

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНА ВИНОГРАДА *Rcgl* ПО ДАННЫМ ДНК-МАРКЕРНОГО АНАЛИЗА

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

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

**Реферат.** Проведён анализ 18 генотипов винограда с помощью ДНК-маркеров UDV015 и 9M3-3, сцепленных с геном *Rcgl*, который, согласно литературным источникам, определяет устойчивость винограда к бактериальному раку и наследуется от *V. amurensis*. По предварительным данным, 6 генотипов могут обладать данным геном.

**Ключевые слова:** бактериальный рак винограда, ген *Rcgl*, UDV015, 9M3-3, ПЦР

**Summary.** The analysis of 18 genotypes of grapes is done using the DNA markers of UDV015 and 9M3-3, linked with the gene *Rcgl*, which, according to literature, determines the resistance of grapes to crown gall and inherited from *V. amurensis*. According to preliminary data, 6 genotypes can carry this gene.

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

**Введение.** Бактериальный рак винограда – заболевание, вызываемое патогенными штаммами агробактерий видов *Agrobacterium vitis* и *Agrobacterium tumefaciens*, встречается в большинстве районов мира. Зараженные растения могут оставаться без симптомов бактериального рака (опухолевидных наростов) до тех пор, пока не подвергнутся таким стрессам, как морозобоины, обрезка, прививка или другим механическим повреждениям. В процессе образования опухолей сосуды и ткани, которые обычно служат для транспорта воды и продуктов фотосинтеза, становятся сильно деформированными и теряют способность функционировать, что в конечном итоге может привести к гибели виноградного растения [1]. В Краснодарском крае в последние годы отмечается прогрессирование данного заболевания [2]. По данным Управления сельского хозяйства Темрюкского района, к началу 2001 года около 30 % площадей виноградников были заражены бактериальным раком, и эта цифра продолжает ежегодно расти [3].

Сорта культурного винограда *Vitis vinifera* высоко восприимчивы к многим вирулентным штаммам *Agrobacterium* и опухолеобразованию. Среди таких видов *Vitis*, как *V. labrusca* и *V. amurensis*, встречаются устойчивые генотипы [4]. Изучение молекулярно-генетической основы этой естественной устойчивости – очень важный вопрос как в прикладном, так и в теоретическом аспекте.

Выявление доноров устойчивости и создание сортов винограда с низкой восприимчивостью к бактериальному раку является актуальной задачей.

Г.Н. Ключниковой в процессе исследований, проводимых в Краснодарском крае в условиях естественного заражения, было доказано генетическое наследование сортами винограда устойчивости и восприимчивости к заболеванию [5]. Несколько десятилетий назад устойчивость к бактериальному раку посредством межвидовых скрещиваний была введена в *V. vinifera* из *V. amurensis*. Изучение потомства показало наследование устойчивости как единичного доминантного Менделевского признака [6,7].

Развитие методов молекулярной генетики позволяет изучать устойчивость к патогенам на ином уровне. Так, в настоящее время картирован ген *Rcgl*, определяющий устойчивость генотипов винограда *V. amurensis* к бактериальному раку винограда [8].

Впервые ген *Rcg1* был идентифицирован в ДНК сорта Кунбарат ((*V. vinifera* x *V. amurensis*) x Италия). В этой же работе авторами был определен тесно сцепленный микросателлитный маркер к данному гену: UDV015, позволяющий определять различное аллельное состояние гена, и ДНК-маркер доминантной природы 9МЗ-3, который отжигается только на аллеле, определяющей устойчивость к опухолеобразованию. Так как устойчивость унаследована от амурского винограда, то можно предполагать, 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 являлось изучение ПЦР-методом с использованием ДНК-маркеров UDV015 и 9МЗ-3, сцепленных с геном *Rcg1* генотипов винограда, несущих генплазму амурского винограда, согласно их родословным.

