

ДНК-МАРКЕРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ К МИЛДЬЮ *Rpv3* В СОРТАХ И ФОРМАХ 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)

Реферат. Проведён анализ генотипов винограда с помощью ДНК-маркеров UDV305 и UDV737, сцепленных с геном устойчивости к милдью *Rpv3*, наследуемом от североамериканских видов винограда. Данный ген и его гаплотипы, которые определяют устойчивость, можно идентифицировать с помощью указанных маркеров. Наличие гена *Rpv3* выявлено в 30 сортах винограда.

Ключевые слова: милдью, ген *Rpv3*, UDV305, UDV737, ПЦР, сорта винограда

Summary. The analysis of the grape genotypes using DNA markers UDV305 and UDV737, linked to the gene for downy mildew resistance *Rpv3*, inherited from the North American grape species. This gene and its haplotypes, which determine resistance, can be identified using the indicated markers. The presence of the *Rpv3* gene is found in 30 grape varieties.

Key words: downy mildew, *Rpv3* gene, UDV305, UDV737, PCR, grape varieties

Введение. Возделывание устойчивых сортов сельскохозяйственных культур, в том числе и винограда, является одним из наиболее эффективных методов контроля заболеваний. Это позволяет сократить количество пестицидных обработок, тем самым улучшить экологию ампелоценоза и пищевую безопасность конечной продукции, повысить рентабельность производства. По этой причине создание высокоустойчивых сортов – важнейшее направление в селекции.

Милдью – одно из самых распространённых и вредоносных грибных заболеваний винограда, вызывается биотрофным оомицетом *Plasmopara viticola* Berl. Et de Toni. Патоген имеет узкую специализацию: поражает только виноград, развивается на всех зеленых органах виноградной лозы – листьях, побегах, соцветиях, ягодах, усиках. При благоприятных для развития милдью условиях (повышенная влажность и тёплый температурный режим) гибель урожая на сортах с различным уровнем устойчивости может составлять от 50 до 100 % [1].

Создание новых перспективных форм основано на грамотном использовании генетического разнообразия культуры, тем самым уровень изученности накопленного генофонда во многом определяет успех селекционных работ.

Актуальная задача селекции: поиск генотипов – доноров устойчивости. Сорта *Vitis vinifera*, являясь основой высококачественного виноградарства, практически не обладают генетической устойчивостью к *Plasmopara viticola*. Генотипы, устойчивые к милдью, принадлежат к видам винограда Северной Америки и Азии (*V. aestivalis*, *V. berlandieri*, *V. cinerea*, *V. riparia*, *V. rupestris* и др.), а также *Muscadinia rotundifolia*.

При использовании методов молекулярной генетики на сегодняшний день удалось определить более 20 локусов устойчивости к милдью в геноме винограда (<http://www.vivc.de>). Одни из них имеют большой вклад в фенотипическое варьирование, другие относят к минорным локусам. Многие гены картированы и для них идентифицированы ДНК-маркеры, в том числе пригодные для ДНК-маркерной селекции [2-7].

Один из крупных локусов устойчивости – *Rpv3*. Впервые ген был определён и локализован на 18 хромосоме в генотипе сорта винограда Бьянка, несущего в себе генплазму *V. vinifera*, *V. labrusca*, *V. rupestris*, *V. berlandieri*, *V. lincecumii* [8]. Позже было проведено

масштабное исследование устойчивых североамериканских сортов и форм, обладающих геном *Rpv3*, в результате чего были выявлены семь консервативных гаплотипов данного гена, определяющих устойчивость к милдью [3]. Авторы пришли к выводу, что ген *Rpv3* может быть найден в селекционных формах, имеющих в родословной несколько североамериканских видов. Ценные гаплотипы локализируются в одном локусе, по этой причине в традиционной селекции возможно комбинировать только два гаплотипа в одной диплоидной форме. Таким образом, различные гибридные формы, имеющие в родословной генплазму *V. labrusca*, *V. rupestris*, *V. riparia* или *V. lincecumii*, могут обладать геном *Rpv3* и могут быть использованы в селекции сортов в качестве доноров устойчивости к милдью.

В результате проведённых исследований были определены тесно сцепленные фланкирующие микросателлитные маркеры, которые позволяют идентифицировать сам ген *Rpv3* и его гаплотипы: UDV305, UDV737 [3]. Так, устойчивые гаплотипы гена *Rpv3* соответствуют следующим аллельным состояниям указанных локусов (UDV305, UDV737, соответственно): *Rpv3*²⁹⁹⁻²⁷⁹ (наследуется от *V. rupestris*), *Rpv3*^{null-297} (*V. rupestris* или *V. lincecumii*), *Rpv3*³²¹⁻³¹² (*V. labruska* или *V. riparia*), *Rpv3*^{null-271} (*V. labruska* или *V. riparia*), *Rpv3*³⁶¹⁻²⁹⁹ (*V. rupestris*), *Rpv3*²⁹⁹⁻³¹⁴ (*V. rupestris*), *Rpv3*^{null-287} (*V. rupestris* или *V. labruska*). В исследованиях Di Gaspero с соавторами более 200 наименований сортов винограда было проанализировано, определены генотипы несущие различные гаплотипы устойчивости.

