

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДОНОРОВ ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ К МИЛДЬЮ *Rpv3* ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ СТОЛОВЫХ СОРТОВ ВИНОГРАДА

Ильницкая Е.Т., канд. биол. наук, Макаркина М.В., Козина Т.Д.

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

Реферат. Методом ДНК-маркерного анализа установлено, что генотипы столовых сортов винограда Талисман, Тимур и Рошфор несут ген устойчивости к милдью *Rpv3*²⁹⁹⁻²⁷⁹. Данные сорта рекомендуются в качестве доноров устойчивости к милдью в селекции винограда, обладая комплексом положительных характеристик, ценных для столовых сортов.

Ключевые слова: виноград, ПЦР, доноры ценных генов, ДНК-маркеры.

Summary. It was established by DNA-marker analysis that the genotypes of table grape varieties of Talisman, Timur and Rochefort carry the gene of resistance to downy mildew *Rpv3*²⁹⁹⁻²⁷⁹. These cultivars are recommended as the donors of downy mildew resistance for grape breeding, while having a set of positive characteristics that are valuable for table varieties.

Key words: grapes, PCR, donors of valuable genes, DNA markers

Введение. С давних времен виноград возделывают в двух направлениях – для употребления в пищу и для приготовления вина. Столовые сорта винограда – это сорта, возделываемые для потребления как в свежем виде, так и в засушенном (изюм). Ягоды винограда очень полезны для человека – в них содержится большое количество витаминов (А, В₁, В₂, С, D, Е, Р, К₁, РР и т.д.), сахаров (глюкоза, фруктоза и иногда в небольшом количестве сахароза), пектинов, органических кислот, минеральных солей, белков и других веществ. Столовый виноград ценится как продукт, обладающий диетическими и лечебными свойствами [1].

Большую проблему для виноградарства представляют грибковые заболевания, в частности милдью (*Plasmopara viticola*). Патоген поражает все зеленые органы виноградных растений: побеги, листья, соцветия, усики и ягоды. Гибель урожая винограда в благоприятных для развития патогена условиях, то есть при повышенной влажности и сохранении теплого температурного режима, может составлять от 50 до 100 % в зависимости от устойчивости определенного сорта [2].

Снизить степень поражаемости растений милдью в настоящее время позволяет обработка фунгицидами. Однако данный способ является экологически небезопасным, особенно для столовых сортов, так как ягоды способны накапливать в себе остатки вредных реагентов. Идентификация доноров генов устойчивости к милдью среди столовых сортов винограда позволяет при дальнейшей селекции создать более безопасные для потребления в пищу сорта.

Устойчивостью к милдью обладают разные генотипы сортов винограда из Азии и Северной Америки: *V. berlandieri*, *V. aestivalis*, *Muscadinia rotundifolia*, *V. cinerea*, также гены устойчивости к милдью были обнаружены в генплазме *V. vinifera* [3, 4]. В настоящее время в геноме винограда идентифицировано около 30 генов и локусов устойчивости к милдью. Многие из этих генов картированы, для них идентифицированы ДНК-маркеры [5].

Один из наиболее крупных локусов устойчивости – *Rpv3* был впервые обнаружен на 18 хромосоме сложного межвидового гибрида винограда Бианка. В родословной этого сорта была обнаружена генплазма *V. vinifera*, *V. labrusca*, *V. rupestris*, *V. berlandieri*, *V. lincecumii* [6]. Позднее было проведено исследование североамериканских сортов, несущих ген *Rpv3*. В результате были обнаружены семь консервативных гаплотипов данного гена, которые определяют устойчивость.