**Объекты и методы исследований.** В Российской ампелографической коллекции отсутствует сорт Кунбарат, 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 введены в исследование как возможные носители гена *Rcg1*. В работу были включены 7 диких форм амурского винограда, сохраняющихся в ампелоколлекции, и 11 сортов, имеющих в своей родословной *V. amurensis* (Заря Севера, Буйтур, Кунлеань, Коринка русская, Степняк, Краса Севера, Лоза горянки, Агат донской, Дружба, Веста, Восторг). Сорта Заря Севера и Буйтур – потомки первого поколения от амурского дикого винограда. Другие сорта имеют более сложное происхождение (табл.). Среди изучаемых генотипов присутствует и сорт Кунлеань – наиболее генетически близкая форма сорту Кунбарат, в котором и был идентифицирован ген *Rcg1*.

ДНК выделяли методом ЦТАБ из молодых листьев апикальной части побегов 2-5 кустов изучаемых форм [9]. Образцы ДНК анализировали методом ПЦР с разделением продуктов реакции электрофорезом в агарозном геле (2%) и методом капиллярного электрофореза на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 3130. 3130 и с использованием программы Gen Mapper 4.1 при анализе размера фрагментов.

Аmplификацию с маркером UDV015 осуществляли на приборе Eppendorf Mastercycler gradient (Германия) по следующей схеме: 5 минут при 94 °С – начальная денатурация, далее 35 циклов: 20 секунд денатурации при 94 °С, 30 секунд отжиг праймеров при 55 °С, 30 секунд синтез при 72 °С; финальная элонгация – 72 °С в течение 4 минут.

ПЦР с маркером 9МЗ-3 проводили с использованием прибора «Терцик» («ДНК-технология», Москва, Россия) при условиях – 5 мин при 94 °С; последующие 40 циклов: 18 секунд при 94 °С, 40 секунд отжиг праймеров при 50 °С, 60 секунд – синтез продукта при 72 °С, финальные 4 минуты – 72 °С.

Последовательность нуклеотидов праймерных пар ДНК-маркера взята из литературного источника [8]. В работе использовали обратный праймер маркера UDV015 с флуоресцентной 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 *Rcg1*, указывают, что с аллелью гена, определяющей 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 целевой области в изученной выборке. Следует отметить, что по ряду сортов не было получено ПЦР-продуктов с размерами в искомой области (280-300 пар нуклеотидов), однако были получены ампликоны размером 160-190 пар нуклеотидов (данные не приводятся).

Результаты ПЦР-анализа с маркером UDV015

Образец	Происхождение	Размер ПЦР-продукта, пар нуклеотидов	
№1 амурский дикий	<i>V. amurensis</i>	<b>298,79</b>	
№ 2 амурский дикий	<i>V. amurensis</i>	284,94	295,12
№ 3 амурский дикий	<i>V. amurensis</i>	284,95	295,07
№ 4 амурский дикий	<i>V. amurensis</i>	295,02	<b>300,77</b>
№ 5 амурский дикий	<i>V. amurensis</i>	290,77	305,03
№ 6 амурский дикий	<i>V. amurensis</i>	294,85	303,08
№ 7 амурский дикий	<i>V. amurensis</i>	<b>298,77</b>	
Буйтур	<i>V. riparia</i> x <i>V. amurensis</i>	284,48	304,58
Заря Севера	Сеянец Маленгра x <i>V. amurensis</i>	284,79	<b>298,74</b>
Кунлеань	( <i>V. vinifera</i> x <i>V. amurensis</i> ) x Карабурну		
Коринка русская	Заря Севера (Сеянец Маленгра x <i>V. amurensis</i> ) x Кишмиш черный	272,36	284,76
Краса Севера	Заря Севера (Сеянец Маленгра x <i>V. amurensis</i> ) x Тайфи розовый	284,74	290,75
Лоза горянки	Мускат устойчивый (Заря Севера (Сеянец Маленгра x <i>V. amurensis</i> ) x Наири) x Джанджал кара	276,46	
Веста	(Августа x <i>V. amurensis</i> ) x (Кентавр магарачский x Легокумский)	284,69	<b>298,81</b>
Агат донской	(Заря Севера (Сеянец Маленгра x <i>V. amurensis</i> ) 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> )))	284,46	
Дружба	Мискет кайлышки x (Заря Севера (Сеянец Маленгра x <i>V. amurensis</i> ) x Мускат гамбургский)	286,5	292,69
Восторг	(Заря Севера (Сеянец Маленгра x <i>V. amurensis</i> ) 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> )))		
Степняк	(Гетш x <i>V. amurensis</i> ) x Сибирьковский	271,9	290,41

Так, 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 сортов Заря Севера и Веста (см. табл).

