VvAGL11, СЦЕПЛЕННОГО
С ПРИЗНАКОМ БЕССЕМЯННОСТИ ВИНОГРАДА**

Ильницкая Е.Т., канд. биол. наук, **Макаркина М.В.**, аспирант,
Токмаков С.В., канд. биол. наук

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия» (Краснодар)

Barba P., Dr, Weber J.P.

*Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA),
(Santiago, Chile)*

Реферат. В настоящей статье представлены результаты апробации ДНК-маркера p3_VvAGL11, сцепленного с признаком бессемянности, на восьми генотипах винограда методом ПЦР. Анализировали ПЦР-продукты с использованием метода капиллярного электрофореза. Определён ПЦР-фрагмент, присутствующий у генотипов винограда с бессемянным типом ягоды.

Ключевые слова: бессемянность винограда, ПЦР, ДНК-маркеры

Summary. Approbation of the DNA marker p3_VvAGL11 linked to the feature of seedlessness on eight grape genotypes by the PCR method was carried out. PCR products were analyzed by the method of capillary electrophoresis. A specific PCR fragment in genotypes with seedless berries was determined.

Key words: seedless of grapes, PCR, DNA-markers

Введение. Признак бессемянности ягод в последнее время является одним из наиболее востребованных признаков в селекции столовых сортов винограда [1, 2]. Фенотипическое проявление данного признака может быть представлено как наличием рудиментов семени, так и их полным отсутствием. Привлечение методик ДНК-маркерного отбора очень перспективно для селекции данного признака, так как позволяет отсементировать гибридную популяцию, не дожидаясь вступления растений в плодоношение.

Существует два типа бессемянности – стenosпермокарпический, то есть семя при опылении образуется, но на каком-то этапе прекращает свое развитие, величина и степень развитости рудиментов семян зависят от сортовых особенностей и условий формирования. Партенокарпический тип бессемянности – образование ягоды происходит без опыления, рудименты отсутствуют, ягоды при этом округлой формы и мелкого размера.

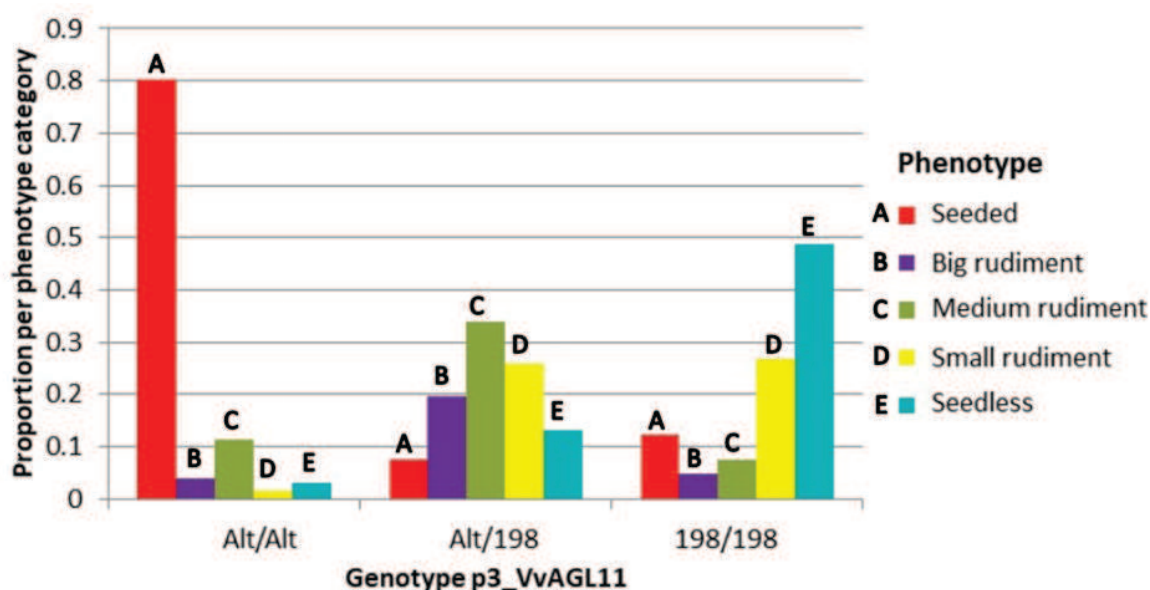
Бессемянные сорта стenosпермокарпического типа делят на 4 класса (категории) в зависимости от степени развития рудиментов семени. Так в сортах I и II класса бессемянности зачатки семян практически не ощутимы при съедании ягоды, а в ягодах сортов III и IV категории рудименты могут быть достаточно крупными, но не полностью сформированные, такие сорта можно назвать мягкосемянными. Наиболее привлекательны для потребителя сорта I и II класса, также для селекции эти генотипы более перспективны как доноры ценного признака.

