

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОГО НАБОРА ДЛЯ МАРКЕРНОЙ СЕЛЕКЦИИ ЯБЛОНИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ПАРШЕ¹

Супрун И.И., канд. биол. наук, Токмаков С.В., канд. биол. наук, Степанов И.В.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский
зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства»
(Краснодар)*

Иванова А.М.

*Кубанский государственный университет
(Краснодар)*

Реферат. Работа направлена на создание мультиплексного набора ДНК-маркеров, перспективного для идентификации генов устойчивости яблони к парше *Vf*, *Vg*, *Vr2* и *Vm*. При формировании мультиплексного набора и распределении флуоресцентных меток праймеров были учтены размеры ПЦР-продуктов и температура отжига праймеров. Разработанный мультиплексный набор апробирован на 6 сортах из коллекции генетических ресурсов СКЗНИИСиВ. Набор перспективен для использования в маркер-опосредованной селекции, а также для скрининга коллекций генетических ресурсов яблони на наличие генов устойчивости к парше.

Ключевые слова: мультиплексный набор, SSR, яблоня, парша, маркер-опосредованная селекция

Summary. The work is directed at creating of multiplex set of DNA markers for identification of genes of apple resistance to scab *Vf*, *Vg*, *Vr2* and *Vm*. When forming the multiplex set, the sizes of PCR products, annealing temperature of primers, lack of complementary sites between primers were taken into account. The developed multiplex set was tested on 6 apple cultivars from the collection of genetic resources of the NCRRIH&V. The created set is promising for MAS for apple scab resistance and for screening of collections of apple tree genetic resources.

Key words: multiplex set, SSR, apple-tree, scab, MAS

Введение. Парша яблони – одно из наиболее вредоносных заболеваний на всей территории возделывания данной культуры. Применение фунгицидных препаратов для садовых насаждений, как способ борьбы с данным заболеванием, существенно повышает конечную стоимость плодовой продукции и, кроме того, ухудшает экологическую обстановку в регионах с развитым плодоводством. Возделывание устойчивых к парше сортов позволяет существенно сокращать или даже полностью избежать применения фунгицидных препаратов, количество обработок которыми достигает 15-20 раз в сезон.

Внедрение устойчивых сортов в производство позволяет повысить экологическую безопасность производства за счет снижения пестицидной нагрузки на агрофитоценоз и, кроме того, повышает безопасность продукции для человека. В связи с этим создание сортов яблони, устойчивых к парше, является одним из наиболее важных направлений селекции данной культуры как в России, так и в мире [1-3].

¹Работа выполнена на оборудовании ЦКП "Геномные и постгеномные технологии"

В настоящее время в селекции сельскохозяйственных культур, и яблони в том числе, все большую роль приобретает использование методов ДНК-маркерного анализа, которые позволяют на ранних этапах развития растения идентифицировать гены устойчивости и провести выбраковку неустойчивых образцов, не прибегая к фитопатологическому тестированию. Особенно актуально применение маркер-опосредованного отбора при необходимости одновременной идентификации двух и более генов устойчивости, так как при оценке на искусственном инфекционном фоне фенотипические проявления генов могут перекрываться, что не позволит достоверно идентифицировать их наличие.

Для парши яблони в настоящее время идентифицировано около 10 генов устойчивости к парше. Они имеют разный тип реакции и степень устойчивости к различным расам *Venturia inaequalis* [4]. Сочетание нескольких генов в одном генотипе является одним из наиболее эффективных селекционных способов для создания сортов, обладающих длительной устойчивостью [5]. Очевидно, что наличие ДНК-маркеров для целевых генов устойчивости является обязательным условием для успешного выполнения программ по маркер-опосредованной селекции. Для большинства известных генов устойчивости к парше идентифицированы ДНК-маркеры, позволяющие их идентифицировать. Однако при этом необходимо учитывать расстояние ген-маркер, так как при увеличении дистанции между маркером и геном увеличивается процент ошибки, обусловленный увеличением вероятности протекания кроссинговера между ними.

Для генов устойчивости яблони к парше *Vf* (*Rvi6*), *Vg* (*Rvi1*), *Vr2* (*Rvi15*) и *Vm* (*Rvi5*) в настоящее время установлена геномная локализация и идентифицированы ДНК-маркеры, с ними сцепленные, которые позволяют вести маркер-опосредованный отбор растений, несущих данные гены.

