

АПРОБАЦИЯ ДНК-МАРКЕРА К ГЕНУ *REN9* УСТОЙЧИВОСТИ К ОИДИУМУ**Макаркина М.В.¹, Козина Т.Д.¹, Кожевников Е.А.²**¹*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия»
(Краснодар, Россия)*²*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный университет» (Краснодар, Россия)*

Реферат. Проведена апробация ДНК-маркера CenGen6 сцепленного с геном устойчивости к оидиуму *Ren9*. Проанализированы сорта винограда «Кишмиш черный АЗОС», «Кишмиш розовый АЗОС», «Дмитрий», «Дунавска гымза», «Сторгозия», «Филлоксероустойчивый «Джемете», которые согласно своей родословной и/или полевой оценке, потенциально могут быть донорами устойчивости к оидиуму. По данным ДНК-анализа ген *Ren9* обнаружен в сортах винограда «Дмитрий», «Дунавска гымза» и «Сторгозия».

Ключевые слова: виноград, оидиум, ген устойчивости к оидиуму *Ren9*, ДНК-маркер

Summary. Testing of the CenGen6 DNA marker linked to the *Ren9* powdery mildew resistance gene was carried out. Analyzed grape varieties «Kishmish chornyi AZOS», «Kishmish rozovyi AZOS», «Dmitriy», «Dunavska gimza», «Storgosia», «Phylloxeroustoichiviy «Dzhemetete», which, according to their breeding record and/or field assessment, can potentially be donors of resistance to powdery mildew. According to DNA analysis, the *Ren9* gene was found in the grape varieties «Dmitriy», «Dunavska gumza» and «Storgosia».

Key words: grapevine, powdery mildew, powdery mildew resistance gene *Ren9*, DNA-marker

Введение. Большой ущерб для виноградарства наносят заболевания грибковой природы, к числу которых относится оидиум (настоящая мучнистая роса, пепелица), вызываемое облигатным биотрофным аскомицетом, включающим два подвида: *Erysiphe necator* Schwein. (ранее *Uncinula necator* Schwein. Burrill) (сумчатая стадия) и *Oidium tuckeri* Berk. (конидиальная стадия) [1]. Патоген паразитирует на хлорофиллоносных тканях надземных органов винограда (молодые побеги, листья, цветы и ягоды) [2]. Поражение незрелых ягод, а также гребней и гребненожек в период формирования грозди, и в начале созревания повышает риск усыхания гроздей и ведет к большим потерям урожая [3]. Распространение фитопатогена происходит путем конидиального спороношения, особенно в жаркую и сухую погоду [2]. Однако, в Краснодарском крае патоген хорошо развивается как во влажных условиях, так и при высоких температурах с пониженной влажностью воздуха [3].

Для сохранения хорошей производительности виноградников, требуется использование фунгицидов, зачастую химической природы, что не всегда эффективно и противоречит современной стратегии стремления к рациональному природопользованию. Интеграция генетической устойчивости в сорта винограда поможет снизить зависимость виноградарства от химических веществ, ведь именно создание устойчивых к оидиуму сортов винограда является важным этапом на пути к более экологически чистому и экономически эффективному виноградарству. Европейские сорта *Vitis vinifera* L., обладающие лучшими качественными характеристиками, в высокой степени восприимчивы к данному заболеванию, хотя и имеют свою иммунологическую дифференциацию. Генетическая устойчивость к возбудителю оидиума, в основном, характерна для северо-американских видов, таких как *V. rupestris* Scheele, *V. riparia* Michx., *V. aestivalis* Michx. и др., а также азиатских (*V. rotundifolia*, *V. piasezkii* и др.) [4, 5].