Сорт Sultanina – один из основных источников признака стenosпермокарпического типа бессемянности в селекции столового винограда, и в нем идентифицирован ген *Sdi* как отвечающий за проявление признака бессемянности [3].

Достижения в области генетического картирования и использование ДНК-маркеров в процессе традиционной селекции позволили уточнить генетический механизм бессемянности. Наиболее широко распространена модель, предложенная для объяснения генетического контроля развития стеноспермокарпических семян, предполагает участие трех независимых и взаимодополняющих рецессивных генов, регулирующих доминирование локуса ингибирования развития семян (*Sdi*) [4].

Исследованиями N. Mejía с коллегами (2011) [5] в качестве основного функционального гена-кандидата для признака бессемянности был определен локус *VvAGL11*, относящийся к семейству D-lineage MADS-box. В качестве наиболее оптимального маркера для селекционных программ на бессемянность был предложен STS-маркер p3-VvAGL11, который относится к регуляторной области *VvAGL11* и включает в себя участок (GAGA)n.

В институте сельскохозяйственных исследований INIA в Чили активно реализуется программа селекции бессемянных сортов с привлечением ДНК-маркерной технологии. В получаемых F1 популяциях по данным ДНК анализа маркером P3_VvAGL11 проводится выбраковка сеянцев, урожай которых потенциально будет иметь развитые семена в ягоде. Целевым фрагментом, который сцеплен с бессемянностью, является идентифицируемый ПЦР-продукт размером 198 пар нуклеотидов. Как нецелевые наиболее часто определяются фрагменты 188, 176 и 192 п.н. Все образцы, которые не несут целевой фрагмент по данным ПЦР-анализа из дальнейшей селекционной работы исключаются: при комбинации скрещивания семянной x бессемянный сорт это ½ F1 популяции. Применение ДНК-маркерного отбора эффективно, однако в отселектированной популяции фенотипический анализ урожая выявляет от 10 до 20 % гибридов с нормальным развитием семени или крупными рудиментами в ягоде (рис.).



Примечание: Alt – альтернативная (нецелевая) аллель; А – с развитым полноценным семенем, В – с крупными рудиментами, С – с рудиментами среднего размера, D – с мелкими рудиментами, E – бессемянные формы.

Рис. Фенотипическая оценка идентифицированных маркером P3_VvAGL11 генотипов по категории бессемянности в гибридных популяциях

Апробация маркера p3-VvAGL11 на различной генплазме винограда и сопоставление данных с фенотипической оценкой позволит получить данные о стабильности или по-

лиморфности данного маркерного локуса в различной генплазме и сделать выводы об универсальности маркера *r3_VvAGL11* для использования в ДНК-маркерной селекции бессемянных сортов.

Объекты и методы исследований. Для апробации ДНК-маркера, сцепленного с признаком бессемянности, в работу включили образцы ДНК из четырех бессемянных сортов винограда (Коктейль, Кишмиш 342, Молдова бессемянная, Русбол) и четырех сортов с нормальным развитием семени в ягоде (Изабелла, Талисман, Чарас мускатный, Голубок).

ДНК выделяли из молодых листьев типичных растений изучаемых сортов методом ЦТАБ [6]. Последовательность праймеров взята из литературного источника [5]. Изучение генотипов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с разделением продуктов реакции методом капиллярного электрофореза.

ПЦР проводили в 25 мкл смеси, содержащей 1х ПЦР-буфер для Taq-полимеразы с сульфатом аммония, 0,125 мМ/мкл каждого dNTP, по 0,25 пМ/мкл прямого и обратного праймеров, 0,05 % ПИР (противоингибирующий реагент), 0,125 е.а/мкл Taq-полимераза (ООО «Бигль», Санкт-Петербург, Россия). Амплификацию ДНК осуществляли прибором Eppendorf Mastercycler gradient (Германия) по следующей программе: 5 минут при 95 °С – начальная денатурация, далее 35 циклов: 10 секунд денатурация при 95 °С, 30 секунд отжиг праймеров при 55 °С, 30 секунд синтез при 72 °С; последний цикл синтеза – 3 минуты при 72 °С. Разделение продуктов реакции методом капиллярного электрофореза и оценка размера амплифицированных фрагментов проведена с использованием автоматического генетического анализатора ABI Prism 3130 и специального программного обеспечения GeneMapper и PeakScanner. Использование автоматического генетического анализатора для оценки результатов ПЦР позволяет получать высокоточные данные, соответствующие современным требованиям научных работ данного направления.