Особо важен тот факт, что идентифицированы SSR-маркеры, являющиеся кодоминантными и позволяющими определять гетерозиготность в локусах искомым генов [4]. Для гена *Vf*, который определяет устойчивость к наибольшему количеству рас парши, наряду с разработанным на основе его нуклеотидной последовательности маркером, идентифицирован SSR-маркер CH-Vf1, сонаследуемый с геном (0 сантиморган/сМ) [6]. При картировании гена *Vr2* количество рекомбинаций между геном и SSR-маркером CH02C02a в картирующей популяции Голден Делишес × GMAL 2473 (источник гена) объемом 989 растений составило 19, что соответствует величине около 2% ошибки.

У устойчивого образца идентифицировался аллель с размером фрагмента 176 п.н., в то время как у восприимчивого сорта Голден Делишес – 180 п.н. Для SSR-маркера CH02f06, фланкирующего данный ген с другой стороны, расстояние составляет около 3,7 сМ. Использование двух вышеуказанных маркеров одновременно позволяет существенно снизить ошибку [7].

Ген устойчивости яблони к парше *Vm*, интрогрессирован из форм яблони, принадлежащих к видам *Malus atrosanguinea* 804 (гены *Vm* и *Vf*) и *M. micromalus* (ген *Vm*). Работа по молекулярно-генетическому картированию гена *Vm* была выполнена А. Patocchi с соавторами (2005 г.). В результате выполненных исследований была определена позиция этого гена на хромосоме 17 и идентифицирован SSR ДНК-маркер Hi07h02. При анализе картирующей популяции Голден Делишес/Мюррей (источник гена) не было выявлено рекомбинации между маркером и *Vm* локусом. Это говорит о перспективности использования данного ДНК-маркера для идентификации гена *Vm* [8].

Особо стоит отметить ген *Vg*, впервые обнаруженный у сорта Голден Делишес. Данный ген обеспечивает устойчивость только к седьмой расе *V. inaequalis*, которая преодолевает устойчивость, детерминируемую геном *Vf*. Сочетание двух этих генов в одном образце позволяет получить устойчивость ко всем известным восьми расам возбудителя парши. Для гена *Vg* идентифицирован сцепленный с ним микросателлитный ДНК-маркер

CH01D03 – он локализован на удалении около 0,5 сМ, что позволяет его использовать для ДНК-маркерного отбора [9, 4].

Наличие ДНК-маркеров, перспективных к использованию при идентификации указанных генов дает возможность выполнения программ по созданию форм, несущих как данные гены в отдельности, так и объединенные в одном образце. Очевидно, что при выполнении массовых анализов гибридного потомства в рамках выполнения таких программ, немаловажным является фактор наличия экспресс-методов, позволяющих в минимальные сроки проводить анализ максимального количества образцов по максимальному количеству целевых генов. Перспективным здесь может быть использование мультиплексной ПЦР. Это дает возможность идентифицировать, при постановке одной реакции несколько генов устойчивости. В связи с этим, задачей наших исследований являлась разработка мультиплексного ДНК-маркерного набора, позволяющего одновременно идентифицировать гены устойчивости яблони к парше *Vf*, *Vg*, *Vr2* и *Vm*.

Объекты и методы исследований. Экстракцию ДНК проводили из молодых листьев методом ЦТАБ [10]. Для апробации использовали ДНК сортов Флоркинг, Фуджи, Голден Делишес, Голден Би, Либерти и Первинка.

ПЦР-анализ проводили по стандартным методикам [11]. ПЦР-смесь включала: 40-50 нг ДНК, 0,07мМ dNTPs, 0,3мкМ каждого праймера, 2,5 мкл 10xSE ПЦР-буфера (ООО «СибЭнзим»), 1 единица активности Taq-ДНК полимеразы, в общем объеме реакционной смеси 25 мкл. Постановку ПЦР проводили по следующей программе: 1 мин. – при 94 °С для начальной денатурации; следующие 35 циклов: денатурация 30 сек. – при 94 °С; 30 сек. отжиг праймеров – при температуре 58 °С; 30 сек. – синтез при 72 °С. Финальный цикл синтеза при 72 °С – 5 мин.

Анализ размеров амплифицированных фрагментов проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI prism 3130. Обработку данных осуществляли в программе Gene Mapper 4.1.

