

УДК 575.22

**ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВНОСТИ УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ
ДНК-МАРКЕРА VfC1 ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ ЯБЛОНИ К ПАРШЕ Vf****Супрун И.И., канд. биол. наук, Токмаков С.В., канд. биол. наук***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства»,
(Краснодар)***Лободина Е.В.***Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства»,
ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный аграрный университет»
(Краснодар)*

Реферат. В статье приведены результаты исследования, направленного на совершенствование ДНК маркера VfC1 гена устойчивости яблони к парше Vf. На основе нуклеотидной последовательности искомого гена был сконструирован дополнительный прямой праймер. Несмотря на наличие минорных неспецифических амплификатов была показана перспективность работы в данном направлении. Новый праймер может быть использован в дальнейшем для усовершенствования маркера VfC1.

Ключевые слова: ДНК-маркер, ген Vf, устойчивость яблони к парше, маркер - опосредованная селекция

Summary. The results of research directed on the improving of DNA marker VfC1 of Vf - apple scab resistance gene are presented. Additional forward primer was designed on the base of the nucleotide sequence of the target gene. Despite the presence of minor non-specific amplification the outlook of work this direction has been shown. New primer may be used to further improve of VfC1 marker.

Key words: DNA-marker, Vf-gene, apple scab resistance, marker-assisted breeding

Введение. Одним из путей повышения экологической безопасности и экономической эффективности промышленного садоводства является создание и возделывание устойчивых к основным грибным патогенам сортов яблони. Актуальность создания устойчивых сортов обусловлена еще и тем, что в последнее время отмечается потеря чувствительности грибных патогенов к фунгицидным препаратам, а также изменением биологических особенностей возбудителей заболеваний и увеличением их вредоносности. На сегодняшний день наиболее вредоносным грибным заболеванием для яблони на юге России является парша, вызываемая несовершенным грибом *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. Во всех зонах садоводства Северного Кавказа из 10 лет наблюдений отмечено до 8 эпифитотий [1].

По причине высокой вредоносности данного заболевания, селекция на устойчивость яблони к парше является наиболее важным направлением как в отечественной, так и в мировой селекционной практике [2 - 5]. В настоящее время в селекции на устойчивость к парше эффективно используется технология так называемой маркерной селекции (маркер - опосредованной селекции), основанная на использовании ДНК-маркеров для идентификации генов, интересующих селекционера.

Среди генов устойчивости яблони к парше одним из наиболее изученных является ген Vf, обладающий наиболее широким спектром устойчивости к патогену *V. inaequalis*. На сегодняшний момент в мире создан широкий перечень устойчивых к парше сортов яблони, несущих данный ген. Данный ген расположен на первой хромосоме. Для него на настоящий момент разработан ряд ДНК-маркеров, из которых маркер VfC1 представляется од-

ним из наиболее удобных в использовании, несмотря на то, что не позволяет идентифицировать гетерозиготное состояние *Vf* локус [6]. Это дает возможность использовать технологию ДНК-маркирования для их идентификации при ведении селекционных программ на устойчивость яблони к возбудителю парши.

Однако следует отметить, что при использовании данного ДНК-маркера, наряду с ПЦР - фрагментом размером, специфичным для данного аллеля (размер около 286 пар нуклеотидов), амплифицируются два неспецифических продукта (около 480 и 640 п.н.). Данные фрагменты, в случае использования мультиплексной ПЦР с ДНК-маркерами других генов, могут препятствовать идентификации при перекрывании диапазонов размеров ПЦР-продуктов.

В аспекте снижения себестоимости ПЦР - анализа и ускорения оптимальным является вариант, при котором ДНК-маркеры генов хозяйственно-ценных признаков, входящие в мультиплексный набор, позволяют амплифицировать единичные продукты с различиями в размере не менее 40-50 п.н. Данное обстоятельство дает возможность проводить безошибочную идентификацию с использованием наименее дорогостоящего метода разделения фрагментов – электрофореза в агарозном геле.

Нами была поставлена задача оценить возможность усовершенствования ДНК-маркера гена *Vf* за счет создания праймерной пары, позволяющей получать единичный фрагмент, специфичный для доминантного аллеля, без синтеза неспецифических продуктов. Это даст возможность расширить область применения мультиплексной ПЦР в идентификации генов хозяйственно ценных признаков яблони в сочетании с геном устойчивости к парше *Vf*.

Объекты и методы исследований. Материалом для исследования послужили сорта яблони Флорина, Фуджи как положительный и отрицательный контроль наличия гена *Vf*, а также ряд гибридных форм яблони с установленным наличием/отсутствием доминантного аллеля данного гена, созданных в ходе селекционной работы в Северо-Кавказском зональном научно-исследовательском институте садоводства и виноградарства [4, 5].

