

УДК 575.11: 634.8.09

DOI: 10.30679 / 2219-5335-2018-2-50-24-31

**ДНК-МАРКЕРНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ  
ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ  
К МИЛДЬЮ В НОВЫХ СОРТАХ  
И ОТБОРНЫХ ФОРМАХ  
ВИНОГРАДА СЕЛЕКЦИИ  
СКФНЦСВВ \***

Ильницкая Елена Тарасовна  
канд. биол. наук  
зав. лабораторией сортоизучения  
и селекции винограда

Токмаков Сергей Вячеславович  
канд. биол. наук  
научный сотрудник  
лаборатории генетики  
и микробиологии

Макаркина Марина Викторовна  
аспирант  
мл. научный сотрудник  
лаборатории сортоизучения  
и селекции винограда

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

Милдью – одно из наиболее распространенных заболеваний виноградной лозы. Эффективным способом контроля распространения заболеваний является возделывание устойчивых сортов. Сорты европейского винограда *V. vinifera* практически не обладают устойчивостью к милдью. Генотипы, несущие гены устойчивости, относятся к сортам винограда Северной Америки и Азии. Так селекция устойчивых сортов винограда строится на основе межвидовой гибридизации.

UDC 575.11: 634.8.09

DOI: 10.3679 / 2219-5335-2018-2-50-24-31

**DNA MARKER-ASSISTED  
IDENTIFICATION OF RESISTANCE  
GENES TO DOWNY MILDEW  
IN NEW CULTIVARS  
AND SELECTED GRAPES FORMS  
BY NCF SCHVW BREEDING**

Ilitskaya Elena Tarasovna  
Cand. Biol. Sci.  
Head of Laboratory of Cultivar's study  
and Breeding of grapes

Tokmakov Sergey Vyacheslavovich  
Cand. Biol. Sci.  
Research Associate  
of Laboratory of Genetics  
and Microbiology

Makarkina Marina Victorovna  
Post-graduate student  
Junior Research Associate  
of Laboratory of Cultivar's Study  
and Breeding of Grapes

*Federal State Scientific  
Budget Institution  
"North-Caucasian Federal  
Scientific Center of Horticulture,  
Viticulture, Winemaking",  
Krasnodar, Russia*

Downy mildew is the one of the most prevalent diseases of the grapevine. An effective way to control the spread of disease is cultivation of resistant varieties. The European grape *V. vinifera* is not resistant to mildew practically. Genotypes, carrying the resistance genes, belong to the grape varieties of North America and Asia. So breeding of resistant grape varieties is based on interspecies hybridization. Modern methods of genetics

---

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Администрации Краснодарского края (грант № 16-44-230314 p\_a).

Современные методы генетики и молекулярной биологии расширяют возможности проводимых исследований в данном направлении. На сегодняшний день идентифицировано порядка 20 крупных и мелких локусов устойчивости к *P. viticola*. К крупным локусам устойчивости относят *Rpv10* и *Rpv3*. Ген *Rpv10*, наследуемый от *V. amurensis*, был впервые определен F. Schwander и др. Был идентифицирован и ДНК-маркер GF09-46, тесно сцепленный с данным локусом. Ген *Rpv3* впервые был найден в сорте Бьянка – сложном межвидовом гибриде винограда. Позже было определено, что ген *Rpv3* имеет семь гаплотипов, идентификация которых возможна микросателлитными маркерами UDV305, UDV737. Нами проведено исследование методом ПЦР генотипов отборных и элитных форм и новых межвидовых сортов винограда селекции СКФНЦСВВ с помощью ДНК-маркеров, сцепленных с генами устойчивости к милдью *Rpv10* и *Rpv3*. Разделение продуктов реакции выполнено методом капиллярного электрофореза с использованием автоматического генетического анализатора ABI Prism 3130. Анализы проведены в соответствии с потенциальной возможностью идентификации целевых аллелей согласно родословной изучаемых образцов. В шести гибридных генотипах определен ген *Rpv3*, ген *Rpv10* – определен в одном гибриде винограда.

