

## ДНК-МАРКЕРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКУСА *Rcgl* В ГЕНОТИПАХ ВИНОГРАДА

Ильницкая Е.Т., канд. биол. наук, Макаркина М.В., аспирант,  
Токмаков С.В., канд. биол. наук

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

**Реферат.** Проведён анализ генотипов винограда с помощью ДНК-маркеров UDV015 и 9M3-3, сцепленных с геном *Rcgl*. Данный локус определяет устойчивость винограда к бактериальному раку и наследуется от *Vitis amurensis*. Наблюдается некоторое несоответствие данных по результатам двух ДНК-маркерных систем.

**Ключевые слова:** виноград, бактериальный рак, ген *Rcgl*, UDV015, 9M3-3, ПЦР, *V. amurensis*

**Summary.** The analysis of grape genotypes is done using the DNA marker UDV015, linked with the gene *Rcgl*. This locus determines the resistance to crown gall and is inherited from *Vitis amurensis*. There is some discrepancy in the data on the results of the two systems of DNA markers.

**Key words:** grapes, crown gall, gene *Rcgl*, UDV015, 9M3-3, PCR, *V. amurensis*

**Введение.** Бактериальный рак – хроническое заболевание виноградной лозы, проявляющееся в неконтролируемом росте опухолей на растении винограда и является одним из наиболее экономически значимых заболеваний в умеренной климатической зоне виноградарства. Основным возбудителем бактериального рака винограда являются патогенные агробактерии. Сорта *Vitis vinifera* высоко восприимчивы к многим вирулентным штаммам *Agrobacterium* и опухолеобразованию; дикие виды *Vitis*, такие как *V. labrusca* и *V. amurensis*, имеют устойчивые генотипы [1]. Изучение генетической основы этой естественной устойчивости – важный вопрос как в прикладном, так и в теоретическом аспекте.

В Венгрии устойчивость к бактериальному раку от *V. amurensis* была введена в *V. vinifera* путём межвидового скрещивания и было показано, что она наследуется как единичный доминантный Менделевский признак. Этот признак устойчиво наследовали четыре поколения гибридных растений (F1, F2, BC1, BC2) [2].

Использование молекулярно-генетических методов позволило выявить и картировать ген *Rcgl*, определяющий устойчивость генотипов винограда *V. amurensis* к ряду патогенных штаммов агробактерий [3]. Ген был определен в сорте Кунбарат ((*V. vinifera* x *V. amurensis*) x Италия). В процессе работы авторами были определены и ДНК-маркеры к данному гену: UDV015 и 9M3-3. Так как устойчивость унаследована от амурского винограда, то вполне возможно, что аллель гена *Rcgl*, определяющая устойчивость к бактериальному раку, может быть обнаружена в и в других сортах и формах, имеющих в своей родословной *V. amurensis*.

**Объекты и методы исследований.** В Российской ампелографической коллекции отсутствует сорт Кунбарат, однако есть формы дикого амурского винограда. В исследования были включены семь диких форм амурского винограда и сорта – межвидовые гибриды с *V. amurensis*. В анализ были включены также межвидовые формы из генофонда, созданного Шатиловым Ф.И., любезно переданные нам из клуба виноградарей Оренбургской области (ГФ 1-9-2, ГФ 1-9-5, ГФ 2-1-5, ГФ 2-2-8, Памяти Домбковской, Подарок Шатилову) [4].

ДНК-маркер UDV015 относится к классу микросателлитных маркеров, имеет кодоминантную природу. По этой причине изучение ДНК-маркерных систем к гену *Rcg1* было решено начинать именно с данного маркера: так как есть возможность определить как «устойчивую», так и «неустойчивую» аллель. Авторы, определившие сцепление данного микросателлитного маркера с геном *Rcg1*, указывают, что с аллелью гена, определяющей устойчивость к бактериальному раку, коррелирует размер продукта в 300 пар нуклеотидов, в неустойчивых генотипах обнаруживали фрагмент в 280 п.н.

