

УДК 631.52: 577.21

## АНАЛИЗ ЛОКУСА *CBF4* В ДНК СОРТОВ ВИНОГРАДА С РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНЬЮ УСТОЙЧИВОСТИ К НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОМУ СТРЕССУ

Ильницкая Е.Т., канд. биол. наук, Супрун И.И., канд. биол. наук,  
Токмаков С.В., канд. биол. наук

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства»  
(Краснодар)

**Реферат.** Последовательность гена *VvCBF4*, влияющего на формирование морозоустойчивости растений винограда, исследовали у десяти сортов винограда, обладающих различной степенью устойчивости к низкотемпературному стрессу и имеющих различное генетическое происхождение. Корреляции между обнаруженными однонуклеотидными заменами (SNP) в последовательностях гена у изученных образцов и уровнем их морозоустойчивости не обнаружено.

**Ключевые слова:** виноград, морозоустойчивость, *CBF4*, секвенирование

**Summary.** The sequence of the *VvCBF4* gene, influencing on low temperature tolerance of grapevine plants, was studied on ten grapes varieties with different level of tolerance to low temperature stress and different genetic origin. Analysis of the obtained sequences has not revealed the correlation between single nucleotide substitutions (SNP) and the level of tolerance to low temperatures.

**Key words:** grapes, frost resistens, *CBF4*, sequencing

**Введение.** Низкие температуры зимнего периода являются основным лимитирующим фактором в продвижении культуры винограда в северные районы и ограничивают возможность возделывания неустойчивых к морозам сортов и в традиционно виноградарских районах юга России. За последние 35 лет в Краснодарском крае наблюдается нарастание частоты стрессовых ситуаций в период перезимовки винограда [1].

Особенно подвержены воздействию низких зимних температур европейские сорта винограда *Vitis vinifera* L, составляющие основу виноградарства с высоким качеством продукции. Однако устойчивость растений винограда к комплексу неблагоприятных зимних условий, условно определяемую как морозоустойчивость, зависит не только от генетических свойств сорта, но и от физиологического состояния растения в зимний период, условий его выращивания, применяемой агротехники, возрастных этапов и характера проявления низких температур [2].

По вышеуказанной причине изучение признака морозоустойчивости растений на физиологическом, биохимическом, генетическом уровнях имеет особое значение в целях формирования фундаментальной основы разработок способов повышения устойчивости растений винограда к низким температурам.

В настоящее время основным методом селекции на морозо- и зимостойкость является межвидовая гибридизация: генотипы амурского винограда и северо-американские виды обладают большей морозоустойчивостью, чем европейские сорта.

С точки зрения генетики, ввиду «сложности» признака и понимания возможности управления процессом, признак толерантности виноградного растения к низким температурам относится к одним из наименее изученных.

Работами по исследованию молекулярно-генетических основ морозоустойчивости виноградного растения был выявлен ряд локусов ДНК, детерминирующих факторы транскрипции, влияющие на физиолого-биохимические процессы, определяющие морозоустойчивость. В настоящее время гены *VvCBF2*, *VvCBF4*, *VvCBFL* (C-repeat-binding factors) и *VvZFPL* (B-box-type zinc finger protein) идентифицированы как участвующие в формировании морозоустойчивости винограда [3-6].

Проведенное нами молекулярно-генетическое исследование было направлено на изучение структурного полиморфизма локуса *VvCBF4*. Данный ген обладает наибольшим вкладом в формирование признака морозоустойчивости растений винограда, согласно литературным данным.

**Объекты и методы исследований.** Исследования проведены с использованием ДНК сортов винограда, обладающих различной степенью устойчивости к низкотемпературному стрессу и имеющих различное генетическое происхождение. Образцы ДНК были выделены из типичных растений винограда сортов Кристалл, Филлоксероустойчивый Джемте, Красностоп АЗОС, Достойный, Рислинг АЗОС, Рислинг рейнский, Красностоп анапский, Шардоне, Яй изюм черный, Бархатный, произрастающих на Российской ампелографической коллекции (г. Анапа).

ДНК выделяли из молодых листьев апикальной части побегов методом ЦТАБ [7]. Полимеразную цепную реакцию проводили согласно стандартной методике, с экспериментальной оптимизацией температуры отжига праймеров. Праймерные пары разработаны с помощью системы Primer Blast базы данных NCBI ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)). Секвенирование амплифицированных фрагментов ДНК проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 3130.