**Ключевые слова:** ВИНОГРАД, ДНК-МАРКЕРЫ, УСТОЙЧИВОСТЬ К МИЛДЬЮ, *RPV10*, *RPV3* ГЕНЫ

and molecular biology expand the possibilities of ongoing research in this field. Today it is identified about 20 major and minor of resistance loci to *P. viticola*. *Rpv10* and *Rpv3* are major loci of resistance. *Rpv10*, inherited from *V. amurensis* was first determined F. Schwander et al. It was identified and a DNA-marker GF09-46, closely linked with this locus. *Rpv3* gene was first found in the Bianca grapes – a complex interspecies hybrids of grapes. It was later determined that the *Rpv3* gene has seven haplotypes, and their identification is possible with microsatellite markers UDV305, UDV737. We analyzed the genotypes of selected, elite forms and new inter-species grape varieties of NCFSCHVW breeding by the PCR method using DNA markers linked to the mildew resistance *Rpv10* and *Rpv3* genes. The separation of the reaction products is carried out by capillary electrophoresis using an automated genetic analyzer ABI Prism 3130. The analyzes were carried out in accordance with the potential possibility of identifying the target alleles according to the pedigree of the studied samples. The *Rpv3* gene is defined in six hybrid genotypes, *Rpv10* gene – is defined in one grape hybrid.

**Keywords:** GRAPEVINE, DNA-MARKERS, DOWNY MILDEW RESISTANCE, *RPV10*, *RPV3* GENES

**Введение.** Одним из наиболее распространённых и вредоносных грибных заболеваний виноградной лозы, которое вызывается биотрофным оомицетом *Plasmopara viticola* Berl. Et de Toni, является милдью. Наибольший вред наносит милдью виноградникам при повышенной влажности в летний период. Патоген поражает все зеленые органы виноградного растения: листья, побеги, соцветия, ягоды, усики.

Эффективным элементом контроля распространения заболеваний является возделывание устойчивых сортов. Сортам европейского винограда *V. vinifera* свойственна высокая поражаемость милдью. Устойчивостью характеризуются генотипы винограда Северной Америки и Азии (*V. aestivalis*, *V. berlandieri*, *V. cinerea*, *V. riparia*, *V. rupestris* и др.), а также *Muscadinia rotundifolia* [1, 2]. Принято считать, что устойчивость развивалась одновременно с патогеном, который является эндемиком Северной Америки. У некоторых форм вида *V. amurensis* устойчивость к *P. viticola* могла эволюционировать от устойчивости к *P. cissii* и *P. amurensis*, которые являются эндемиками Азии [3].

Селекция устойчивых сортов винограда строилась на основе межвидовой гибридизации, начиная с конца XIX века, и продолжается по настоящее время. Современные методы генетики и молекулярной биологии расширяют возможности проводимых исследований в данном направлении. На сегодняшний день идентифицировано порядка 20 крупных и мелких локусов устойчивости к *P. viticola*, большинство картированы, им присвоены имена, определены сцепленные с генами ДНК-маркеры [4].

Крупный локус устойчивости *Rpv3* впервые был идентифицирован на 18 хромосоме в сложном межвидовом гибриде винограда Бьянка, несущем в себе генплазму *V. vinifera*, *V. labrusca*, *V. rupestris*, *V. berlandieri*, *V. lincecumii* [5]. Позже исследование устойчивых сортов среди североамериканских представителей рода *Vitis*, обладающих геном *Rpv3*, выявило наличие семи консервативных гаплотипов, тогда как эти гаплотипы отсутствовали у европейских сортов, выведенных до распространения милдью [6]. Авторы пришли к выводу, что ген *Rpv3* может быть найден в селекционных формах, имеющих в родословной несколько североамериканских предков. Выявленные гаплотипы – результат селекции, где источниками устойчивости являлись североамериканские виды *V. rupestris*, *V. labrusca* и *V. riparia*.

