

УДК 575.113: 575.222: 634.8

АПРОБАЦИЯ ДНК-МАРКЕРА СЦЕПЛЕННОГО С ГЕНОМ *Rcg1***Ильницкая Е.Т., канд. биол. наук, Токмаков С.В., канд. биол. наук,
Макаркина М.В., аспирант***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский
федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия»
(Краснодар)*

Реферат. Проведена апробация ДНК-маркера UDV015, сцепленного с геном *Rcg1*, который, согласно литературным источникам, определяет устойчивость генотипов винограда *V. amurensis* к бактериальному раку.

Ключевые слова: бактериальный рак, виноград, ген *Rcg1*, UDV015, ПЦР, устойчивость

Summary. Approbation of the DNA-marker UDV015 linked to the gene *Rcg1*, which, according to literature sources, determines the resistance of *V. amurensis* grapevines genotypes to crown gall was done.

Key words: crown gall, grapevine, gene *Rcg1*, UDV015, PCR, resistance

Введение. Бактериальный рак – хроническое заболеваний виноградной лозы, проявляющееся в неконтролируемом росте опухолей на растении винограда, является одним из наиболее экономически значимых заболеваний в умеренной климатической зоне виноградарства. Основным возбудителем бактериального рака винограда являются агробактерии (*Agrobacterium vitis*, *Agrobacterium tumefaciens*). На винограде виды *Agrobacterium* представлены как вирулентными, так и авирулентными штаммами, единственным и достоверным различием которых является способность вызывать опухолеобразование. После заражения бактерия может длительное время существовать в сосудах растения без проявления внешних симптомов. Для индукции опухоли необходимо сочетание ряда условий: наличие раны, вирулентного штамма, благоприятных условий внешней среды, наиболее важными из которых являются температура и влажность [1]. Все органы инфицированного растения и при бессимптомном протекании заболевания являются источником инфекции, и вегетативное размножение таких кустов способствует распространению заболевания. В Краснодарском крае в последние годы отмечается прогрессирование данного заболевания [2].

Сорта *Vitis vinifera* высоко восприимчивы к многим вирулентным штаммам *Agrobacterium* и опухолеобразованию; при этом дикие виды *Vitis*, такие как *V. labrusca* и *V. amurensis* имеют устойчивые генотипы [3]. Изучение молекулярно-генетической основы этой естественной устойчивости очень важный вопрос как в прикладном, так и в теоретическом аспекте. Выявление доноров устойчивости и, далее, создание сортов винограда с низкой восприимчивостью к бактериальному раку является актуальной задачей.

Так, Г.Н. Ключниковой было теоретически обосновано и экспериментально доказано генетическое наследование сортами винограда устойчивости и восприимчивости к заболеванию; работы проводились в Краснодарском крае в условиях естественного заражения [4]. На примере сортов винограда Дунавски лазур, Бианка, Первенец Магарача, Подарок Магарача, Медина, Зала дендь, XXI-17-46, Данко, имеющих в качестве исходных форм (преимущественно материнской) сорта Виллар блан, Виллар нуар и Ркацителли, было показано, что повышенная устойчивость к бактериальному раку наследуется. В насаждениях этих сортов после 15-го сезона вегетации практически не обнаруживались признаки заболевания (0-5 % больных кустов) в отличие от рядом расположенных, более поврежденных насаждений других сортов (40-88 %).

Несколько десятилетий назад устойчивость к бактериальному раку из *V. amurensis* посредством межвидовых скрещиваний была введена в *V. vinifera*. Изучение потомства показало наследование устойчивости как единичного доминантного Менделевского признака [5, 6].

Развитие методов молекулярной генетики перевело изучение устойчивости к бактериальному раку на иной уровень. Так в настоящее время картирован ген *Rcg1*, определяющий устойчивость генотипов винограда *V. amurensis* к ряду патогенных штаммов агробактерий [7]. Ген был определен в сорте Кунбарат ((*V. vinifera* x *V. amurensis*) x Италия).

В этой же работе авторами были определены сцепленные ДНК-маркеры к данному гену: UDV015 и 9M3-3. ДНК-маркер 9M3-3 был разработан авторами, открывшими ген *Rcg1* как доминантный, то есть целевой продукт отжигается лишь на ДНК генотипов, обладающих аллелью гена, определяющих устойчивость к поражению бактериальным раком. ДНК-маркер UDV015 относится к классу микросателлитных маркеров, следовательно, имеет кодоминантную природу, и ПЦР-продукт будет синтезироваться как на «устойчивой» аллели, так и на образцах с «неустойчивой» аллелью гена.