Сравнение секвенированных последовательностей проводили в он-лайн приложении "Clustal Omega" (режим доступа – <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) с использованием генетического анализатора ABI Prism3130.

**Обсуждение результатов.** В базе данных NCBI представлена последовательность гена *VvCBF4* для разных аллелей у образцов винограда видов *Vitis riparia* и *Vitis vinifera* (сорт Шардоне), что позволило нам произвести дизайн праймерных пар для амплификации целевого участка ДНК.

После дизайна праймерных пар был выполнен анализ их специфичности к целевому участку генома с помощью системы поиска BLAST базы данных NCBI. В результате для дальнейшей работы были отобраны три комбинации праймеров (табл.).

Нуклеотидные последовательности разработанных праймерных пар

Праймерная пара	Размер фрагмента пар нуклеотидов
CBF4-1 F: TCG ACA CTT CAG TCT TCA CCG R: CAT CTC CAC CGT AGC CAT CC	633
CBF4-2 F: CGA CAC TTC AGT CTT CAC CGT R: TGT CAT CTC CAC CGT AGC CA	635
CBF4-4 F: ACC GTT CTC CTT AAC TGC TCT R: TCA TCT CCA CCG TAG CCA TC	664

Созданные праймерные пары фланкируют от 82 до 98 % последовательности целевого участка ДНК. Выполнена экспериментальная апробация праймеров, по всем трем комбинациям был получен целевой продукт. В дальнейшую работу отобрали пару праймеров СВF4-4 как перекрывающую наибольшую область изучаемого локуса.

С помощью данной праймерной пары был произведен синтез ПЦР-продукта с ДНК сортов винограда, обладающих различной степенью устойчивости к низкотемпературному стрессовому фактору. В изучение были включены как европейские сорта винограда *V. vinifera* (Бархатный, Яй изюм черный, Шардоне, Красностоп анапский, Рислинг рейнский), межвидовые гибриды с участием американских подвидов (Филлоксероустойчивый Джемете, Красностоп АЗОС, Достойный, Рислинг АЗОС), так и амуро-европейско-американский гибрид (сорт Кристалл).

В данной группе сортов винограда сорт Кристалл обладает наиболее высокой степенью устойчивости к морозам (-28 °С), наименее устойчив сорт Бархатный (-18 °С).

Полученные в проведенном нами исследовании целевые продукты были секвенированы. Сравнение секвенсов амплифицированных последовательностей гена *VvCBF4* в генотипах сортов винограда с различным уровнем морозоустойчивости не выявило закономерностей (рис.)

```

37      CTCCGCCGCCGCTTCTGAATGTCSTTGGCGTCGCGGGAGCTAGGCACATGCAGCCGCCA
35      CTCCGCCGCCGCTTCTGAATGTCSTTGGCGTCGCGGGAGCTAGGCACATGCAGCCGCCA
50      CTCCGCCGCCGCTTCTGAATGTCSTTGGCGTCGCGGGAGCTAGGCACATGCAGCCGCCA
34      CTCCGCTGGCCGCTTCTGAATGTCSTTGGCGTCGCGGGAGCTAGGCACATGCAGCCGCCA
4       CTCCGCCGCCGCTGCTTCTGAATGTCSTTGGCGTCGCGGGAGCTAGGCACATGCAGCCGCCA
33      CTCCGCCGCCGCTTCTGAATGTCSTTGGCGTCGCGGGAGCTAGGCACATGCAGCCGCCA
36      CTCCGCCGCCGCTTCTGAATGTCSTTGGCGTCGCGGGAGCTAGGCACATGCAGCCGCCA
32      CTCCGCCGCCGCTTCTGAATGTCSTTGGCGTCGCGGGAGCTAGGCACATGCAGCCGCCA
16      CTCCGCCGCCGCTTCTGAATGTCSTTGGCGTCGCGGGAGCTAGGCACATGCAGCCGCCA
31      CTCCGCCGCCGCTTCTGAATGTCSTTGGCGTCGCGGGAGCTAGGCACATGCAGCCGCCA
***** ** *****