Для дизайна праймера проводили выравнивание последовательностей доминантного аллеля гена *Vf* и его гомологов с использованием алгоритма multiple alignment в программе ClustalW, доступной на сайте <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> в режиме online.

Постановку ПЦР проводили в соответствии с принятыми методиками [7] по следующей программе: 5 минут при 94°C – начальная денатурация, следующие 30 циклов: 30 секунд денатурации при 94°C; 30 секунд – отжиг праймеров при температуре: 60°C; 30 секунд синтез при 72°C; последний цикл синтеза – 3 минуты при 72°C. Для электрофоретического анализа продуктов ПЦР, полученных с ДНК маркером гена *Vf* использовали 2 % агарозный гель. Исследования выполнены на оборудовании ЦКП «Геномные и постгеномные технологии» СКЗНИИСиВ.

Обсуждение результатов. Для оценки перспективности создания нового ДНК-маркера к гену устойчивости яблони к парше *Vf* провели сравнение последовательности *Vfa4*, которая, по данным M.R. Afunian с соавторами, является доминантной аллелью гена, с последовательностями *Vfa1* и *Vfa2* [6].

По результатам анализа нуклеотидного полиморфизма доминантного аллеля гена *Vf* и двух его гомологов, локализованных с ним в кластере, определили полиморфный участок, для создания нового ДНК-маркера (рис. 1).

