УДК: 634.8.06: 575.11

**АПРОБАЦИЯ ДНК-МАРКЕРА ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ**

**ВИНОГРАДНОГО РАСТЕНИЯ К МИЛДЬЮ *RPV*10[[1]](#footnote-1)\***

**APPROBATION OF DNA-MARKER**

**FOR MILDEW RESISTANCE GRAPEVINE GENE *RPV10***

|  |  |
| --- | --- |
| *Е.Т. Ильницкая, М.В. Макаркина,* *С.В. Токмаков*  | *E.T. Ilnitskaya, M.V. Makarkina,* *S.V. Tokmakov* |
| ФГБНУ Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства, kubansad@kubannet.ru, Краснодар, Россия | North-Caucasian Zonal Research Institute of Horticulture and Viticulture, kubansad@kubannet.ru, Krasnodar, Russia |
| **Аннотация**. Милдью – одно из наиболее распространенных заболеваний виноградной лозы. Поиск доноров устойчивости – важный этап в селекции сортов винограда с высоким уровнем устойчивости к данному заболеванию. В настоящее время в мировых исследовательских центрах идентифицированы гены устойчивости к милдью и ряд сцепленных с ними ДНК-маркеров. Нами апробирован ДНК-маркер гена устойчивости *Rpv*10 на ДНК семи генотипов, по предварительным данным аллель устойчивости определена в сорте Кристалл. | **Summary.** Downy mildew is one of the most prevalent diseases of the grapevine. Searching of sustainability donors of resistance is an important stage in the breeding of grape cultivars with high levels of resistance to the disease. Currently, international research centers identified downy mildew resistance genes and the number of linked DNA markers. We tested the DNA-marker for *Rpv10* resistance gene on the DNA of the seven genotypes, according to preliminary data the resistance allele is identified in Crystal cultivar. |
| **Ключевые слова**: виноград, ДНК-маркеры, устойчивость к милдью, *Rpv10*. | **Keywords:** grapevine, DNA-markers, downy mildew resistance, *Rpv10* |

**Введение.** Потери урожая винограда от болезней в мировой практике составляют не менее 30 %, а в условиях России в отдельные годы – 50 % и более [1]. Милдью – одно из самых распространенных и вредоносных грибных заболеваний виноградной лозы, вызывается биотрофным оомицетом *Plasmopara viticola* Berl. Et de Toni*.* Узкоспециализированный патоген поражает только виноград: развивается на всех зеленых органах виноградной лозы – листьях, побегах, соцветиях, ягодах, усиках.

Одним из наиболее эффективных способов контроля распространения заболеваний является возделывание устойчивых сортов, что позволяет сократить количество пестицидных обработок, улучшить экологию ампелоценоза и повысить рентабельность производства.

Европейские сорта винограда *V. vinifera*, являясь основой современного высококачественного сортимента, практически не обладают устойчивостью к милдью. Считается, что устойчивость к патогену развилась одновременно с патогеном, который является эндемиком Северной Америки. Таким образом североамериканские виды винограда являются источниками устойчивости к милдью. Также некоторые ученые предполагают, что устойчивость к *P. viticola* могла развиться у некоторых форм вида *V. amurensis* как результат эволюции устойчивости к *P. cissii* и *P. amurensis*, которые являются эндемиками Азии [2]. Программы селекции направлены на объединение устойчивости к патогенам с качеством продукции в одном генотипе.

Процесс создания новых форм базируется на использовании генетического разнообразия культуры, а успех селекционных работ во многом определяется уровнем познания накопленного генофонда. Поиск генотипов, обладающих устойчивостью к инфекции, является актуальной задачей селекции. Генетические маркеры играют исключительно важную роль в изучении наследственной конституции организма и особенно в оценке исходного и селекционного материала, поскольку облегчают контроль за включением желаемых признаков от родительских форм в создаваемые гибриды. Использование маркерных систем на основе полиморфных последовательностей нуклеотидов в молекуле ДНК, позволяет оценить генетический полиморфизм не на уровне продуктов экспрессии гена, а на уровне генома.

Работами различных исследовательских коллективов был определен и картирован ряд генов и локусов количественных признаков виноградного растения, определяющих устойчивость к грибным патогенам, а также разработаны ДНК-маркеры для идентифицированных генов [3]. В настоящее время известно пятнадцать локусов устойчивости к милдью в геноме винограда: *Rpv1*-*Rpv15* [4].

**Объекты и методы исследований.** При исследовании толерантности к милдью F. Schwander и др. в генотипах нескольких сортов был выявлен локус устойчивости *Rpv*10 на 9 хромосоме, который определял до 50 % наблюдаемой фенотипической изменчивости, унаследован данный локус от *V. amurensis* [5]*.*

В этой же работе идентифицирован ДНК-маркер GF09-46, сцепленный с данным локусом. Авторами маркер GF09-46 предложен как перспективный для проведения маркерной селекции гена *Rpv*10, что особо ценно при объединении нескольких генов устойчивости в одном генотипе. Впервые идентифицирован *Rpv*10 в сорте Солярис, в родословной которого присутствует сорт Северный – гибрид от дикого амурского винограда [5]*.*

Указанный маркер апробирован нами на выборке из семи генотипов, имеющих в своём происхождении *V. amurensis*, произрастающих на Ампелографической коллекции (г. Анапа) и характеризующихся повышенной устойчивостью к милдью: Лоза горянки, Краса Севера, Коринка русская, Муромец, Кристалл, Владимир, Тана 85.