В традиционной селекции можно комбинировать только два гаплотипа в одном диплоиде, так как ценные гаплотипы локализуются в одном локусе. Тесно сцепленные фланкирующие микросателлитные маркеры UDV305, UDV737 дают возможность идентифицировать гаплотипы *Rpv3* гена, что соответствует следующим состояниям локусов UDV305 и UDV737, соответственно: *Rpv3*²⁹⁹⁻²⁷⁹, *Rpv3*^{null-297}, *Rpv3*³²¹⁻³¹², *Rpv3*^{null-271}, *Rpv3*³⁶¹⁻²⁹⁹, *Rpv3*²⁹⁹⁻³¹⁴, *Rpv3*^{null-287} [7]. Таким образом, в качестве доноров устойчивости к *P. viticola* в селекции могут использоваться различные гибриды, в родословной которых присутствует генплазма североамериканских видов и которые унаследовали аллель, определяющую устойчивость.

Основной задачей большинства селекционных программ по винограду является получение более высокоурожайных форм, приспособленных к местным условиям среды, а также обладающих необходимыми качествами. В селекции столовых сортов винограда приоритетными направлениями являются: селекция на крупноплодность, бессемянность, высокие органолептические свойства, а также на хорошую транспортабельность и лежкость. Например, при получении бессемянных крупногодных форм в качестве материнских используют крупноплодные и крупногроздные сорта, склонные образовывать некоторое количество бессемянных ягод. Для длительного хранения ягод важны такие характеристики, как плотность мякоти, прочная кожица, а также хорошее прикрепление ягод к плодоножке [8].

Целью данной работы было выделение для селекции столовых сортов винограда доноров гена устойчивости к милдью *Rpv3* на основе данных ДНК-маркерной оценки.

Объекты и методы исследований. В исследование были включены столовые сорта винограда, перспективные для использования в селекции, и которые, согласно их родословной, могли бы унаследовать ген *Rpv3* [9, 10]. Исследование проведено методом ПЦР с анализом результатов на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 3130. ДНК выделяли из коронки молодых побегов растений изучаемых сортов методом ЦТАБ [11].

В работе использованы микросателлитные маркеры, рекомендованные для ДНК-идентификации изучаемого гена: UDV305, UDV737 [7]. В качестве контролей использовали ДНК сорта, в которых был обнаружен указанный ген, согласно опубликованным данным (Сейв Виллар 12-375). ПЦР проводили с использованием реактивов производства ООО «Синтол» (Россия, Москва).

Аmplификацию ДНК осуществляли прибором BioRad (США) по следующей программе: 5 минут при 95 °С – начальная денатурация, далее 35 циклов: 10 секунд денатурация при 95 °С; 30 секунд отжиг праймеров – 55 °С; синтез ПЦР-фрагментов – 30 секунд при 72 °С; завершающий цикл – 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 программного обеспечения GeneMapper и PeakScanner.

Обсуждение результатов. В результате ДНК-маркерного анализа ген *Rpv3* был обнаружен нами в генотипах столовых сортов Талисман (Фрумоаса Албэ x Восторг), Тимур (Фрумоаса Албэ x Восторг), Рошфор (Талисман x Кардинал + смесь пыльцы) [9, 10].

В таблице представлены идентифицированные нами аллели, сцепленные с геном устойчивости к милдью *Rpv3*.

Результаты анализа генотипов винограда на наличие гена *Rpv3*

Сорт	Идентифицированные аллели, п. н.			
	UDV305		UDV737	
Сейв Виллар 12-375 (контроль)	299	361	279	299
Талисман (Фрумоаса Албэ x Восторг)	299	326	279	295
Тимур (Фрумоаса Албэ x Восторг)	299		279	
Рошфор (Талисман x Кардинал + смесь пыльцы)	299	342	279	285

Столовые сорта Талисман, Тимур, Рошфор рекомендуются нами как доноры гена устойчивости к милдью *Rpv3* в селекции столового винограда, так как обладают рядом положительных характеристик, ценных для столовых сортов.