С развитием молекулярно-генетических методов стало возможно секвенировать геном виноградного растения, картировать локусы хозяйственно-ценных признаков в нем и сконструировать маркеры, с помощью которых можно успешно идентифицировать гены-интереса. Так, в геноме различных видов винограда были идентифицированы более 10 крупных и менее значимых локусов резистентности к *Erysiphe necator*, имеющих общую символику *Run* и *Ren* (соответственно устойчивость к *U. necator* и *E. necator*) [6-11]. Несмотря на то, что сорта *V. vinifera* в большинстве своем не являются источниками устойчивости к оидиуму, удалось идентифицировать локус устойчивости *Ren1* в генотипе «Kishmish vatkana» и *Sen1* в генотипе «Chardonnay» [7, 12].

Локус резистентности *Ren9*, которому посвящена данная работа, был впервые идентифицирован в ходе более подробного картирования локуса устойчивости *Ren3* в гибридной популяции «Regent» x «Lemberget» на передней части 15 хромосомы. Также были сконструированы ДНК-маркеры, сцепленные с данным геном, такие как GF15-30, GF15-62, UDV116, CenGen6, CenGen7 [13, 14]. Маркер CenGen6, показал себя наиболее эффективным и рекомендован для маркерной селекции (marker assisted selection (MAS)), направленной на создание сортов устойчивых к оидиуму [13]. Маркерная селекция – одна из областей применения ДНК-маркерных технологий – позволяет идентифицировать и отбирать генотипы, несущие целевые гены, минуя фенотипическую оценку, основываясь лишь на данных ДНК-анализа [15].

Цель исследования – апробация ДНК-маркера CenGen6 к гену устойчивости к оидиуму *Ren9*.

Объекты и методы исследований. Для апробации ДНК-маркера CenGen6 к гену *Ren9* в работу были включены ДНК сортов «Regent» и «Villard Blanc», как положительные контроли, в которых по литературным данным присутствует ген *Ren9* и неустойчивый к оидиуму сорт «Cabernet Sauvignon», как отрицательный контроль [13, 17]. Также в исследование включили сорта, которые потенциально могут нести ген устойчивости, согласно их родословной (Дмитрий, Дунавска гымза, Кишмиш черный АЗОС, Кишмиш розовый АЗОС, Сторгозия, Филлоксероустойчивый Джемете (Ф/У Джемете)) (Таблица).

Экстракцию ДНК осуществляли методом ЦТАБ из молодых апикальных листьев побегов исследуемых сортов, произрастающих на Анапской ампелографической коллекции (г. Анапа) и на Ампелографической коллекции Всероссийского НИИ виноградарства и виноделия имени Я.И. Потапенко (филиал ФГБНУ ФРАНЦ) (г. Новочеркасск) [16]. Условия полимеразной цепной реакции (ПЦР) и состав смеси подбирали экспериментальным путем, в частности, температуру отжига праймеров к маркеру CenGen6 изначально рассчитывали по формуле:

$$T_a = [(A+T) \times 2 \text{ }^\circ\text{C}] + [(G+C) \times 4 \text{ }^\circ\text{C}] - 5,$$

где А, Т, G, С – количество адениновых, тиминовых, гуанидиновых и цитозиновых оснований в нуклеотидной последовательности праймера.

В нашем случае расчётная температура отжига праймеров (T_a) оказалась равна экспериментальной (T_m) – 55 °С. В конечном итоге оптимальным протоколом был принят следующий: начальная денатурация – 5 минут при +95 °С; далее 34 цикла синтез: денатурация – 10 секунд при +95 °С, отжиг праймеров – 30 секунд при +55 °С, элонгация – 30 секунд при +72 °С; завершающий цикл (финальная элонгация) – 3 минуты при +72 °С. Предварительно был подобран состав реакционной смеси: в общем объеме 20 мкл содержалось 50 нг геномной ДНК, 1,5 единицы Tag-полимеразы, 1хбуфер для Tag-полимеразы с сульфатом аммония и магнием, 2мМ MgCl₂, по 0,2 мМ каждого dNTP

(дезоксинуклеотидтрифосфаты) (СибЭнзим-М, Москва) и 200 мкМ каждого из праймеров (ООО «Синтол», Москва) Для постановки ПЦР использовали ДНК-амплификатор Eppendorf Mastercycler nexus GX2 (Германия).

