

УДК 634.8:631.543.1:632.3:577.213

ОЦЕНКА ЧИСТОСОРТНОСТИ И ТЕСТИРОВАНИЕ ПО МОЛЕКУЛЯРНЫМ МАРКЕРАМ ОСНОВНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ВИНОГРАДА¹

Рисованная В.И., канд. биол. наук, Гориславец С.М., канд. биол. наук

ФГБУН «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН» (Ялта, Республика Крым)

Реферат. Приведены результаты практического использования молекулярных маркеров для оценки чистосортности и идентичности посадочного материала винограда и тестирования латентной стадии фитопатогенов в целях повышения конкурентоспособности.

Ключевые слова: виноград, посадочный материал, молекулярные маркеры, идентификация, вирусы, латентная стадия

Summary. It is present the results of the practical use of molecular markers to assess the pureness and identity grapes planting material to original cultivar and latent stage of plant pathogens for increasing of the competitiveness.

Key words: grapes, planting material, molecular markers, identification, viruses, latent stage

Введение. Повышение продуктивности виноградных насаждений требует применения современных технологий. Как известно, основой конкурентоспособности посадочного материала лежит сочетание цены и качества, в том числе генетического качества, которое включает оценку идентичности посадочного материала исходному сорту и латентной стадии фитопатогенов. Поскольку посадочный материал винограда распространяется в основном в «древесном виде» (саженцы, черенки), это делает идентификацию сорта традиционными ботаническими методами почти невозможной.

Появление современных методов молекулярной генетики значительно увеличило возможности идентификации генотипов растений и последующей оценки идентичности их посадочного материала. Молекулярные методы занимают лидирующее положение не только в области идентификации, сертификации сортов различных культурных растений, но и в оценке фитосанитарного состояния.

Наиболее информативным на сегодняшний день, в частности, считается метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием микросателлитных маркеров (SSR - маркеров) [1,2]. Он применяется для идентификации наиболее важных сельскохозяйственных культур, в том числе плодовых и винограда [3-6].

Основой создания высокопродуктивных промышленных насаждений столовых и винных сортов винограда является их закладка не только чистосортным, но и здоровым посадочным материалом свободным от основных вирусных, бактериальных и фитоплазменных заболеваний. Вирусные болезни винограда – инфекционные болезни, вызываемые вирусами или им подобными патогенными организмами.

Вирусы распространяются с посадочным материалом, нематодами, во время цветения с пыльцой и семенами, а также механическим путем. Наиболее часто они встречаются на привитой культуре винограда, что обуславливает их широкое распространение. Помимо снижения урожая и качества винограда и вина, эти патогены снижают зимостойкость, за-

¹ Работа выполнена при поддержке субсидии Министерства образования и науки Российской Федерации RFMEFI60414X0145.

сухоустойчивость виноградной лозы и срок ее жизни. Кроме того, пораженная вирусами и бактериями лоза служит источником инфекции посадочного материала для новых насаждений. Способ заготовки черенков без тестирования фитопатогенных бактерий и вирусов может приводить к размножению низкопродуктивных растений, зараженных вирусами, бактериальным раком, болезнью Пирса и другими хроническими заболеваниями, передающимися вегетативному потомству через черенки и снижающими выход стандартных саженцев [7, 8].

Таким образом, точная идентификация посадочного материала и диагностика вирусных и бактериальных патогенов, особенно в их латентной стадии, невозможны без применения современных инструментальных методов – иммунологических и молекулярно-биологических, что и стало целью наших исследований.

Объекты и методы исследований. В нашем эксперименте сбор материала был осуществлен на национальной ампелографической коллекции Института "Магарач". SSR ПЦР – анализ выполнен в лаборатории молекулярно-генетических исследований отдела биологически чистой продукции и молекулярно-генетических исследований института "Магарач". В целях идентификации сортов *Vitis vinifera* L. была выделена геномная ДНК из тканей молодых побегов и листьев, свободных от внешних признаков патологии.