Талисман – столовый сорт винограда, отличается высокой морозоустойчивостью (-25 °С), хорошей устойчивостью к патогенам (милдью, серая гниль) и высокой урожайностью. Срок созревания ранне-средний. Цветок функционально женского типа, опыляется хорошо, горошение незначительное, но в годы с плохими условиями цветения желательно дополнительное опыление. Грозди средней плотности, реже рыхлые, чаще всего конические, средним весом 800-1100 г (и более). Ягоды очень крупные: 12-16 г, белые, гармоничного вкуса, при полном созревании появляется мускатный аромат. Сахаронакопление –17-23 %, кислотность 6-8 г/л. Сорт транспортабельный [12].

Тимур – столовый сорт винограда, по сроку созревания является сверхранним. Отличается высокой зимостойкостью и устойчивостью к основным болезням виноградной лозы. Ягоды крупные – 6-8 г, сосковидные или овальные, с заостренным кончиком, белые, с янтарным или слабокоричневым загаром на солнце. Мякоть ягод хрустящая, плотная, с мускатным ароматом. Кожица тонкая, рвущаяся. Сахаронакопление высокое 17-22 %, кислотность 6-9 г/л. Грозди 400-600 г, цилиндрикоконические и конические, умеренно-рыхлые, реже умеренно-плотные. Сила роста кустов невысока, высаживать рядом с сильнорослыми сортами винограда не рекомендуется [12].

Рошфор – столовый раннеспелый сорт винограда, большой силы роста. Вызревание побегов хорошее. Ягоды темно-синие, округлые, средней массой 6,2 г, грозди средние, средней массой 390 г, хорошего вкуса. Кожица съедаямая, мякоть мясистая. К достоин-

ствам сорта относят высокий товарный вид плодов с мускатным вкусом, высокую продуктивность, транспортабельность и лежкость собранного урожая [12].

Заключение. Методом ДНК-маркерного анализа выявлено наличие аллели, определяющей устойчивость к милдью гена *Rpv3*²⁹⁹⁻²⁷⁹ в сортах винограда Талисман, Тимур и Рошфор. Данные сорта обладают комплексом положительных характеристик, представляющих интерес в селекции столовых сортов: крупноплодность, хороший товарный вид грозди, высокие вкусовые показатели, раннеспелость и др. Данные сорта рекомендуются нами как доноры *Rpv3*²⁹⁹⁻²⁷⁹ гена устойчивости к милдью и источники комплекса ценных признаков в селекции столовых сортов винограда.

Литература

1. Тимуш А.И. Энциклопедия виноградарства. Кишинёв: Главная редакция Молдавской Советской Энциклопедии, 1986. Т. 1. 502 с.
2. 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://journal.kubansad.ru/pdf/10/03/04.pdf>. (дата обращения: 08.02.2021).
3. Alleweldt, G. Progress in grapevine breeding // Theor. Appl. Genet. 1988. V. 75. P. 669-673.
4. Sargolzaei M., Maddalena G., De Lorenzis G. *Rpv29*, *Rpv30* and *Rpv31*: three novel genomic loci associated with resistance to *Plasmopara viticola* in *Vitis vinifera* // Frontiers in Plant Science. 2020. Vol. 11. P. 1-16.
5. International Variety Catalogue VIVC // Julius Kuhn-Institut [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.vivc.de>
6. 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.
7. 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.
8. Современные методологические аспекты организации селекционного процесса в садоводстве и виноградарстве: монография / Под общей редакцией Г.В. Еремина. Краснодар: СКЗ-НИИСиВ, 2012. 569 с.
9. ДНК-диагностика гена *Rpv3*, определяющего устойчивость винограда к возбудителю милдью / Е.Т. Ильницкая [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. Новосибирск. 2018. Т. 22(6). С. 703-707.
10. Ilnitskaya E., Makarkina M., Tokmakov S., Kotlyar V. DNA-marker identification of *Rpv3* and *Rpv12* resistance loci in genotypes of table and seedless grape varieties // BIO Web of conferences. 2020. Vol. 25. P. 03004.
11. 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.
12. Трошин Л.П., Радчевский П.П. Виноград: иллюстрированный каталог. Районированные, перспективные, тиражные сорта. Ростов н/Д: Феникс, 2010. 271 с.