Последовательности олигонуклеотидов маркера CenGen6 синтезированы с флуоресцентной меткой R6G.

Полученные результаты ПЦР (амплифицированные фрагменты, ампликоны) разделяли методом капиллярного электрофореза с использованием автоматического генетического анализатора ABI Prism 3130 (США). Размер амплифицированных фрагментов оценивали с помощью специального программного обеспечения – GeneMapper и PeakScanner. Полученные данные корректировали относительно сортов-контролей («Regent» и «Seyve Villard 12-375»), имеющих известный аллельный состав.

Обсуждение результатов. Проведена апробация ДНК-маркера CenGen6 к гену устойчивости к оидиуму *Ren9* на сортах винограда Кишмиш черный АЗОС, Кишмиш розовый АЗОС, Дмитрий, Дунавска гымза, Сторгозия, имеющих в своей родословной генплазму северо-американских видов, которые, согласно литературным данным, могут быть источниками резистентности к данному заболеванию. Также был проанализирован генотип «Ф/У «Джемете», обладающий повышенной устойчивостью к оидиуму, происхождение которого неизвестно. Результаты ДНК-анализа представлены в таблице.

Таблица – Результаты ДНК-маркерного анализа гена *Ren9* в изучаемых генотипах винограда

Сорт	Происхождение	Размер ПЦР-фрагмента, пары нуклеотидов	
Regent (положительный контроль)	Diana x Chambourcin (Seyve Villard 12-417 x Seibel 7053)	277	287
Villard Blanc (положительный контроль)	Seibel 6468 x Seibel 6905	276	287
Cabernet Sauvignon (отрицательный контроль)	Стародавний французский сорт винограда	277	-
Кишмиш черный АЗОС	Криулянский (Нимранг x сеянец № 180-2 x Pierrelle (Muscat Hamburg x Villard Blanc) x Черная жемчужина) x Янги Ер	272	277
Кишмиш розовый АЗОС	Криулянский (Нимранг x сеянец № 180-2 x Pierrelle (Muscat Hamburg x Villard Blanc) x Черная жемчужина) x Янги Ер	272	277
Дмитрий	Varousset (Seyve Villard 23-657) x Гранатовый	271	287
Дунавска гымза	(Mavrud x Pinot noir) x Villard Blanc	287	-
Сторгозия	(Mavrud x Pinot noir) x Villard Blanc	277	287
Ф/У Джемете	Неизвестно	277	291

Известно, что целевым продуктом, отвечающим за наличие гена устойчивости, является фрагмент размером 287 пар нуклеотидов [13]. Выявлены целевые продукты (287 п. н.) в сортах-положительных контролях (Regent, Villard Blanc), в отрицательном контроле (Cabernet Sauvignon) целевой фрагмент не обнаружен, что говорит об успешной апробации исследуемого маркера (рис).