Ценные гаплотипы локализуются в одном локусе, по этой причине в традиционной селекции возможно комбинировать только два гаплотипа в одном диплоиде. Идентификация гаплотипов возможна сцепленными фланкирующими микросателлитными маркерами UDV305, UDV737 [6]. Так, устойчивые гаплотипы гена *Rpv3* соответствуют следующими аллельными состояниями указанных локусов (UDV305, UDV737, соответственно): *Rpv3*<sup>299-279</sup> (от *V. rupestris*), *Rpv3*<sup>null-297</sup> (*V. rupestris* или *V. lincecumii*), *Rpv3*<sup>321-312</sup> (*V. labruska* или *V. riparia*), *Rpv3*<sup>null-271</sup> (*V. labruska* или *V. riparia*), *Rpv3*<sup>361-299</sup> (*V. rupestris*), *Rpv3*<sup>299-314</sup> (*V. rupestris*), *Rpv3*<sup>null-287</sup> (*V. rupestris* или *V. labruska*).

Однако, не только американские виды винограда могут выступать донорами устойчивости к милдью. Ген устойчивости *Rpv10*, наследуемый от *V. amurensis*, был определен в генотипе сорта Солярис [7].

Идентифицированный локус объяснял до 50 % наблюдаемой фенотипической дисперсии. В рамках проводимого исследования был определён и тесно сцепленный микросателлитный ДНК-маркер гена, обуславливающего устойчивость к *P. viticola*. Анализ родословной сорта Солярис показал, что ген *Rpv10* был наследован от сорта Северный, одной из родительских форм которого является дикий амурский виноград: *V. amurensis* x Сеянец Маленгра. Таким образом, потомками сорта винограда Северный может быть унаследована аллель генплазмы *V. amurensis*, определяющая устойчивость к милдью.

Цель данной работы – ДНК-маркерный анализ генов устойчивости к милдью *Rpv10* и *Rpv3* в генотипах винограда, полученных в СКФНЦСВВ в результате скрещиваний на основе межвидовой селекции.

**Объекты и методы исследований.** В работу нами были включены новые сорта винограда, проходящие государственное сортоиспытание и отборные гибридные формы межвидового происхождения, созданные и изучаемые в СКФНЦСВВ. Образцы ДНК выделяли из 2-3 растений, экс-

тракцию ДНК проводили методом ЦТАБ [8]. В исследовании использовали микросателлитный ДНК-маркер GF 09-46, тесно сцепленный, согласно опубликованным данным, с геном *Rpv10*, определяющим устойчивость к заболеванию милдью [7] и ДНК-маркеры UDV305, UDV737, позволяющие идентифицировать аллельное состояние гена *Rpv3* [6]. Нуклеотидная последовательность праймеров маркеров взята из литературных источников.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в конечном объеме 25 мкл, содержащем порядка 50 нг геномной ДНК, 1,5 единицы Tag-полимеразы («СибЭнзим», Россия), 1хTag-полимеразного буфера («СибЭнзим»), 2мМ MgCl<sub>2</sub> («СибЭнзим»), 0,2 мМ каждого dNTP («СибЭнзим») и 200 мкМ прямого и обратного праймера («Синтол», Россия). Прямые праймеры использовали с флуорисцентной меткой TAMRA. Амплификацию осуществляли с использованием прибора Eppendorf Master cycler gradient (Германия). Разделение продуктов реакции методом капиллярного электрофореза и оценка результатов проведена с использованием автоматического генетического анализатора ABI Prism 3130 и специального программного обеспечения GeneMapper и PeakScanner.

Молекулярно-генетические исследования выполнены на оборудовании ЦКП «Геномные и постгеномные технологии» Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия.