Молекулярно-генетические исследования выполнены на оборудовании ЦКП «Геномные и постгеномные технологии» Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия.

Обсуждение результатов. Для апробации ДНК-маркера, тесно сцепленного с признаком бессемянности винограда, в работу включили сорта винограда бессемянные и сорта с нормальным развитием семени в ягоде. Анализ результатов ПЦР показал, что маркер *r3_VvAGL11* с ДНК генотипов бессемянных сортов даёт специфический амплифицированный фрагмент размером 192 пары нуклеотидов (табл.). ПЦР-продукт такого размера при анализе ДНК сортов винограда, имеющих нормально развитое семя в ягоде, не обнаружен.

Результаты фрагментного анализа продуктов ПЦР с маркером *r3_VvAGL11*

Сорт		Идентифицированные аллели, пары нуклеотидов			
1		2			
Коктейль (Восторг идеальный х Эйнсет сидлис)	Бессемянные				192
Кишмиш 342 (Виллар блан х Перлет)		178			192
Молдова бессемянная (Молдова х V-60-2)		178			192
Русбол (Виллар блан х Сверххранний бессемянный)		178			192

Продолжение таблицы

1		2				
Изабелла (<i>Vitis labrusca</i> × <i>Vitis vinifera</i>)	С развитым семенем			182		
Талисман (Фрумоаса Албэ × Восторг)			178	182		
Чарас мускатный (Чарас × Мускат гамбургский)		170		182		
Голубок (Северный × смесь пыльцы сортов 40 лет Октября, Одесский ранний и № 1-17-54 (Аликант Буше × Каберне Совиньон))				182	186	

Заключение. Таким образом, фрагмент размером 192 п.н. можно рассматривать как целевой по результатам апробации маркера р3_VvAGL11 в условиях используемых реактивов и оборудования. Среди восьми включённых в работу генотипов присутствуют сорта винограда разного эколого-генетического происхождения. Валидация маркера на генплазме разного происхождения позволяет оценить универсальность ДНК-маркерной системы. Данная работа запланирована как следующий этап изучения ДНК-маркера р3_VvAGL11, а именно – исследование обширной выборки бессемянных сортов винограда с использованием апробируемого маркера.

Литература

1. Волынкин, В.А. Селекция винограда на бессемянность, крупноягодность и раннеспелость на полиплоидном уровне / В.А. Волынкин, В.А. Зленко, В.В. Лиховской // Виноградарство и виноделие. – 2009. – Т. 39. – С. 9-13.
2. Радчевский, П.П. Новации виноградарства России. 15. Бессемянные сорта винограда / П.П. Радчевский, Л.П. Трошин // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2010. – Т. 56. – С. 122-142
3. Doligez, A. Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight / A. Doligez, A. Bouquet, Y. Danglot, F. Lahogue, S. Riaz, C. Meredith, P. This // Theor. Appl. Genet. – 2002. Vol. 105, № 5. – P. 780-795. DOI 10.1007/s00122-002-0951-z.
4. Costantini, L. Berry and phenology-related traits in grapevine (*Vitis vinifera* L.): from quantitative trait loci to underlying genes / L. Costantini, J. Battilana, F. Lamaj, G. Fanizza, M. S. Grando // BMC Plant Biol. – 2008. – Vol. 8, № 38. – P. 17. DOI 10.1186/1471-2229-8-38.
5. Mejía, N. Molecular, genetic and transcriptional evidence for a role of VvAGL11 in stenospermocarpic seedlessness in grapevine / N. Mejía, B. Soto, M. Guerrero, X. Casanueva, C. Houel, M. de los Ángeles Miccono, R. Ramos, L. Le Cunff, J.-M. Boursiquot, P. Hinrichsen, A.-F. Adam-Blondon // BMC Plant Biol. – 2011. – Vol. 11. – P. 57-18. DOI 10.1186/1471-2229-11-57.
6. Rogers, S.O. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues / S.O. Rogers, A.J. Bendich // Plant Molecular Biology. – 1985. – V. 19, № 1. – P. 69-76.