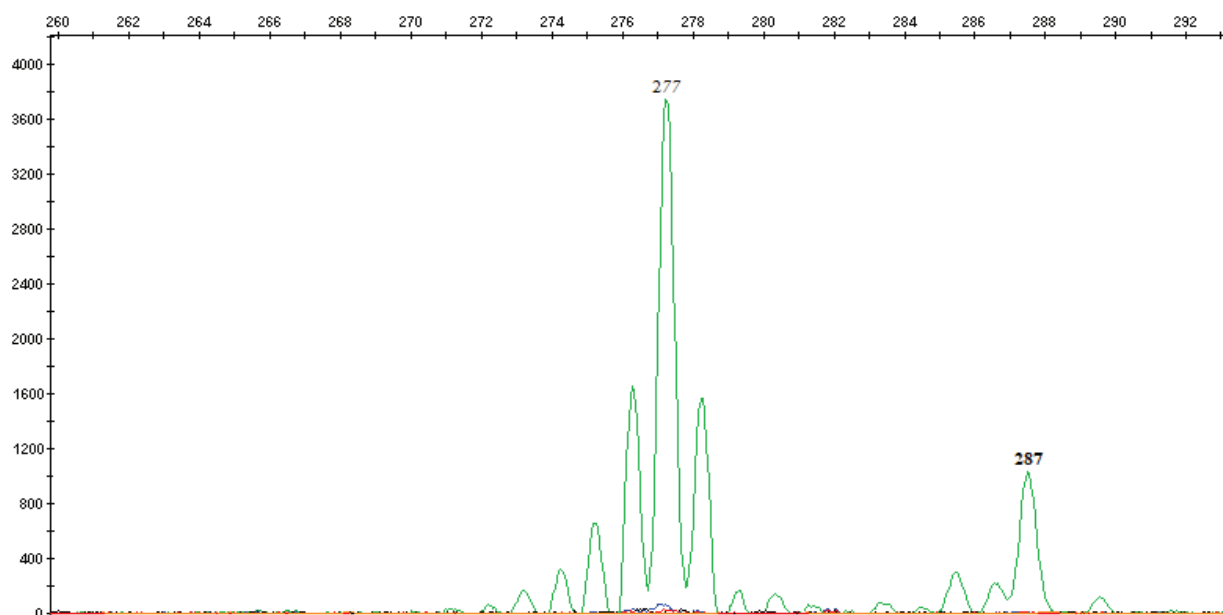


Рис. Визуализация результатов ПЦР-анализа методом капиллярного электрофореза в контрольном генотипе «Regent»

Кроме сортов-положительных контролей, целевые продукты удалось идентифицировать в сортах «Дмитрий», «Дунавска гымза» и «Сторгозия», что говорит о наличии гена *Ren9* в данных генотипах. Следует отметить, что в сортах «Дунавска гымза» и «Сторгозия» ранее нами также был идентифицирован ген *Ren3* устойчивости к оидиуму. Что является закономерным – сорта носители гена *Ren9*, в большинстве своем также имеют в своей генплазме ген *Ren3*. Источником устойчивости в данных генотипах, согласно их родословной, является сорт «Villard Blanc» (табл.). СОРТУ винограда «Дмитрий» ген устойчивости к оидиуму передан от северо-американского сорта «Varousset» (из серии гибридов «Seyve Villard»).

В сортах винограда «Кишмиш черный АЗОС», «Кишмиш розовый АЗОС» и «Ф/У «Джемте» целевые продукты не обнаружены.

Выводы. Успешно проведена апробация ДНК-маркера *SenGen6* к гену устойчивости к оидиуму *Ren9*: подобраны оптимальные условия ПЦР, идентифицированы целевые продукты. По данным ДНК анализа выявлено наличие гена *Ren9* в сортах винограда «Дмитрий», «Дунавска гымза» и «Сторгозия».

Литература

1. Gadoury D. M., Cadle Davidson L.A.N.C.E., Wilcox W.F., Dry I.B., Seem R.C., Milgroom M.G. Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph // Mol Plant Pathol. 2012. Vol. 13(1). P. 1-16.

2. Qiu W., Feechan A., Dry I. Current understanding of grapevine defense mechanisms against the biotrophic fungus (*Erysiphe necator*), the causal agent of powdery mildew disease // Horticulture Research. 2015. Vol. 2. P. 1-9.

3. Юрченко Е.Г., Савчук Н.В., Буровинская М.В. Биотехнологическая оптимизация фитосанитарного состояния ампелоценозов // Сборник научных трудов Государственного Никитского ботанического сада. 2019. Т. 148. С. 132-142.

4. Cadle-Davidson L., Chicoine D., Consolie N. Variation within and among *Vitis spp.* for foliar resistance to the powdery mildew pathogen *Erysiphe necator* // Plant disease. 2011. Vol. 95(2). P. 202-211.