Программу полимеразной цепной реакции для UDV015 проводили по следующей схеме: 5 минут при 95 °С – начальная денатурация, далее 35 циклов: 10 секунд денатурации при 95 °С, 30 секунд отжиг праймеров при 55 °С, 30 секунд синтез при 72 °С; последний цикл синтеза – 4 минуты при 72 °С. Амплификацию ДНК осуществляли в амплификаторе Eppendorf Mastercycler gradient (Германия). Разделение и анализ продуктов реакции – на автоматическом генетическом анализаторе. Последовательность нуклеотидов праймерных пар ДНК-маркера взята из литературного источника [3].

В работе использовали обратный праймер маркера UDV015 с флуорисцентной меткой Rox (ООО «Бигль», Санкт-Петербург, Россия) для возможности детекции ПЦР-продукта на автоматическом генетическом анализаторе.

ДНК-маркер 9МЗ-3 был разработан авторами как доминантный, то есть целевой продукт отжигается лишь на ДНК генотипов, обладающих аллелью гена, определяющих устойчивость к поражению бактериальным раком. У нас в наличии нет положительного контроля – ДНК сорта Кунбарат, на основе которого и был разработан 9МЗ-3. Известно из литературы, что целевой ПЦР-фрагмент имеет вес в 500 пар нуклеотидов.

ПЦР с маркером 9МЗ-3 проводили с использованием прибора «Герцик» («ДНК-технология», Москва, Россия) при условиях: 5 мин при 94 °С, последующие 40 циклов: 18 секунд при 94 °С, 40 секунд отжиг праймеров при 55 °С, 60 секунд – синтез продукта при 72 °С, финальные 4 минуты – 72 °С. Разделение продуктов реакции – электрофорез в 2 % агарозном геле. Исследования выполнены на оборудовании ЦКП «Геномные и пост-геномные технологии» ФГБНУ СКФНЦСВВ.

**Обсуждение результатов.** Формы дикорастущего амурского винограда и сорта, имеющие в родословной *V. amurensis*, были включены в исследование как потенциальные носители гена *Rcg1*. Согласно опубликованным данным, с аллелью гена *Rcg1*, определяющей устойчивость к бактериальному раку, коррелирует размер ПЦР-продукта в 300 пар нуклеотидов. По причине отсутствия ДНК сорта Кунбарат и, таким образом, возможности использовать в работе положительный контроль, при анализе полученных данных было принято решение ориентироваться на возможную погрешность в результатах и рассматривать полученные значения с возможной коррекцией истинных значений в диапазоне  $\pm 2$  пары нуклеотидов.

В таблице приведены выявленные значения ПЦР-фрагментов, близкие к целевому диапазону, согласно литературным данным. Значения размеров ПЦР-продуктов нецелевого диапазона не приведены. По приведённым данным наиболее близкие значения к искомому целевому продукту обнаружены в диких амурских формах № 1, 4, 7, Заря Севера, Веста. Также достаточно близкие значения к целевому фрагменту обнаружены при анализе ДНК сорта Буйтур, в дикой амурской форме № 6.

Для анализа маркером 9МЗ-3 на первом этапе в работу взяли ДНК сортов Заря Севера, Буйтур, Агат донской, Восторг, Веста и Кунлеань, а также три формы амурского дикого винограда (№1, №4 и №7), сохраняемых на Анапской ампелографической коллекции. Указанные генотипы амурского винограда, а также сорта Заря Севера, Буйтур и Веста включены в исследование как возможные носители гена, согласно данным ПЦР-анализа с ДНК-маркером UDV015 (см. табл.).