Так как устойчивость унаследована от амурского винограда, то вполне возможно, что аллель гена *Rcg1*, определяющая устойчивость к бактериальному раку, может быть обнаружена и в других сортах и формах, имеющих в своём генотипе родительскую генплазму *V. amurensis*.

Целью представляемой работы являлась апробация ДНК-маркера UDV015, сцепленного с геном *Rcg1*, определяющим устойчивость растений винограда к бактериальному раку, на генотипах винограда с потенциальной возможностью выявления в них данного гена.

Объекты и методы исследований. В Российской ампелографической коллекции отсутствует сорт Кунбарат (созданный на основе *V. amurensis*), в генотипе которого был картирован ген *Rcg1*, однако есть формы дикого амурского винограда. Формы дикорастущего амурского винограда и сорта, имеющие в родословной амурскую генплазму, были включены в исследование как потенциальные носители гена *Rcg1*.

Нами проведена апробация маркера UDV015 с использованием ДНК семи диких форм амурского винограда, сохраняющихся в ампелоколлекции, и сортов, имеющих в своей родословной *V. amurensis* (Денисовский, Заря Севера, Коринка русская, Краса Севера, Лоза горянки, Муромец, Цветочный). Так сорт Заря Севера (Сеянец Маленгра x амурский дикий) является прямым потомком *V. amurensis*. Коринка русская выделена в популяции скрещивания сортов Заря Севера (Сеянец Маленгра x амурский дикий) и Кишмиш черный. Сорт Краса Севера также является потомком *V. amurensis* через сорт Заря Севера: Заря Севера (Сеянец Маленгра x амурский виноград) x Тайфи розовый. Сорт винограда Лоза горянки имеет более сложную родословную: Мускат устойчивый (Заря Севера (Сеянец Маленгра x амурский дикий) x Наири) x Джанджал кара. Сорт Муромец создан при гибридизации сортов Северный (Сеянец Маленгра x амурский дикий) и Победа. Сорта Денисовский и Цветочный получены при опылении сорта Северный (Сеянец Маленгра x амурский дикий) смесью пыльцы мускатных сортов. Таким образом, если предположить, что сорта Заря Севера и Северный могли унаследовать ген *Rcg1* от дикого амурского винограда, как генотипы F1 от *V. amurensis*, устойчивая аллель могла быть унаследована и кем-то из их потомков. Однако, среди изучаемых сортов нет близкородственных форм или потомков сорта Кунбарат, в генотипе которого был идентифицирован ген.

ДНК выделяли методом ЦТАБ из молодых листьев апикальной части побегов 2-5 кустов изучаемых форм [8]. Образцы ДНК анализировали методом ПЦР с разделением продуктов реакции методом капиллярного электрофореза на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 3130. 3130 и с использованием программы Gen Mapper 4.1 при анализе размера фрагментов, что позволяет получать высокоточные данные и соответствует современным мировым требованиям в области генетических исследований.

Аmplификацию осуществляли на приборе Eppendorf Mastercycler gradient (Германия) по следующей схеме: 5 минут при 94 °С – начальная денатурации, далее 35 циклов: 20 секунд – денатурации при 94 °С, 30 секунд – отжиг праймеров при 55 °С, 30 секунд – синтез при 72 °С; финальная элонгация – 4 минуты при 72 °С.

Последовательность нуклеотидов праймерных пар ДНК-маркера взята из литературного источника [7]. В работе использовали обратный праймер с флуорисцентной меткой Rox (ООО «Бигль», Санкт-Петербург, Россия) для возможности детекции ПЦР-продукта на автоматическом генетическом анализаторе. Исследования выполнены на оборудовании ЦКП «Геномные и постгеномные технологии» ФГБНУ СКФНЦСВВ.

Обсуждение результатов. Авторы, определившие сцепление маркера UDV015 с геном *Rcgl*, указывают, что с аллелью гена, определяющего устойчивость к бактериальному раку, коррелирует размер ПЦР-продукта по данному микросателлитному локусу в 300 пар нуклеотидов. Так как у нас отсутствует ДНК сорта Кунбарат и, таким образом, не было возможности использовать в работе положительный контроль, то при анализе данных решили ориентироваться на возможную погрешность в результатах в диапазоне ± 2 пары нуклеотидов. В таблице приведены значения идентифицированных аллелей в изученной выборке. В четырех генотипах из четырнадцати проанализированных определено гомозиготное состояние по исследуемому локусу, в десяти остальных – гетерозиготное.