5. Wan Y., Schwaninger H., He P., Wang Y. Comparison of resistance to powdery mildew and downy mildew in Chinese wild grapes // Vitis. 2007. Vol. 46. P. 132-136.

6. Pauquet J., Bouquet A., This P., Adam-Blondon A. F. Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene *Run1* in grapevine and assessment of their usefulness for marker aided selection // Theoretical and applied genetics. 2001. Vol. 103. P. 1201-1210.

7. Hoffmann S, Di Gaspero G, Kovács L, Howard S, Kiss E, Galbács Z, Testolin R, Kozma P. Resistance to *Erysiphe necator* in the grapevine «Kishmish vatkana» is controlled by a single locus through restriction of hyphal growth // Theoretical and applied genetics. 2008. Vol. 116(3). P. 427- 438.

8. Dalbó M.A, Ye G.N, Weeden N.F., Wilcox W.F., Reisch B.I. Marker-assisted selection for powdery mildew resistance in grapes // J. Am. Soc. Horticult. Sci. 2001. Vol. 126(1). P. 83-89.

9. Pap D., Riaz S., Dry I. B, Jermakow A., Tenschler A.C., Cantu D., Oláh R., Walker M.A. Identification of two novel powdery mildew resistance loci, *Ren6* and *Ren7*, from the wild Chinese grape species *Vitis piasezkii* // BMC Plant Biology. 2016. Vol. 16(1). P. 1-19.

10. Zyprian E., Ochßner I., Schwander F., Šimon S., Hausmann L., Bonow-Rex M., Moreno-Sanz P., Grando M.S., Wiedemann-Merdinoglu S., Merdinoglu D., Eibach R., Töpfer R. Quantitative trait loci affecting pathogen resistance and ripening of grapevines // Mol Genet Genomics. 2016. Vol. 291(4). P. 1573-94.

11. Teh S.L., Fresnedo-Ramírez J., Clark M.D., Gadoury D.M., Sun Q., Cadle-Davidson L., Luby J.J. Genetic dissection of powdery mildew resistance in interspecific half-sib grapevine families using SNP-based maps // Molecular Breeding. 2017. Vol. 37(1). P. 1-16.

12. Barba P., Cadle-Davidson L., Harriman J., Glaubitz, J. C., Brooks, S., Hyma, K., & Reisch, B. (2014). Grapevine powdery mildew resistance and susceptibility loci identified on a high-resolution SNP map // Theoretical and applied genetics, 127(1), 73-84.

13. Zendler, D., Schneide, P., Töpfe, R., Zyprian E. Fine mapping of *Ren3* reveals two loci mediating hypersensitive response against *Erysiphe necator* in grapevine // Euphytica. 2017. Vol. 213. P. 1029.

14. Zendler D., Topfer R., Zyprian E. Confirmation and fine mapping of the resistance locus *Ren9* from the grapevine cultivar «Regent» // Plants. 2021. Vol. 10(1). P. 24.

15. Hvarleva T., Bakalova A., Rusanov K., Diakova G., Ilieva I., Atanassov A., Atanassov I. Toward marker assisted selection for fungal disease resistance in grapevine // Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2009. Vol. 23(4). P. 1431-1435.

16. 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.

17. Zini E., Dolzani C., Stefanini M., Gratl V., Bettinelli P., Nicolini D., Betta G., Dorigatti C., Velasco R., Letschka T., Vezzulli S. R-Loci arrangement versus downy and powdery mildew resistance level: a *Vitis* Hybrid Survey // International journal of molecular sciences. 2019. Vol. 20(14). P. 3526.

18. Ильницкая Е.Т., Макаркина М.В., Токмаков С.В., Наумова Л.Г. Апробация ДНК-маркеров сцепленных с геном *Ren3* устойчивости сортов винограда к оидиуму [Электронный ресурс] // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2019. Т. 56(2). С. 84-92. Режим доступа: <https://journal.kubansad.ru/pdf/19/02/08.pdf> (дата обращения: 25.06.2021)