Обсуждение результатов. При объединении ДНК-маркеров и оптимизации параметров реакции в мультиплексные учитывали размеры амплифицируемых фрагментов, температуру отжига праймеров, степень самокомплементарности праймеров, вносимых в одну смесь. В результате выполнения оптимизации было определено соотношение концентраций праймеров используемых ДНК-маркеров в реакционной смеси 1:1:1:1. Оптимизированные параметры реакции и концентрации компонентов реакционной смеси приведены в разделе «Материал и методы». В табл. 1 приведена информация об использованных ДНК-маркерах и флуорохромах.

Таблица 1 – ДНК-маркеры мультиплексного набора

Маркер/ген	Флуорохром	Диапазон длин фрагментов (п.н.)
CH-Vf/Vf	FAM	160-185
CH01d03/Vg	ROX	125-145
CH02c02a/Vr2	R6G	150-190
Hi07h02/Vm	ROX	230-250

Несмотря на то, что диапазон размеров амплифицированных фрагментов маркеров CH-Vf и CH02c02a перекрывается, использование разных флуоресцентных красителей позволяет проводить одновременную идентификацию целевых фрагментов.

Использование одинакового флуорохрома ROX для SSR-маркеров генов *Vg* и *Vm* также допустимо, как видно из таблицы, они имеют разные диапазоны размеров амплифицированных фрагментов. На рис. 1 приведены результаты фрагментного анализа сорта яблони Флоркинг по данному мультиплексному набору.

Как видно из рисунка, применение данного мультиплексного набора позволяет безошибочно идентифицировать целевые фрагменты для всех искомым генов.

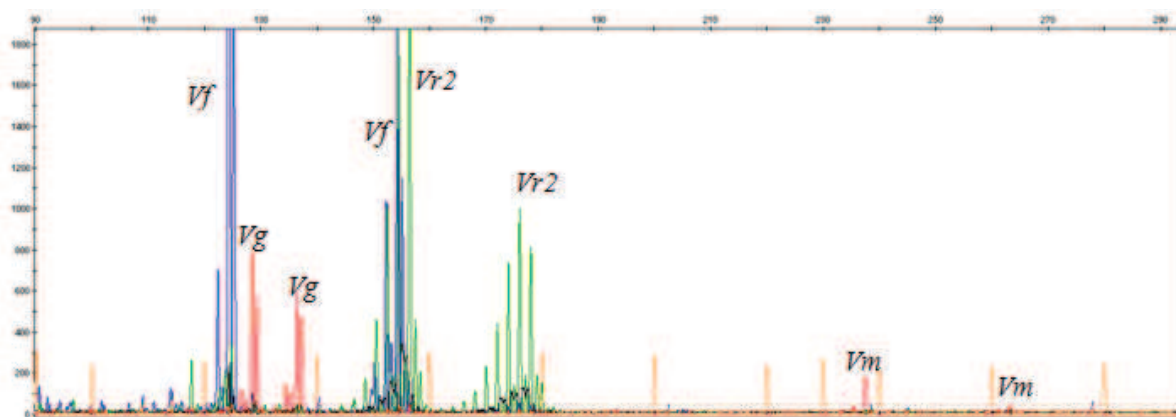


Рис. 1. Результаты фрагментного анализа сорта Флоркинг, с использованием мультиплексного набора SSR ДНК-маркеров генов устойчивости яблони к парше *Vf*, *Vg*, *Vr2* и *Vm*

На следующем этапе, для подтверждения эффективности сформированного мультиплексного набора, с использованием данного набора был выполнен анализ 5 сортов яблони из коллекции генетических ресурсов СКЗНИИСиВ. При этом в выборку вошли сорта, несущие ген *Vf* – Либерти, *Vm* – Первинка, *Vg* – Голден Делишес и сорт Фуджи, у которого все вышеуказанные гены отсутствуют. Кроме этого, для сорта Голден Делишес по маркеру гена *Vr2* известен размер амплифицируемого фрагмента – 180 пар нуклеотидов. Это позволяет использовать сорт Голден Делишес в качестве стандарта для подтверждения целевой амплификации.

В результате анализа, для всех изученных образцов был идентифицирован аллельный набор по искомым SSR-маркерам, сцепленных с генами устойчивости к парше. Результаты анализа приведены в табл. 2.