```

```

37      CGCAGAGTCCGCAAAAATTGAGGCAAGCCCCACGTCCCCTCAGCGCCAATGCCGCCACGTG
35      CGCAGAGTCCGCAAAAATTGAGGCAAGCCCCACGTCCCCTCAGCGCCAATGCCGCCACGTG
50      CGCAGAGTCCGCAAAAATTGAGGCAAGCCCCACGTCCCCTCAGCGCCAATGCCGCCACGTG
34      CGCAGAGTCCGCAAAAATTGAGGCAAGCCCCACGTCCCCTCAGCGCCAATGCCGCCACGTG
4       CGCAGAGTCCGCAAAAATTGAGGCAAGCCCCACGTCCCCTCAGCGCCAATGCCGCCACGTG
33      CGCAGAGTCCGCAAAAATTGAGGCAAGCCCCACGTCCCCTCAGCGCCAATGCCGCCACGTG
36      CGCAGAGTCCGCAAAAATTGAGGCAAGCCCCACGTCCCCTCAGCGCCAATGCCGCCACGTG
32      CGCAGAGTCCGCAAAAATTGAGGCAAGCCCCACGTCCCCTCAGAGCCAATGCCGCCACGTG
16      CGCAGAGTCCGCAAAAATTGAGGCAAGCCCCACGTCCCCTCAGCGCCAATGCCGCCACGTG
31      CGCAGAGTCCGCAAAAATTGAGGCAAGCCCCACGTCCCCTCAGCGCCAATGCCGCCACGTG
***** *****

```

```

37      GTGCGCGCGCGCAGCCATCTCCGCCGTCGAAACGTCCCAGCCATATCCTGGACGTCTT
35      GTGCGCGCGCGCAGCCATCTCCGCCGTCGAAACGTCCCAGCCATATCCTGGACGTCTT
50      GTGCGCGCGCGCAGCCATCTCCGCCGTCGAAACGTCCCAGCCATATCCTGGACGTCTT
34      GTGCGCGCGCGCAGCCATCTCCGCCGTCGAAACGTCCCAGCCATATCCTGGACGTCTT
4       GTGCGCGCGCGCAGCCATCTCCGCCGTCGAAACGTCCCAGCCATATCCTGGACGTCTT
33      GTGCGCGCGCGCAGCCATCTCCGCCGTCGAAACGTCCCAGCCATATCCTGGACGTCTT
36      GTGCGCGCGCGCAGCCATCTCCGCCGTCGAAACGTCCCAGCCATATCCTGGACGTCTT
32      GTGCGCGCGCGCAGCCATCTCCGCCGTCGAAACGTCCCAGCCATATCCTGGACGTCTT
16      GTGCGCGCGCGCAGCCATCTCCGCCGTCGAAACGTCCCAGCCATATCCTGGACGTCTT
31      GTGCGCGCGCGCAGCCATCTCCGCCGTCGAAACGTCCCAGCCATATCCTGGACGTCTT
*****