**Обсуждение результатов.** Методом ПЦР проанализированы три сорта и девять отборных гибридных форм селекции СКФНЦСВВ, которые выделяются рядом положительных характеристик, в том числе и повышенной устойчивостью к грибным патогенам, на наличие устойчивых аллелей генов *Rpv3* и *Rpv10*. Использование в данной работе ДНК-маркеров генов *Rpv10* и *Rpv3* обоснованно, так как все изучаемые генотипы созданы с привлечением генплазмы, в которой и были идентифицированы анализируемые гены и тесно сцепленные с ними микросателлитные маркеры. Ана-

лизы проведены в соответствии с потенциальной возможностью идентификации целевых аллелей согласно родословной изучаемых образцов.

На наличие устойчивых аллелей гена *Rpv3* были проанализированы семь отборных гибридных форм селекции СКФНЦСВВ, а также сорт Дмитрий, проходящий государственное сортоиспытание. В исследования включали гибридные генотипы, которые потенциально могли бы унаследовать устойчивость от одной из родительских форм (сортов с американской генплазмой: Варусет, СВ 12-309, Виллар Блан). Из восьми проанализированных форм в 6 идентифицирован устойчивый гаплотип *Rpv3*<sup>299-279</sup> (табл.).

Результаты ДНК-маркерного анализа генов *Rpv10* и *Rpv3* в изучаемых генотипах винограда селекции СКФНЦСВВ

Гибридная форма, сорт	Родительские формы	ПЦР-продукт, пар нуклеотидов		
		ДНК-маркеры		
		UDV 305	UDV 737	
Анализ гена <i>Rpv3</i>				
Тана 20/1	<b>Варусет</b> x Гранатовый	<b>299</b>	<b>279</b>	283
Тана 29	<b>Варусет</b> x Гранатовый	<b>299</b>	<b>279</b>	
Тана 37/1	<b>Варусет</b> x Гранатовый	<b>299</b>	<b>279</b>	
Тана 48	<b>Варусет</b> x Гранатовый	<b>299</b>	<b>279</b>	283
Тана 65	<b>Варусет</b> x Гранатовый	<b>299</b>	<b>279</b>	285
Тана 74	<b>СВ 12-309</b> x Мускат кубанский	<b>299</b>	<b>279</b>	295
Тана 82	Мадлен Анжевин x <b>Виллар Блан</b>	342	285	312
Дмитрий	<b>Варусет</b> x Гранатовый	254	285	295
Анализ гена <i>Rpv10</i>		GF09-46		
Морозко	Мицар x <b>Саперави северный</b>	<b>416</b>		423
Курчанский	Мускат кубанский x <b>Саперави северный</b>	395		408
Тана 43/1	Гимра x <b>Саперави северный</b>	395		408
Тана 40	Мускат кубанский x <b>Саперави северный</b>	395		419

Для идентификации гена *Rpv10* использовали микросателлитный ДНК-маркер GF 09-46. Согласно литературным данным, при ДНК-маркерном анализе с использованием маркера GF09-46 наличие резистентной аллели локуса *Rpv10* в генотипе сорта винограда соответствует наличию ПЦР-продукта размером 416 пар нуклеотидов. В изучаемых генотипах (сорта Морозко, Курчанский, гибридные формы Тана 43/1, Тана 40) донором устойчивой аллели является сорт Саперави северный. По данным проведённого нами анализа ДНК сортов Морозко, Курчанский и двух отборных гибридных форм, донорная аллель устойчивости гена *Rpv10* унаследована только сортом Морозко (см. табл.).

Таким образом, согласно ДНК-маркерному анализу гибридные отборные формы винограда Тана 20/1, Тана 29, Тана 37/1, Тана 48, Тана 65, Тана 74 несут устойчивый гаплотип гена *Rpv3*<sup>299-279</sup>; сорт Морозко обладает геном устойчивости к милдью *Rpv10*. Данные генотипы характеризуются повышенной устойчивостью к милдью по среднемноголетней фитопатологической оценке.

**Заключение.** Проанализировано методом ДНК-маркерного анализа 12 генотипов винограда межвидового происхождения селекции СКФНЦСВВ, в том числе новые востребованные сорта и перспективные гибридные формы для виноделия. В шести гибридных формах идентифицирован ген устойчивости к милдью *Rpv3*, в сорте Морозко найден ген *Rpv10*. Проведённое исследование можно считать одним из первых шагов внедрения ДНК-маркерной селекции в практику селекции винограда в отечественной аграрной науке.