Результаты ДНК-анализа генотипов винограда  
с микросателлитным маркером UDV015

Образец	Происхождение	Размер ПЦР-продукта, пары нуклеотидов	
		3	4
1	2	3	4
№ 1 амурский дикий	<i>V. amurensis</i>	<b>298,8</b>	
№ 2 амурский дикий	<i>V. amurensis</i>	284,9	295,1
№ 3 амурский дикий	<i>V. amurensis</i>	284,9	295,1
№ 4 амурский дикий	<i>V. amurensis</i>	295,0	<b>300,7</b>
№ 5 амурский дикий	<i>V. amurensis</i>	290,8	305,0
№ 6 амурский дикий	<i>V. amurensis</i>	294,9	303,1
№ 7 амурский дикий	<i>V. amurensis</i>	<b>298,8</b>	
Буйтур	<i>V. riparia</i> x <i>V. amurensis</i>	284,9	304,6
Заря Севера	Сеянец Маленгра x <i>V. amurensis</i>	284,8	<b>298,7</b>
Коринка русская	Заря Севера x Кишмиш черный	272,6	284,8
Краса Севера	Заря Севера x Тайфи розовый	284,7	290,8
Лоза горянки	Мускат устойчивый (Заря Севера x Наири) x Джанджал кара	276,5	
Веста	(Августа x <i>V. amurensis</i> ) x (Кентавр магарачский x Лвокумский)	284,7	<b>298,8</b>
Степняк	(Гетш x <i>V. amurensis</i> ) x Сибирьковский	271,9	290,4
Агат донской	(Заря Севера x Долорес) x Русский ранний ((Шасла северная (Северный (Сеянец Маленгра x <i>V. amurensis</i> ) x Шасла розовая) x Мичуринец ( <i>V. vinifera</i> x <i>V. amurensis</i> )))	284,5	
Дружба	Мискет кайлышки x (Заря Севера x Мускат гамбургский)	286,5	292,7
Сеянец Маленгра	Свободное опыление сорта Маленгр ранний		290,9
Памяти Домбковской	Заря Севера x Кишмиш уникальный (Северный x Кишмиш черный)		290,9

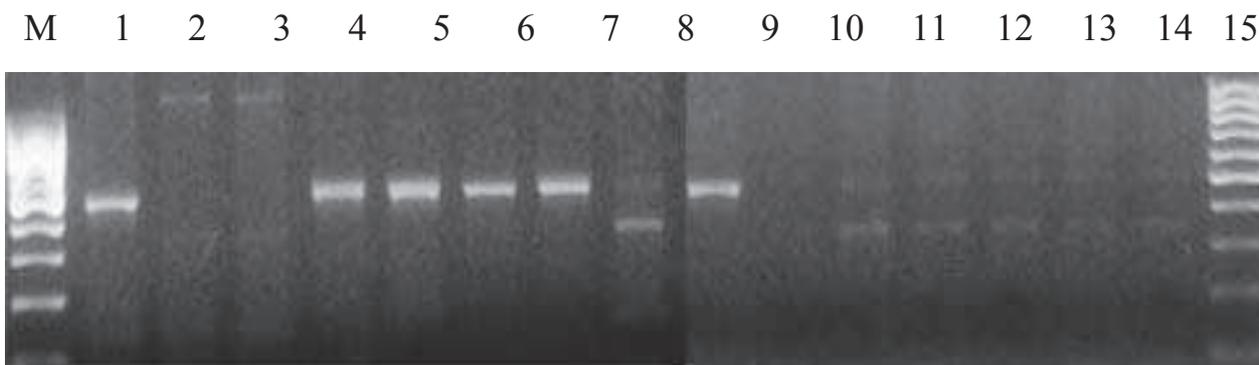
Продолжение таблицы		
1	2	
Восторг	(Заря Севера х Долорес) х Русский ранний ((Шасла северная (Северный (Сеянец Маленгра х <i>V. amurensis</i> ) х Шасла розовая) х Мичуринец ( <i>V. vinifera</i> х <i>V. amurensis</i> )))	Нецелевые фрагменты в диапазоне 169-197
Кунлеань	(( <i>V. vinifera</i> х <i>V. amurensis</i> ) х Карабурну)	
Лусакерт	<i>V. vinifera</i> х <i>V. amurensis</i>	
Подарок Шатилову	Родина (Северный х Мускат александрийский) х Мускат отличный	
ГФ 1-9-2	Гибридная форма, потомство дикого <i>V. amurensis</i>	
ГФ 1-9-5	Гибридная форма, потомство амурского дикого винограда	
ГФ 2-1-5	ГФ 13-1-1 х Ранний Магарача (Мадлен Анжевин х Кишмиш черный)	
ГФ 2-2-8	Амурский обоеполый № 6 х Кодрянка	

ПЦР-фрагмент размером 500 пар нуклеотидов, согласно литературным данным, коррелирует с наличием гена *Rcg1* в генотипах винограда. Апробация ДНК-маркера 9М3-3 на указанных генотипах дала неоднозначные результаты [5].