Образцы ДНК выделяли методом ЦТАБ из молодых побегов растений [6]. Информация о последовательности праймеров маркера GF09-46 доступна в литературном источнике. Полимеразную цепную реакцию проводили в 25 мкл реакционной смеси с использованием реактивов фирмы "СибЭнзим" (Новосибирск, Россия) и прибора Терцик («ДНК-Технология», Москва, Россия), условия амплификации были подобраны согласно опубликованным данным [5]*.* Разделение продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 8 % полиакриламидном геле. Визуализировали амплифицированные фрагменты в УФ-свете с предварительным вымачиванием гелевой пластины в растворе бромистого этидиума. Расчет размера ПЦР-продуктов осуществляли с помощью программы Gel-Pro Analyser 3.1.

**Обсуждение результатов.** Проведенный ПЦР-анализ дал положительный результат – были получены амплифицированные фрагменты, соответствующие диапазону размеров целевого продукта (рис.).

Согласно литературным данным, наличие резистентной аллели локуса Rpv10 соответствует амплифицированному фрагменту маркера GF09-46 размером 416 пар нуклеотидов. Данная аллель наследуется от V. amurensis. Так в сорте Солярис с помощью маркера GF09-46 идентифицированы аллели размером 416 и 425 пар нуклеотидов [5].

У сорта Владимир и элитной формы Тана 85, одной из родительских форм является сорт Саперави северный (Северный × Саперави), у сорта Муромец – сорт Северный, который получен от скрещивания с V. amurensis. Лоза горянки, Краса Севера и Коринка русская созданы с участием сорта Заря Севера, который также выделен из гибридной популяции от амурского винограда. Сорт Кристалл – сложный межвидовой гибрид: (V. amurensis × Чалоци Лайош) × Виллар Блан (Сейв Виллар 12-375).

М 1 2 3 4 5 6 7



4164

434

**Рис. Результаты разделения продуктов ПЦР с маркером GF09-46**

**Обозначения: М – маркер молекулярного веса, 1 – Тана85, 2 - Владимир, 3 - Краса Севера, 4 – Коринка русская, 5 – Муромец, 6 – Лоза горянки, 7 – Кристалл**

По полученным нами результатам аллель размером 416 пар нуклеотидов присутствует в генотипе сорта Кристалл. На настоящем этапе работы данные о наличии в генотипе сорта Кристалл устойчивой аллели гена *Rpv*10 являются предварительными и требуют уточнения. Однако, следует отметить, что в проводимых исследованиях F. Schwander и др. в сорте Заря Севера не была выявлена резистентная аллель гена *Rpv*10, что совпадает с полученными нами результатами на ДНК сортов Лоза горянки, Краса Севера и Коринка русская – потомков сорта Заря Севера, устойчивость данного сорта к милдью обуславливается иными локусами устойчивости, унаследованными от амурского винограда, которые могут присутствовать и в сортах, созданных с использованием этого сорта [5].

**Выводы.** Апробирован маркер GF09-46, сцепленный с геном *Rpv*10, который участвует в формировании устойчивости виноградного растения к милдью и берёт своё начало из *V. amurensis.* Получены целевые продукты, что говорит о воспроизводимости работы ДНК-маркера на разном генетическом материале. По предварительным данным, аллель *Rpv*10, определяющая устойчивость, выявлена в сорте Кристалл: подсчет размера амплифицированных фрагментов после проведения ПЦР с маркером GF09-46 определил фрагмент размером 416 пар нуклеотидов в ДНК сорта Кристалл, что, согласно результатам опубликованных исследований, соответствует размеру резистентной аллели гена *Rpv*10. Работы в данном направлении будут продолжены.

Литература

1. Петров, В.С. Устойчивость сортов винограда к вредным организмам / В.С. Петров, А.И. Талаш. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2010. – 45 с.

2. Riaz, S. Using a limited mapping strategy to identify major QTLs for resistance to grapevine powdery mildew (Erysiphenecator) and their use in marker-assisted breeding / S Riaz, A.C. Tenscher, D.W. Ramming, M.A. Walker // Theoretical and Applied Genetics. – 2011. – V.122, № 6. – P. 1059-1073.

3. Ильницкая, Е.Т. Применение ДНК-маркеров в современных селекционно-генетических исследованиях винограда / Е.Т. Ильницкая, М.В. Макаркина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – Новосибирск, 2016. – T.20. – №4. – С. 528-536.

4. International Variety Catalogue VIVC // Julius Kuhn-Institut. – URL: <http://www.vivc.de/index.php?r=dbsearch%2Fdataonbreeding>.

5. Schwander, F. Rpv10: a new locus from the Asian Vitis gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine / F. Schwander, R. Eibach, I. Fechter, L. Hausmann, E. Zyprian, R. Töpfer // Theoretical and Applied Genetics. – 2012. – V.124, №1. – P. 163-176.

6. 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. – V. 19, № 1. – P. 69-76.

1. \* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Администрации Краснодарского края (грант № 16-44-230314 р\_а). [↑](#footnote-ref-1)