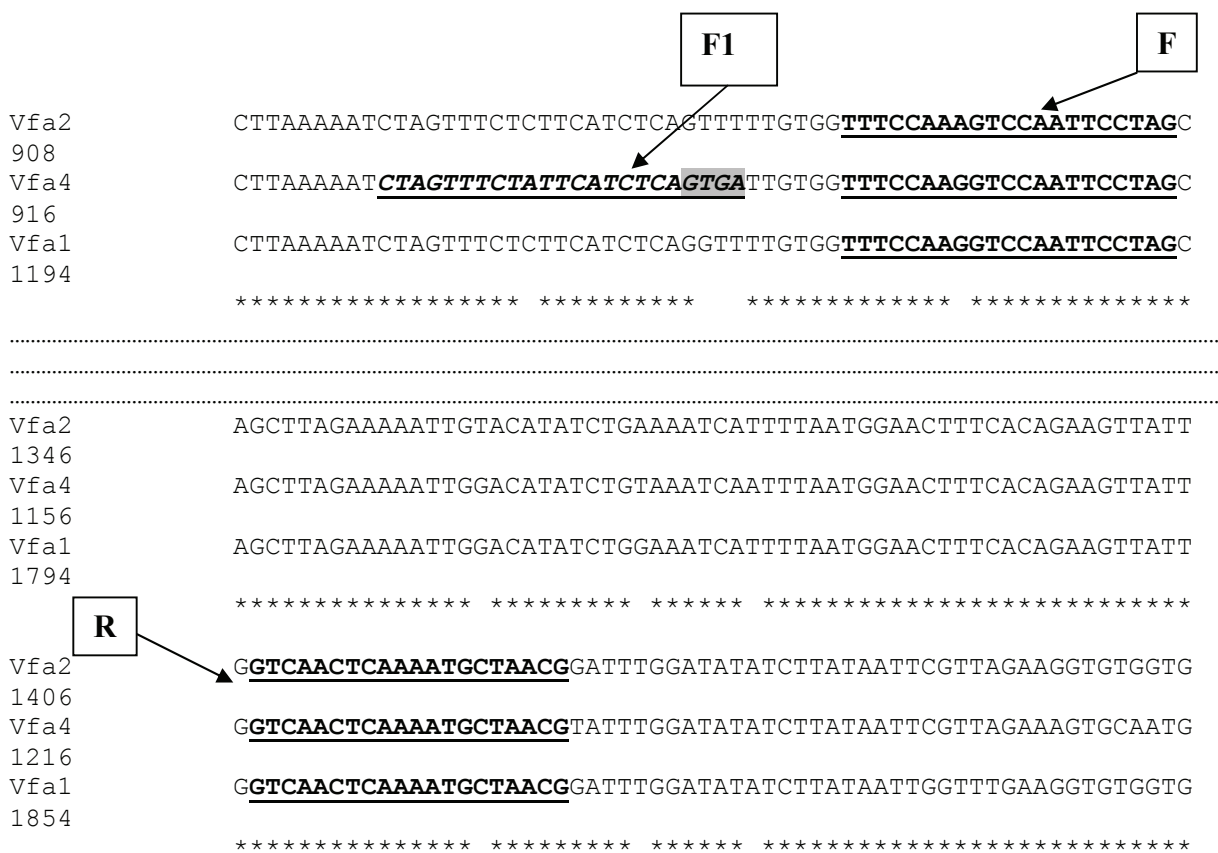


Рис. 1 Позиции праймеров на последовательностях аллелей гена *Vf*

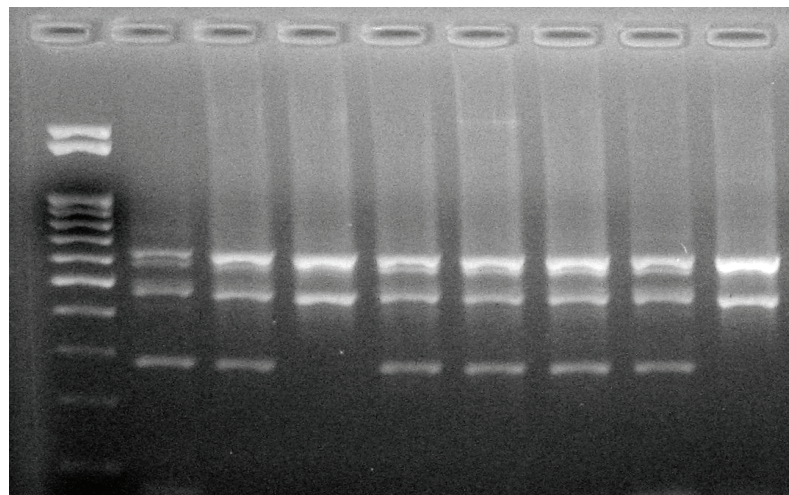
На представленном рисунке подчеркнуты и выделены жирным шрифтом позиции праймеров ДНК-маркера, известного по литературным источникам и использованного нами в работе: **F**-прямой и **R**-обратный праймер [6]. Выделен жирным шрифтом, курсивом и подчеркнут участок последовательности *Vfa4*, отобранный в качестве целевого для создания нового прямого праймера (**F1**).

Участок последовательности *Vfa4*, на который был создан дополнительный обратный праймер, имеет 4 полиморфных нуклеотида на

3-м конце. Этого достаточно для обеспечения аллель-специфичного синтеза ПЦР фрагмента. Новое сочетание праймеров дает возможность синтезировать единственный продукт ПЦР размером около 290 п.н. только с последовательности *Vfa4*, являющейся доминантным аллелем гена *Vf*.

Для сравнения амплификации с праймерной парой F+R (известной из литературных данных) и амплификации с модифицированной праймерной парой, включающей обратный праймер R и созданный нами в ходе работы прямой праймер (**F1**), на рис. 2 и 3 приведены результаты электрофоретического разделения продуктов ПЦР с ними.

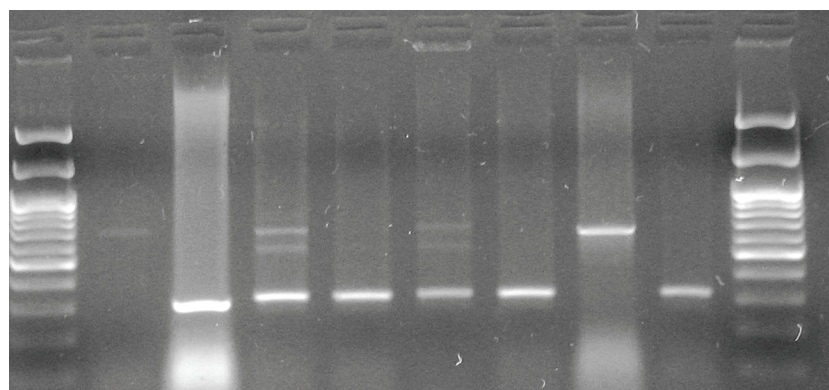
На представленной электрофореграмме видно, что у образцов 1, 2, 4, 5, 6, 7 синтезируется одновременно 3 продукта. Нижний фрагмент - размером около 270 п.н. специфичен для доминантного аллеля гена *Vf*. Он идентифицируется у сорта Флорина и гибридов. При этом у образцов № 3 и № 8 данный фрагмент отсутствует, что говорит об отсутствии доминантного аллеля гена *Vf*.



М 1 2 3 4 5 6 7 8

Рис. 2. ДНК-анализ сортов яблони по праймерной паре F+R
 М–маркер молекулярной массы ДНК; сорта и гибриды яблони: 1-Флорина (*Vf*⁺),
 2- 8 - гибридные формы.