#### Литература

1. Alleweldt, G. Progress in grapevine breeding / G. Alleweldt, J.V. Possingham // Theor. Appl. Genet. – 1988. – V. 75. – P. 669-673.
2. Wan, Y. Comparison of resistance to powdery mildew and downy mildew in Chinese wild grapes / Y. Wan, H. Schwaninger, P. He, Y. Wang // Vitis. – 2007. – V. 46. – P. 132-136.

3. Riaz, S. Using a limited mapping strategy to identify major QTLs for resistance to grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) and their use in marker-assisted breeding / S. Riaz, D.W. Tenschler Ramming, M.A. Walker // *Theor. Appl. Genet.* – 2011. – V. 122. – P. 1059–1073.
4. International Variety Catalogue VIVC // Julius Kuhn-Institut [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.vivc.de>
5. Bellin, D. Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine «Bianca» is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site / D. Bellin, E. Pessotti, D. Merdinoglu, S. Wiedemann-Merdinoglu, A.F. Adam-Blondon, G. Cipriani, G. Di Gaspero // *Theoretical and Applied Genetics.* – 2009. – T. 120, №1. – P. 163-176.
6. Di Gaspero, G. Selective sweep at the *Rpv3* locus during grapevine breeding for downy mildew resistance / G. Di Gaspero, D. Copetti, C. Coleman, S. Diego Castellarin, R. Eibach, P. Kozma, T. Lacombe, G. Gambetta, A. Zvyagin, P. Cindric', L. Kova'cs, M. Morgante, R. Testolin // *Theor. Appl. Genet.* – 2012. – T.124. – P. 227–286.
7. 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 // *Theor. Appl. Genet.* – 2012. – V.124, № 1. – P. 163-176.
8. Rogers SO, Bendich AJ. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology.* –1985.- V. 19.- №1.- P. 69-76.

#### References

1. Alleweldt, G. Progress in grapevine breeding / G. Alleweldt, J.V. Possingham // *Theor. Appl. Genet.* – 1988. – V. 75. – P. 669-673.
2. Wan, Y. Comparison of resistance to powdery mildew and downy mildew in Chinese wild grapes / Y. Wan, H. Schwaninger, P. He, Y. Wang // *Vitis.* – 2007. – V. 46. – P. 132-136.
3. Riaz, S. Using a limited mapping strategy to identify major QTLs for resistance to grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) and their use in marker-assisted breeding / S. Riaz, D.W. Tenschler Ramming, M.A. Walker // *Theor. Appl. Genet.* – 2011. – V. 122. – P. 1059–1073.
4. International Variety Catalogue VIVC // Julius Kuhn-Institut [Elektronnyj resurs]. – Rezhim dostupa: <http://www.vivc.de>
5. Bellin, D. Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine «Bianca» is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site / D. Bellin, E. Pessotti, D. Merdinoglu, S. Wiedemann-Merdinoglu, A.F. Adam-Blondon, G. Cipriani, G. Di Gaspero // *Theoretical and Applied Genetics.* – 2009. – T. 120, №1. – P. 163-176.
6. Di Gaspero, G. Selective sweep at the *Rpv3* locus during grapevine breeding for downy mildew resistance / G. Di Gaspero, D. Copetti, C. Coleman, S. Diego Castellarin, R. Eibach, P. Kozma, T. Lacombe, G. Gambetta, A. Zvyagin, P. Cindric', L. Kova'cs, M. Morgante, R. Testolin // *Theor. Appl. Genet.* – 2012. – T.124. – P. 227–286.
7. 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 // *Theor. Appl. Genet.* – 2012. – V.124, № 1. – P. 163-176.
8. Rogers SO, Bendich AJ. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology.* –1985.- V. 19.- №1.- P. 69-76.