Для анализа маркером 9М3-3 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). ПЦР-фрагмент размером 500 пар нуклеотидов, согласно литературным данным, коррелирует с наличием гена *Rcg1* в генотипах винограда. Данный целевой фрагмент получен нами в шести образцах (рис.).

Полученные результаты по маркеру 9М3-3 не полностью соответствуют данным, полученными при анализе ДНК с маркером UDV015. Таким образом, приводимые результаты требуют уточнения и дальнейших исследований. На основе полученных данных по ДНК-анализу с маркером 9М3-3 можно говорить о шести генотипах, среди которых, возможно, есть те, которые несут аллель гена *Rcg1*, влияющую на формирование устойчивости растений винограда к опухолообразованию при поражении патогенными агробактериями.

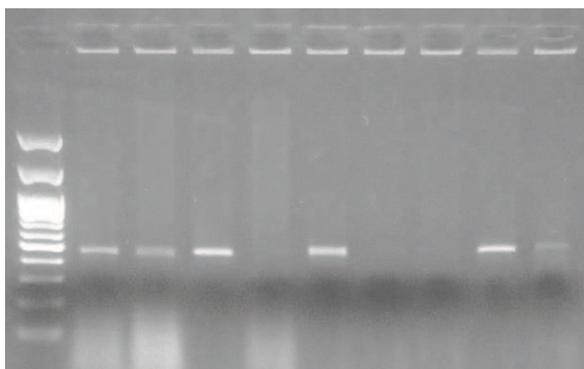


Рис. Результаты ПЦР-анализа с маркером 9М3-3

Примечание: слева направо – Маркер молекулярного веса, №1 амурский дикий, №4 амурский дикий, №7 амурский дикий, Заря Севера, Буйтур, Агат донской, Восторг, Веста, Кунлеань

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.

**Заключение.** 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*. Работа проведена на генотипах дикого амурского винограда из генофонда Российской ампелографической коллекции (г. Анапа) и сортов, имеющих в родословной амурский виноград. По данным ПЦР-анализа как возможные носители гена выделены 6 генотипов. В проведенном исследовании не было возможности использовать контроль – сорт Кунбарат, в генотипе которого впервые был обнаружен ген *Rcg1*. Таким образом, полученные нами данные являются предварительными.

#### Литература

1. Kuczmog, A. Mapping of Agrobacterium resistance in grapevine / A. Kuczmog // PhD thesis. – 2012. – 10 p.
2. Егоров, Е.А. Научное обеспечение развития виноградарства и виноделия в Российской Федерации: проблемы и пути решения / Е.А. Егоров, Ж.А. Шадрина, Г.А. Кочьян // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. – 2015. – № 32(2). – С. 22-36. – Режим доступа: <http://journalkubansad.ru/pdf/15/02/03.pdf>.
3. Егоров, Е.А. Адаптивный потенциал винограда в условиях стрессовых температур зимнего периода: Методические рекомендации / Е.А. Егоров, К.А. Серпуховитина, В.С. Петров [и др.] – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2006. – 156 с.
4. De Cleene, M. The host range of crown gall / M. De Cleene, J. De Ley // J Bot Rev. – 1976. – Vol. 442. – P. 389-466.
5. Ключникова, Г.Н. Закономерности роста и плодоношения внутривидовых и межвидовых сортов винограда в зоне неукрывной культуры: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук : 06.01.07 / Ключникова Галина Николаевна. – Краснодар, 2002. – 48 с.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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