Идентифицированные аллели микросателлитного локуса UDV015 в проанализированных генотипах винограда

Образец	Размер ПЦР-продукта, пар нуклеотидов	
№1 <i>Vitis amurensis</i>	298,79	
№ 2 <i>Vitis amurensis</i>	284,94	295,12
№ 3 <i>Vitis amurensis</i>	284,95	295,07
№ 4 <i>Vitis amurensis</i>	295,02	300,77
№ 5 <i>Vitis amurensis</i>	290,77	305,03
№ 6 <i>Vitis amurensis</i>	294,85	303,08
№ 7 <i>Vitis amurensis</i>	298,77	
Заря Севера	284,79	298,74
Коринка русская	272,36	284,76
Краса Севера	284,74	290,75
Лоза горянки	276,46	
Муромец	276,48	
Денисовский	274,49	284,80
Цветочный	284,78	286,79

Размер ПЦР-продукта в 300 п.н. был определён только в одном образце дикого амурского винограда (№ 4) из семи проанализированных форм *V. amurensis*. Однако, близкие по размеру к целевому продукту аллели (299 п.н.) были определены еще в двух диких формах

(№ 1, № 7) и в генотипе сорта Заря Севера (Сеянец Маленгра х амурский дикий). Также, возможно, следует обратить внимание на то, что в № 6 *V. amurensis* определен ПЦР-продукт немного большего значения – 303 п.н.

Интересно отметить, что сорта Коринка русская и Краса Севера, являясь прямыми потомками сорта Заря Севера (Сеянец Маленгра х амурский дикий), унаследовали от родительской формы вторую идентифицированную (не целевую) аллель локуса UDV015. Аллель этого же размера определена в сортах Денисовский и Цветочный (потомках первого поколения сорта Северный (Сеянец Маленгра х амурский дикий), а также в двух формах *V. amurensis* (№ 2 и № 3)

Таким образом, на основе полученных данных можно говорить о четырех генотипах, среди которых, возможно, есть те, которые несут аллель гена *Rcg1*, влияющую на формирование устойчивости растений винограда к опухолеобразованию при поражении патогенными агробактериями. Полученные результаты мы рассматриваем как предварительный этап работы по определению генотипов винограда – доноров устойчивости к бактериальному раку. Необходимы расширенные и более детальные молекулярно-генетические исследования с фенотипической оценкой признака.

Выводы. Апробирован ДНК-маркер UDV015, сцепленный с геном *Rcg1*, который, согласно литературным данным, определяет устойчивость растений винограда к бактериальному раку и изначально происходит из генплазмы *V. amurensis*. Работа проведена на генотипах дикого амурского винограда и сортов, имеющих в родословной амурский виноград. ПЦР-продукты, соответствующие по размеру области размера искомого целевого продукта, согласно опубликованным данным, идентифицированы в ДНК 4 образцов: сорт Заря Севера и три формы *V. amurensis* из генофонда Российской ампелографической коллекции (г.Анапа). В проведенном исследовании не было возможности использовать контроль – сорт Кунбарат, в генотипе которого впервые был обнаружен ген *Rcg1*, поэтому полученные результаты являются предварительными.

Литература

1. Бурдинская, В.Ф. Латентная заражённость винограда бактериальным раком / В.Ф. Бурдинская, Н.О. Арестова // Защита и карантин растений. – 2010. – № 10. – С. 38-39.
2. Егоров, Е.А. Научное обеспечение развития виноградарства и виноделия в Российской Федерации: проблемы и пути решения / Е.А. Егоров, Ж.А. Шадрин, Г.А. Кочьян // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. – 2015. – Т. 32, № 2. – С. 22-36. – Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/pdf/15/02/03.pdf>.
3. De Cleene, M. The host range of crown gall / M. De Cleene, J. De Ley // J Bot Rev. – 1976. – Vol. 442. – P. 389-466.
4. Ключникова, Г.Н. Закономерности роста и плодоношения внутривидовых и межвидовых сортов винограда в зоне неукрывной культуры: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук : 06.01.07 / Ключникова Галина Николаевна. – Краснодар, 2002. – 48 с.
5. Szegedi, E. Studies on the inheritance of resistance to crown gall disease of grapevine / E. Szegedi, P. Kozma // Vitis. – 1984. – Vol. 23. – P. 121-126.
6. Szegedi, E. Crown gall resistance in East-Asian Vitis species and their Vitis vinifera hybrids / E. Szegedi, J. Korbuly, I. Koleda // Vitis. – 1984. – Vol. 23. – P. 21-26.
7. Kuczmog, A. Mapping of crown gall resistance locus *Rcg1* in grapevine / Kuczmog A., Galambos A., Horvath S., Martai A., Kozma P., Szegedi E., Putnoky P. // Theor Appl Genet. – 2012. – Vol. 125 (7). – P. 1565-1574.
8. 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. – Vol. 19, № 1. – P. 69-76.