Чистоту и количество ДНК оценивали на спектрофотометре "Biophotometer plus" и методом гель-электрофореза в 1 % агарозном геле. Полимеразная цепная реакция выполнена на амплификаторе "Mastercycler" фирмы Eppendorf с использованием набора праймеров для амплификации микросателлитных локусов. В качестве негативного контроля использовали ПЦР смесь без добавления ДНК.

Для визуализации продуктов амплификации F - праймер каждого локуса был маркирован флюорохромами FAM, HEX или NED. Фрагментный анализ проводили на генетическом анализаторе ABI 3130 (Applied Biosystems) с полимером POP 7. Размер амплифицированных фрагментов анализировали с помощью программы GeneMapper (version 3.5).

ДНК-профилирование сортов и пяти контрольных сортов выполнено методом SSR-ПЦР с помощью анализа 9 микросателлитных локусов *ssrVVS2*, *ssrVVMD5*, *ssrVVMD7*, *ssrVVMD25*, *ssrVVMD27*, *ssrVVMD28*, *ssrVVMD32*, *ssrVrZAG62*, *ssrVrZAG79* в соответствии с рекомендациями Европейской рабочей группы по винограду, проекта COST и методиками [2,9,10]. Для анализа наличия вирусов из отобранных образцов выделяли РНК по методике, описанной Rott and Jelkman, 1990 [11].

Синтез к ДНК выполняли в соответствии с инструкцией Revert Aid FirstStrandc DNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). Наличие фитопатогенных вирусов в посадочном материале винограда (черенки, саженцы, растения *in vitro*) определяли методом ИФА и ОТ-ПЦР по протоколам производителя. Наличие фитопатогенных бактерий – с помощью микробиологических и молекулярных методов, в том числе ПЦР со специфическими праймерами.

Обсуждение результатов. Оценку идентичности посадочного материала по молекулярным маркерам выполняют путем сравнительного анализа с ДНК профилями исходного сорта. Идентификация методом SSR-ПЦР основывается на определении аллельного состава микросателлитных локусов ДНК исследуемых образцов и является основой для последующей паспортизации сортов.

Образцы сортов винограда Шардоне, Каберне-Совиньон, Мерло, Гранатовый Магарача, Солнечная долина 60, Ташлы, Кутлакский черный, Бияс айбатлы, произрастающие на ампелографической коллекции института «Магарач» были генотипированы по девяти микросателлитным локусам. По результатам фрагментного анализа был определен со-

став аллелей микросателлитных локусов, то есть микросателлитные профили или ДНК паспорта, которые можно использовать для оценки идентичности посадочного материала, клонов, растений *in vitro*. (табл.).

Пример микросателлитных профилей сортов винограда по 9 SSR локусам

Сорт	Микросателлитный профиль/ДНК паспорт, п.н.
Шардоне	VVS2 _{135 141} VVMD5 _{232 236} VVMD7 ₂₃₉ 243VVMD25 _{238 254} VVMD27 _{178 186} VVMD28 _{216 226} VVMD32 _{238 271} VrZAG62 188 196 VRZAG79 _{244 246}
Мерло	VVS2 _{137 149} VVMD5 _{224 234} VVMD7 ₂₃₉ 247VVMD25 _{248 238} VVMD27 _{186 188} VVMD28 ₂₂₆₂₃₃ VVMD32 _{239 239} VrZAG62 194 194 VRZAG79 _{260 260}
Каберне Совиньон	VVS2 ₁₃₁₁₃₇ VVMD5 ₂₂₉₂₃₈ VVMD7 ₂₃₉₂₃₉ VVMD25 ₂₄₈₂₃₈ VVMD27 ₁₇₂₁₈₆ VVMD28 ₂₃₃₂₃₅ VVMD32 _{239 239} VrZAG62 _{188 194} VRZAG79 _{248 248}
Гранатовый Магарача	VVS2 ₁₃₁₁₃₁ VVMD5 ₂₂₃₂₃₈ VVMD7 ₂₃₉₂₄₃ VVMD25 ₂₃₈ 240VVMD27 _{176 178} VVMD28 ₂₃₅₂₃₅ VVMD32 _{243 255} VrZAG62 _{188 188} VRZAG79 244 256
Солнечная долина 60	VVS2135 143VVMD5234 236VVMD7239 249VVMD25254 254VVMD27178 184VVMD28257 257VVMD32249 271VrZAG62194 196VrZAG79 244 252
Ташлы	VVS2141 143VVMD5225 244VVMD7239 249VVMD25238 248VVMD27176 186VVMD28235 257 VVMD32249 261VrZAG62188 200VrZAG79 244 252
Кутлакский черный	VVS2133 133VVMD5229 234 VVMD7245 249VVMD25238 254VVMD27182 191VVMD28239 243VVMD32251 271VrZAG62202 202VrZAG79 252 252
Бияс айбатлы	VVS2143 147VVMD5225 244VVMD7239 253VVMD25244 254VVMD27180 180VVMD28235 257VVMD32251 261 VrZAG62200 204VrZAG79 240 250