Объекты и методы исследований. Нами проведена идентификация аллельного состояния гена *Rpv3* в сортах винограда преимущественно отечественной селекции из генофонда Анапской ампелографической коллекции (г. Анапа) и Донской ампелографической коллекции им. Я.И. Потапенко (г. Новочеркасск). Результаты ДНК-маркерного анализа сопоставлены с родословной генотипов. Изучение генотипов проведено методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). ДНК выделяли из молодых листьев типичных растений изучаемых сортов винограда методом ЦТАБ [9]. В исследовании использовали ДНК-маркеры, рекомендованные для идентификации аллельного состояния гена *Rpv3* [3]. 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.

В качестве контроля для уточнения размеров амплифицированных фрагментов в работе использовали ДНК сортов Дунавски лазур, Сейв Виллар 12-375 и Ноа, размеры аллелей которых по изучаемым локусам известны и представлены в литературе [3].

Обсуждение результатов. В настоящее время гаплотипы, определяющие устойчивость, выявлены нами в 30 сортах винограда из 76 проанализированных (табл.).

Обнаружено три типа гаплотипов устойчивости из семи возможных. Среди сортов, в которых нами был выявлен ген устойчивости *Rpv3*, гаплотип *Rpv3*²⁹⁹⁻²⁷⁹ встречается значительно чаще других: он обнаружен в 26 генотипах (см. табл.). Гаплотип *Rpv3*³²¹⁻³¹² определён впервые в трёх сортах: Армалага, Полюкс, Подарок Магарача. И только в одном сорте (Мелоди) выявлен гаплотип *Rpv3*^{null-271}. Проведённый анализ родословной сортов винограда соответствует полученным данным ДНК-маркерного анализа. Изучение списка родительских форм показало, что большинство сортов унаследовало ген устойчивости от гибридов Сейв Виллара (как напрямую, так и через потомков сложных гибридов). Следует отметить факт, что ген обнаружен в сорте Подарок Магарача (Ркацители х Магарач 2-57-72 (Мцване х Сочинский черный)).

Выявленные гаплотипы устойчивости гена *Rpv3* в сортах винограда

Сорт	Происхождение сорта	Идентифицированные аллели локусов			
		UDV305		UDV737	
Армалага	Армлонг х Малага	321	334	271	312
Барт	Талисман х Оригинал	299		279	
Болгария устойчивая	Сейв Виллар 20-473 х Болгария	299		279	295
Виктория	(<i>Vitis vinifera</i> х <i>Vitis amurensis</i>) х Сейв Виллар 12-304	299		279	285
Декабрьский	Корна нягра х Сейв Виллар 12-375	299		279	285
Донус	Сейв Виллар 12-375 х Дружба	299		279	
Дунавсагымза	(Мавруд х Пино нуар) х Сейв Виллар 12-375	299		279	293
Дунавски лазур	Ркацители х Сейв Виллар 12-375	299	326	279	295
Илья	Восковой х Кишмиш лучистый	299		279	
Кишмиш 342	Сейв Виллар 12-375 х Перлетт	299	342	279	
Кодрянка	Молдова х Маршалский	299		279	285
Кристалл	(<i>V. amurensis</i> х Чалоцилайош) х Сейв Виллар 12-375	299		279	301
Кутузовский	Молдавский х Сейв Виллар 20-365	299		279	285
Ледяной	Грушевский белый х Феникс	299		279	295
Матрешка	Восковой х Кишмиш лучистый	299		279	
Мелоди	Сейв Виллар 5-276 х Женева вайт 5	0		271	
Мускат летний	Сейв Виллар 20-366 х Королева виноградников	299		279	285
Надежда АЗОС	Молдова х Кардинал	299		279	285
Ноа	<i>V. riparia</i> х <i>V. labrusca</i>	321	0	271	312
Оригинал	Дамасская роза х Сейв Виллар 20-365	299	322	279	
Платовский	Зала дендь х Подарок Магарача	299		279	
Подарок Магарача	Ркацители х Магарач 2-57-72	321		297	312
Полукс	Оберлен 595 х Фостер Уайт сидлес	229	321	312	
Престиж	Дружба х Феникс	299		279	295
Рошфор	Талисман х Кардинал + смесь пыльцы	299	342	279	285
Русбол	Сейв Виллар 12-375 х Сверххранний бессемянный	299		279	
Сейв Виллар 12-375	Зейбель 6468 х Зейбель 6905	299	361	279	299
Среброструй	Ркацители х Сейв Виллар 12-375	299	326	279	295
Сторгозия	(Мавруд х Пино нуар) х Сейв Виллар 12-375	299		279	295
Талисман	Фрумоаса албэ х Восторг	299	326	279	295
Тимур	Фрумоаса албэ х Восторг	299		279	
Шаян	Шамбурсен х ЯнгиЕр	299		279	
Юбилей Молдавии	(Нимранг х Карманный) х Сейв Виллар 20-473	299		279	295