Однако, из рис. 2 видно, что у всех образцов присутствуют два неспецифических фрагмента размером около 480 и 550 п.н. Данные фрагменты могут затруднять идентификацию в случае использования мультиплексной ПЦР при использовании ДНК-маркеров к другим генам хозяйственно ценных признаков, если эти маркеры будут иметь размеры ПЦР - продуктов в диапазоне от 400 до 600 п.н. В связи с этим нами и было выполнено данное исследование. Главной задачей являлась разработка новых комбинаций праймеров, позволяющих синтезировать единственный ПЦР-фрагмент.



М 1 2 3 4 5 6 7 8 М

Рис. 3. ДНК-анализ сортов яблони по праймерной паре F1+R
 М–маркер молекулярной массы ДНК; сорта и гибриды яблони:
 1- Фуджи, 2 - Флорина (*Vf*⁺), 3- 8 – гибридные формы

На рис. 3 видно, что у сорта Флорина и образцов № 4, 6 и 8 амплифицируется единственный целевой фрагмент, специфичный для доминантного аллеля, однако у образцов № 3 и №5 присутствует два минорных, неспецифичных фрагмента размером около 550 и 700 п.н. Образцы №3 - №6, №8 и сорт Флорина несут доминантный аллель гена *Vf*. Очевидно, что новая праймерная пара позволяет его идентифицировать.

Факт различий в паттернах амплификации (наличие неспецифических фрагментов с размером около 550 п.н. и 700 п.н. у одних образцов и их отсутствие у других) может объясняться структурным полиморфизмом в сайтах отжига праймеров в геноме. Кроме того, это может говорить о том, что неспецифические фрагменты амплифицируются не с участка доминантного или рецессивного аллеля гена *Vf*, а с другого участка генома, обладающего высоким уровнем сходства с последовательностью гена *Vf*. Об этом свидетельствует то, что у сорта Флорина и образцов № 4, 6 и 8, имеющих ген *Vf*, данные нецелевые фрагменты не синтезируются, а у образцов № 3 и № 5 они присутствуют. Это может объясняться различиями в нуклеотидной последовательности участка, на котором происходит синтез неспецифически амплифицированных фрагментов 550 и 700 п.н у образцов № 3 и № 5, что может быть обусловлено как разным происхождением образцов, так и разным наследованием участков неспецифического отжига праймеров.

Таким образом очевидно, что для создания комбинаций праймеров, позволяющих синтезировать единственный ПЦР-фрагмент, специфичный для доминантного аллеля гена *Vf*, необходимо дальнейшее конструирование новых праймерных пар на последовательность доминантного аллеля гена *Vf*. При этом в работе, в качестве прямого праймера, перспективным может быть использование нового праймера F1, созданного в ходе выполнения исследований в предыдущий период.

Заключение. Усовершенствованный ДНК-маркер гена *Vf* может быть использован для идентификации данного гена у сортов и селекционных форм яблони. Новый прямой праймер перспективен для использования при разработке нового ДНК-маркера, позволяющего синтезировать единственный целевой фрагмент доминантного аллеля.

Литература

1. Смольякова, В.М. Роль биотических факторов в управлении патосистемами садовых агроценозов // Системообразующие экологические факторы и критерии зон устойчивого развития плодового хозяйства на Северном Кавказе. – Краснодар, 2001. – С. 94-140.
2. Седов, Е.Н. Устойчивость яблони к парше / Седов, Е.Н., Жданов, В.В. – Орел, 1983. – 113с.
3. Седов, Е.Н. Селекция семечковых культур на устойчивость к парше и мучнистой росе - приоритетное направление науки // Садоводство и виноградарство. – 1992. – №1. – С. 11-14.
4. Ульяновская, Е.В. Новые иммунные к парше формы яблони для южной зоны садоводства // Садоводство и виноградарство.- 2007.-№6 - С. 15-16.
5. Ульяновская, Е.В. Создание иммунных к парше генотипов яблони с комплексом ценных агробиологических признаков / Ульяновская Е.В., Супрун И. И., Седов Е. Н., Седышева Г. А., Серова З. М. // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс] – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2011.– № 10 (4).– С.14-30. – Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/pdf/11/04/02.pdf>
6. Afunian, M. Goodwin P.H., Hunter D.M. Linkage *Vfa4* in *Malus × domestica* and *Malus floribunda* with *Vf* resistance to the apple scab pathogen *Venturia inaequalis* // Plant Pathology. – 2004. – Vol. 53. – P. 461-467.
7. Шибата, Д.К. Полимеразная цепная реакция и молекулярно-генетический анализ биоптатов // Молекулярная клиническая диагностика. – М.: Мир, 1999. – С. 395-427.