Сравнительный анализ ISSR профилей родительских форм и потомков в комбинациях скрещиваний – СВ12375 х Кишмиш черный, Чауш белый х СВ12375, Чауш белый х СВ20365, Магарач 11-57-130 х Антей магарачский позволил выделить среди гибридных семян, наряду с ожидаемыми микросателлитными профилями, примеси, которые были исключены из селекционной программы.

Тестирование латентной стадии инфекции основных вирусных болезней винограда выполнено на посадочном материале сортов Шардоне, Каберне-Совиньон, Мерло, Мускат Оттонель, Подарок Запорожья, Кеша, Аркадия, Спорт-2, Надежда АЗОС, Пино Менье и др. происхождением из питомников России, Украины, Италии, Приднестровья, Крыма, который был завезён виноградарскими хозяйствами разной формы собственности для закладки маточников и виноградников.

На сегодняшний день к основным вирусным инфекциям, поражающим виноградное растение, относятся:

- короткоузлие (GFLV Grape vine fan leaf virus);
- скручивание листьев (GLRaV, Grape vine leaf roll-associated virus), 9 штаммов;
- мраморная мозаика (GFkV, Grape vine fleck virus);

комплекс борозчатости древесины:

- опробковение коры (GVA Grapevine virus A);
- ямчатость древесины (GVB Grapevine virus B);
- борозчатость древесины (RSPaV – Rupestris stem pitting-associated virus).

В результате проведенных исследований в анализируемых образцах были обнаружены наиболее распространенные вирусы винограда: короткоузлие (GFLV), два штамма скручивания листьев (GFLV-1, GFLV-3), опробковение коры (GVA). Некоторые образцы несли смешанную вирусную инфекцию, которая на электрофореграмме визуализируется в виде двух ампликонов (рис.).

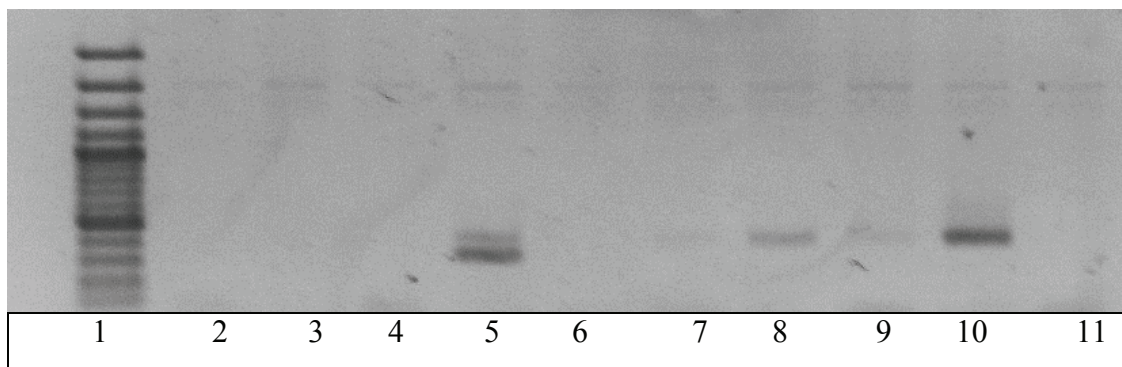


Рис. Оценка латентной стадии вирусов GLRaV (образцы 2-5) и GVA (образцы 7-10) в бессимптомном посадочном материале:

- 1 – маркер молекулярной массы (Gene Rule TM 100 bp DNA Ladder Mix);
- 6, 11 – негативный контроль;
- 2-5 и 7-11 – образцы;
- 5,8,10 – наличие вирусной инфекции;
- 5 – наличие смешанной инфекции GLRaV-1 и GLRaV-3; 8,10 – наличие вируса GVA.