Примечание: полужирным шрифтом выделены сорта-контроли и значения целевых аллелей

Источником устойчивости выступает сорт Сочинский чёрный, который в настоящее время утерян, однако известно, что он был найден П.Я. Голодригой в окрестностях города Сочи и точное его генетическое происхождение неизвестно, но по передаваемой им потомству высокой устойчивости к грибным патогенам принято считать, что это межвидовой гибрид. По полученным нами данным можно предположить, что сорт Сочинский чёрный нёс в себе генплазму *V. labruska* или *V. riparia*.

Полные результаты проведённого ДНК-маркерного анализа представлены нами в Базе Данных «База данных ДНК-маркерного анализа генов устойчивости к милдью в сортах винограда» (Свидетельство на базу данных № 2019620547 от 09.04.2019) и частично ранее опубликованы [10, 11].

Заключение. В процессе работы по идентификации гена *Rpv3* в сохраняемом генофонде винограда. Ген устойчивости в настоящее время определён в ДНК тридцати сортов винограда. Полученные данные о наличии гена и его гаплотипах устойчивости в тех или иных сортах могут быть использованы в селекции при подборе пар для гибридизации. Выявление в гибридном потомстве сеянцев, несущих локусы устойчивости, также может быть проведено с помощью ДНК-маркерного анализа. Данная процедура актуальна при селекционной работе по пирамидированию нескольких генов устойчивости в одном генотипе.

Литература

1. Талаш А.И. Категории вредоносности вредителей и болезней на виноградниках [Электронный ресурс] // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2010. № 4(3). С. 24-29. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/10/03/04.pdf>. (дата обращения: 15.08.2019).
2. Eibach R., Zyprian E., Welter L., Töpfer R. The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding // *Vitis*. – 2007. – Vol. 46. – P. 120-124.
3. Di Gaspero G., Copetti D., Coleman C., Castellarin S.D., Eibach R., Kozma P., Lacombe T., Gambetta G., Zvyagin A., Cindrić P., Kovács L., Morgante M., Testolin R. Selective sweep at the *Rpv3* locus during grapevine breeding for downy mildew resistance. *Theor. Appl. Genet.* – 2012. – Vol. 124. – P. 227-286. – DOI 10.1007/s00122-0111703-8.
4. Schwander F., Eibach R., Fechter I., Hausmann L., Zyprian E., Töpfer R. *Rpv10*: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine // *Theor. Appl. Genet.* – 2012. – Vol. 124 (1). – P. 163-176. – DOI 10.1007/s00122-011-1695-4.
5. Venuti S., Copetti D., Foria S., Falginella L., Hoffmann S., Bellin D., Di Gaspero G. Historical introgression of the downy mildew resistance gene *Rpv12* from the Asian species *Vitis amurensis* into grapevine varieties // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8(4). – P. 1-7. – DOI 10.1371/journal.pone.0061228.
6. Zini E., Raffener M., Di Gaspero G., Eibach R., Grando M.S., Letschka T. Applying a defined set of molecular markers to improve selection of resistant grapevine accessions // *Acta Horticulturae*. – 2014. – Vol. 1082. – P. 73-78. – DOI 10.17660/ActaHortic.2015.1082.9.
7. Ochssner I., Hausmann L., Töpfer R. *Rpv14*, a new genetic source for *Plasmopara viticola* resistance conferred by *Vitis cinerea* // *Vitis: J. Grapevine Res.* – 2016. – Vol. 55(2). – P. 79-81. – DOI 10.5073/vitis.2016.55.79-81.
8. Bellin D., Peressotti E., Merdinoglu D., Wiedemann-Merdinoglu S., Adam-Blondon A.F., Cipriani G., Di Gaspero G. Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine «Bianca» is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site // *Theor. Appl. Genet.* – 2009. – Vol. 120(1). – P. 163-176. – DOI 10.1007/s00122-009-1167-2.
9. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // *Plant Mol. Biol.* – 1985. – Vol. 19 (1). – P. 69-76.
10. Ильницкая Е.Т., Макаркина М.В., Токмаков С.В., Наумова Л.Г. ДНК-диагностика гена *Rpv3*, определяющего устойчивость винограда к возбудителю милдью // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018. Т. 22. № 6. С. 703-707.
11. Ильницкая Е.Т., Токмаков С.В., Макаркина М.В., Наумова Л.Г., Майстренко Л.А. Идентификация гена устойчивости к милдью *Rpv3* в генотипах винограда южнороссийской селекции // *Виноделие и виноградарство*. 2018. № 4. С. 4-8.