```

```

37 GTTGGGCTCCSTCACSTCGCATACCCACTTCCCGGAGTTCCCTCCGCCGCACGCCGCGGTA
35 GTTGGGCTCCSTCACSTCGCATACCCACTTCCCGGAGTTCCCTCCGCCGCACGCCGCGGTA
50 GTTGGGCTCCSTCACSTCGCATACCCACTTCCCGGAGTTCCCTCCGCCGCACGCCGCGGTA
34 GTTGGGCTCCSTCACSTCGCATACCCACTTCCCGGAGTTCCCTCCGCCGCACGCCGCGGTA
4 GTTGGGCTCCSTCACSTCGCATACCCACTTCCCGGAGTTCCCTCCGCCGCACGCCGCGGTA
33 GTTGGGCTCCSTCACSTCGCATACCCACTTCCCGGAGTTCCCTCCGCCGCACGCCGCGGTA
36 GTTGGGCTCCSTCACSTCGCATACCCACTTCCCGGAGTTCCCTCCGCCGCACGCCGCGGTA
32 GTTGGGCTCCSTCACSTCGCATACCCACTTCCCGGAGTTCCCTCCGCCGCACGCCGCGGTA
16 GTTGGGCTCCSTCACSTCGCATACCCACTTCCCGGAGTTCCCTCCGCCGCACGCCGCGGTA
31 GTTGGGCTCCSTCACSTCGCATACCCACTTCCCGGAGTTCCCTCCGCCGCACGCCGCGGTA
*****

37 CACAGGGTGCCGCGTCTCCCGAAACTTCTTCCCTCCCAGCTCGTTTCTTCGGGTGTGTGGA
35 CACAGGGTGCCGCGTCTCCCGAAACTTCTTCCCTCCCAGCTCGTTTCTTCGGGTGTGTGGA
50 CACAGGGTGCCGCGTCTCCCGAAACTTCTTCCCTCCCAGCTCGTTTCTTCGGGTGTGTGGA
34 CACAGGGTGCCGCGTCTCCCGAAACTTCTTCCCTCCCAGCTCGTTTCTTCGGGTGTGTGGA
4 CACAGGGTGCCGCGTCTCCCGAAACTTCTTCCCTCCCAGCTCGTTTCTTCGGGTGTGTGGA
33 CACAGGGTGCCGCGTCTCCCGAAACTTCTTCCCTCCCAGCTCGTTTCTTCGGGTGTGTGGA
36 CACAGGGTGCCGCGTCTCCCGAAACTTCTTCCCTCCCAGCTCGTTTCTTCGGGTGTGTGGA
32 CACAGGGTGCCGCGTCTCCCGAAACTTCTTCCCTCCCAGCTCGTTTCTTCGGGTGTGTGGA
16 CACAGGGTGCCGCGTCTCCCGAAACTTCTTCCCTCCCAGCTCGTTTCTTCGGGTGTGTGGA
31 CACAGGGTGCCGCGTCTCCCGAAACTTCTTCCCTCCCAGCTCGTTTCTTCGGGTGTGTGGA
*****

37 GGCCAGCATCAACTCTTCGCTGCCTCCATCAGAATCAGGCAAATTCAGGGAATCCCAATT
35 GGCCAGCATCAACTCTTCGCTGCCTCCATCAGAATCAGGCAAATTCAGGGAATCCCAATT
50 GGCCAGCATCAACTCTTCGCTGCCTCCATCAGAATCAGGCAAATTCAGGGAATCCCAATT
34 GGCCAGCATCAACTCTTCGCTGCCTCCATCAGAATCAGGCAAATTCAGGGAATCCCAATT
4 GGCCAGCATCAACTCTTCGCTGCCTCCATCAGAATCAGGCAAATTCAGGGAATCCCAATT
33 GGCCAGCATCAACTCTTCGCTGCCTCCATCAGAATCAGGCAAATTCAGGGAATCCCAATT
36 GGCCAGCATCAACTCTTCGCTGCCTCCATCAGAATCAGGCAAATTCAGGGAATCCCAATT
32 GGCCAGCATCAACTCTTCGCTGCCTCCATCAGAATCAGGCAAATTCAGGGAATCCCAATT
16 GGCCAGCATCAACTCTTCGCTGCCTCCATCAGAATCAGGCAAATTCAGGGAATCCCAATT
31 GGCCAGCATCAACTCTTCGCTGCCTCCATCAGAATCAGGCAAATTCAGGGAATCCCAATT
*****

37 GCATACGAGCGGGTGAGGGTCGGAATATGGTGGAGAAGTAGTATTCATAACGGTGAAGAC
35 GCATACGAGCGGGTGAGGGTCGGAATATGGTGGAGAAGTAGTATTCATAACGGTGAAGAC
50 GCATACGAGCGGGTGAGGGTCGGAATATGGTGGAGAAGTAGTATTCATAACGGTGAAGAC
34 GCATACGAGCGGGTGAGGGTCGGAATATGGTGGAGAAGTAGTATTCATAACGGTGAAGAC
4 GCATACGAGCGGGTGAGGGTCGGAATATGGTGGAGAAGTAGTATTCATAACGGTGAAGAC
33 GCATACGAGCGGGTGAGGGTCGGAATATGGTGGAGAAGTAGTATTCATAACGGTGAAGAC
36 GCATACGAGCGGGTGAGGGTCGGAATATGGTGGAGAAGTAGTATTCATAACGGTGAAGAC
32 GCATACGAGCGGGTGAGGGTCGGAATATGGTGGAGAAGTAGTATTCATAACGGTGAAGAC
16 GCATACGAGCGGGTGAGGGTCGGAATATGGTGGAGAAGTAGTATTCATAACGGTGAAGAC
31 GCATACGAGCGGGTGAGGGTCGGAATATGGTGGAGAAGTAGTATTCATAACGGTGAAGAC
*****

37 TGAAGTGTCTAGATTTTAGTAACAGCAGTTAAGGAGAACCGGTAA-
35 TGAAGTGTCTGAGATTTAGTAAGAGCAGTTAAGAAAAACCGGTAAA
50 TGAAGTGTCTGAGATTTAGTAAGAGCAGTTAAGGAAAAACCGGTAAA
34 TGAAGTGTCTGAGATTTAGTAAGAGCAGTTAAGGAAGAACCGGTAA-
4 TGAAGTGTCTGAGATTTAGTAAGAGCAGTTAAGGAAGAACCGGTAA-
33 TGAAGTGTCTGAGATTTAGTAAGAGCAGTTAAGGAGAACCGGTAA-
36 TGAAGTGTCTGAGATTTAGTAAGAGCAGTTAAGGAAGAACCGGTAA-
32 TGAAGTGTCTGAGATTTAGTAAGAGCAGTTAAGGAGAACCGGTAA-
16 TGAAGTGTCTGAGATTTAGTAAGAGCAGTTAAGGAGAACCGGTAA-
31 TGAAGTGTCTGAGATTTAGTAAGAGCAGTTAAGGAGAACCGGTAA-
***** * * * *