Заключение. Таким образом, ДНК профили сортов винограда, полученные в данном исследовании, как и в исследованиях, выполненных ранее, позволяют при необходимости оценивать идентичность и сортовую чистоту их посадочного материала [2, 5]. В некоторых образцах посадочного материала, полученных из питомниководческих хозяйств разных стран, была выявлена вирусная инфекция в латентной стадии. Существуют разные спосо-

бы оздоровления посадочного материала – от традиционных, таких как термотерапия и культура меристем *in vitro*, до малораспространённых у нас – электротерапии, химиотерапии или криотерапии. Однако они не освобождают от необходимости тестирования латентной стадии инфекции на каждом этапе оздоровления.

Результаты наших исследований и данные литературы позволяют рекомендовать включить в схему сертификации посадочного материала этапы оценки генетического качества по молекулярным маркерам.

В связи с актуальностью оценки состояния виноградников в Крыму, совместно с ФГУ «ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, ведутся широкомасштабные обследования промышленных виноградников с целью молекулярной диагностики фитопатогенов винограда. Результаты обследований объединены в базу данных (свидетельство о государственной регистрации № 2016620355).

Литература

1. Laucou V. High through put analysis of grape genetic diversity as a tool for germplasm collection management/ V. Laucou, T. Lacombe, F. Dechesne et al. // *Theor. Appl. Genet.* – 2011. – V. 122 – P. 1233-1245.
2. This P. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars/ P. This, A. Jung, P. Vercocci et al. // *Theor. Appl. Genet.* – 2004. – V. 109. – P. 1448-1458.
3. Gismondi A. Detection of new genetic profiles and allelic variants in improperly classified grapevine accessions / A. Gismondi, S. Impei, G. Dimarco et al. // *Genome.* – 2014. – V. 57 – P. 111-118.
4. Heuertz M. Characterization of grapevine accessions from Ukraine using microsatellite markers / M. Heuertz, S. Goryslavets, J. Hausman, V. Risovannaya // *Am. J. Enol. Vitic.* – 2008. – V. 59 – P. 169-178.
5. Goryslavets S. Genetic diversity of ancient grape cultivars of the Crimea region / S. Goryslavets, R. Vacilieri, V. Risovannaya et al. // *Vitis (Special issue).* – 2015. – Vol. 54 – P. 37-41.
6. Ильницкая, Е.Т. Фингерпринтинг аборигенных дагестанских сортов винограда по данным микросателлитного анализа / Е.Т. Ильницкая, С.В. Токмаков, И.И. Супрун // *Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс].* – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2015. – №31 (01). – С. 13-20. – Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/pdf/15/01/02.pdf>
7. Minafra A. Sensitive detection of grapevine virus A, B, or leafroll-associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification/ A. Minafra, A. Hadidi // *Journal of Virological Methods.* – 1994. – V. 47. – P. 175-188.
8. Рисованная, В.И. Тестирование латентной стадии фитоплазменной инфекции винограда / В.И. Рисованная, С.М. Гориславец, В.А. Володин // *Виноградарство и виноделие.* – 2013. – № 4. – С. 6-8.
9. Transactions of the first meeting of the ECP/GR Working Group on *Vitis* 12-14 June, Palic, Serbia and Montenegro. – 2003. – 34p.
10. Методика генотипирования, идентификации и регистрации генотипов винограда с помощью анализа микросателлитных локусов (SSR-PCR) / РД 00384830-064 – 2010. – 21 с.
11. Rott M. E. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR) and modification of an RNA extraction protocol / M.E. Rott and W. Jelkman // *Eur. J. Plant Pathol.* – 2001. – V. 107. – P. 411-420.