Для уточнения полученных данных нами в анализ были включены все 7 образцов дикого амурского винограда *V. amurensis*, проанализированных маркером UDV015, из генофонда, сохраняемого на Анапской ампелографической коллекции, сорта и формы – межвидовые гибриды различного происхождения, в родословной которых присутствует *V. amurensis* (Муромец, Лусакерт, Памяти Домбковской, три формы из генофонда, созданного Ф.И. Шатиловым) и сорта *V. vinifera* Каберне-Совиньон и Шардоне как отрицательные контроли. В результате проведённого нами ПЦР-анализа были получены целевые фрагменты (рис.).

Положительный результат дали ДНК-пробы пяти из семи анализируемых диких форм *V. amurensis*. Также целевой фрагмент обнаружен при анализе одной из трёх форм, созданных Ф.И. Шатиловым с использованием дикорастущего *V. amurensis*. Отрицательные контроли (Шардоне, Каберне-Совиньон) не дали ПЦР-фрагменты, как и сорта Памяти Домбковской и Лусакерт.

На основе полученных данных по ДНК-анализу с маркером 9М3-3 можно предположить, что ген устойчивости несут сорта Буйтур и Веста [5], а также пять диких амурских форм и гибридная форма с *V. amurensis* из коллекции Ф.И. Шатилова. Однако данные не полностью коррелируют с результатами, полученными при анализе генотипов с маркером UDV015.



М – маркер молекулярного веса, 1-7 – образцы *V. amurensis*, 8 – Муромец, 9-11 – гибридные формы с генотипом *V. amurensis*, 12 - Лусакерт, 13 – Памяти Домбковской, 14 – Шардоне, 15 – Каберне-Совиньон.

Рис. Результаты ПЦР-анализа с маркером 9М3-3

**Выводы.** Апробированы ДНК-маркеры UDV015 и 9М3-3, сцепленные с геном *Rcg1*, который, согласно литературным данным, определяет устойчивость растений винограда к бактериальному раку и изначально происходит из генплазмы *V. amurensis*.

В процессе проводимых исследований получены целевые фрагменты. Однако, в целом, наблюдается несоответствие полученных данных с использованием двух ДНК-маркерных систем; приводимые результаты требуют уточнения и дальнейших исследований. Необходимы расширенные и более детальные молекулярно-генетические исследования с фенотипической оценкой признака.

### Литература

1. De Cleene M., De Ley J. The host range of crown gall // J Bot Rev. – 1976. – Vol. 442. – P. 389–466.
2. Szegedi E., Kozma P. Studies on the inheritance of resistance to crown gall disease of grapevine // Vitis. – 1984. – Vol. 23. – Pp. 121-126
3. Kuczmog A., Galambos A., Horvath S. et al. Mapping of crown gall resistance locus *Rcg1* in grapevine // Theor Appl Genet. – 2012. – Vol. 125, No. 7. – P. 1565–1574.
4. Немытов А. Ю. Виноград Шатилова. Челябинск: НПО «Сады России»: Челябинский дом печати, 2016. 96 с.
5. Ильницкая Е.Т., Макаркина М.В., Токмаков С.В. Определение гена винограда *Rcg1* по данным ДНК-маркерного анализа // Научные труды СКФНЦСВВ. Т. 15. Краснодар, СКФНЦСВВ, 2018. С. 35-38.
6. Макаркина М. В., Ильницкая Е. Т. К вопросу о проблеме бактериального рака на виноградниках [Электронный ресурс] // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2014. № 29(5). С. 149–159. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/14/05/14.pdf>. (дата обращения: 23.04.2019).
7. Петров В. С., Талаш А. И. Слабовосприимчивые к бактериальному раку сорта винограда [Электронный ресурс] // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2010. № 3(2). С. 97–105. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/10/02/12.pdf>. (дата обращения: 23.04.2019).