```

Рис. Результаты сравнения секвенированных последовательностей

На вышеприведенном рисунке представлены изучаемые нами сорта винограда:

4 – Шардоне,	34 – Ф/У Джемете,
16 – Кристалл,	35 – Красностоп АЗОС,
31 – Бархатный,	36 – Достойный,
32 – Рислинг рейнский,	37 – Красностоп анапский,
33 – Рислинг АЗОС,	50 – Яй изюм черный.

**Заключение.** Представлены материалы исследования нуклеотидной последовательности локуса *VvCBF4* в генотипах сортов винограда с различным уровнем морозоустойчивости и разной генетической основой.

Корреляции в выявленном SNP-полиморфизме с морозоустойчивостью сортов не обнаружено. Можно предположить, что различия, связанные с локусом *VvCBF4*, в разных по устойчивости к низким температурам генотипах находятся не в структурной части данного гена, а в его регуляторных областях.

### Литература

1. Петров, В.С. Стратегия улучшения сортимента винограда для качественного виноделия / В.С. Петров, Т.А. Нудьга, М.А. Сундырева, Е.Т. Ильницкая, Е.А. Даурова // Достижения, проблемы и перспективы развития отечественной виноградо-винодельческой отрасли на современном этапе: материалы междунар. науч.-практ. конф. - Новочеркасск: Изд-во ГНУ ВНИИВиВ Россельхозакадемии, 2013. – С. 113-119.
2. Ненько, Н.И. Адаптация растений винограда различного эколого-географического происхождения к стрессовым факторам зимнего периода / Н.И. Ненько, И.А. Ильина, В.С. Петров [и др.] // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс] – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2012. – № 13 (01) – С. 51-64. – Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/pdf/12/01/06.pdf>.
3. Kobayashi, M. Characterization of thermotolerance-related genes in grapevine (*Vitis vinifera*) / M. Kobayashi, H. Katoh, T. Takayanagi, S. Suzuki // J Plant Physiol. – 2010. – V. 167. – P. 812-819.
4. Takuhara, Y. Low-temperature-induced transcription factors in grapevine enhance cold tolerance in transgenic Arabidopsis plants / Y. Takuhara, M. Kobayashi, S. Suzuki // Journal of plant physiology. – 2011. – V. 168. – P. 967-975.
5. Kobayashi, M. Characterization of grape C-repeat-binding factor 2 and B-box-type zinc finger protein in transgenic Arabidopsis plants under stress conditions / M. Kobayashi, H. Horiuchi, K. Fujita, Y. Takuhara, S. Suzuki // Molecular biology reports. – 2012. – V.39. – P. 7933-7939.
6. Xiao, H. CBF4 is a unique member of the CBF transcription factor family of *Vitis vinifera* and *Vitis riparia* / H. Xiao, E.A. Tattersall, M.K. Siddiqua, G.R. Cramer, A. Nassuth // Plant Cell Environ. – 2008. – V. 31. – P. 1–10.
7. 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.