Таблица 2 – Результаты анализа сортов яблони по мультиплексному набору

Сорт \ Ген	CH-Vf (Vf)		CH01d03 (Vg)		CH02c02a (Vr2)		Hi07h02 (Vm)	
Флоркинг	124	154	128	137	156	178	238	264
Фуджи	162	168	137		142	178	244	258
Голден Делишес	136	168	155		180	184	246	254
Голден би	136	168	155		180	184	246	254
Либерти	154	168	141	147	174	178	262	274
Первинка	134	168	137	139	190	212	224	258

В таблице, для ряда образцов, некоторые аллели выделены полужирным текстом. Они соответствуют наличию доминантных аллелей целевых генов. По маркеру CH-Vf у сортов Флоркинг и Либерти, идентифицируется фрагмент размером 154 пар нуклеотидов, соответствующий наличию доминантного аллеля гена устойчивости *Vf*. Для исследуемых сортов это известный факт, что подтверждает эффективность данного ДНК-маркера. Сорт селекции ВНИИСПК (г. Орел) Первинка, несет ген *Vm*, что под-

тверждается наличием у него аллеля SSR-маркера Hi07h02 с размером фрагмента 224 п.н. По ДНК-маркеру CH01d03, сцепленному с локусом гена *Vg*, у сорта Голден Делишес и его клона – сорта Голден Би идентифицируется продукт одинакового размера – 155 п.н. Кроме того, из таблицы также видно, что их SSR-профиль идентичен, что закономерно, так как сорта и клоны очень редко имеют отличия в SSR-профиле, особенно при использовании небольшого количества маркеров.

Заключение. В соответствии с полученными результатами можно сделать вывод о высокой перспективности использования данного мультиплексного набора для скрининга коллекций генетических ресурсов с целью идентификации источников искомых генов устойчивости яблони к парше, а также в селекции на устойчивость к данному заболеванию. Особенно актуальным применение данного набора маркеров представляется при выполнении программ по объединению генов, при создании сортов и селекционных форм, несущих несколько генов устойчивости одновременно.

Литература

1. Седов, Е.Н. Приоритетные направления и результаты в селекции яблони / Е.Н. Седов, М.А. Макаркина, Г.А. Седышева, З.Е. Ожерельева, З.М. Серова // Современное садоводство, 2016. – № 3. – С. 19.
2. Ульяновская, Е.В. Новые сорта и элитные формы яблони с олиогенным и полигенным типом устойчивости к парше / Е.В. Ульяновская, Г.В. Гордеева // Научные труды ФГБНУ СКЗНИИСиВ, – Т. 9. – Краснодар, ФГБНУ СКЗНИИСиВ, 2016. – С. 52-58, С. 8-17.
3. Супрун, И.И. Эффективность отбора сеянцев яблони в школке на устойчивость к парше и мучнистой росе / И.И. Супрун, А.И. Насонов, Г.В. Якуба, Е.В. Лободина, О.Н. Барсукова // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2016. – № 38 (2). – С. 117-129. – Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/pdf/16/02/10.pdf>
4. Gessler, C. *Venturia inaequalis* Resistance in Apple / C. Gessler, A. Patocchi, S. Sansavini, S. Tartarini & L. Gianfranceschi // Critical Reviews in Plant Sciences, 2006.-V. 25:6.- P. 473-503.
5. Ульяновская, Е.В. Комплексный подход к отбору ценных генотипов яблони, устойчивых к стрессовым факторам среды / Е.В. Ульяновская, И.И. Супрун, С.В. Токмаков, Я.В. Ушакова // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2014. – № 25 (1). – С. 11-25. – Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/pdf/14/01/02.pdf>
6. Vinatzer, B. A. Isolation of two microsatellite markers from BAC clones of the Vf scab resistance region and molecular characterization of scab-resistant accessions in *Malus* germplasm / B.A. Vinatzer, A. Patocchi, S. Tartarini, L. Gianfranceschi, S. Sansavini and C. Gessler // Plant Breed, 2004.- 123: 321–326
7. Galli, P. High-resolution genetic map of the Rvi15 (Vr2) apple scab resistance locus / P. Galli, G. Antonio, L. Broggin, M. Kellerhals, C. Gessler, A. Patocchi // Mol Breeding (2010) 26:561–572
8. Patocchi, A. Identification by genome scanning approach (GSA) of a microsatellite tightly associated with the apple scab resistance gene *Vm* / A. Patocchi, M. Walser, S. Tartarini, G.A.L. Broggin, F. Gennari, S. Sansavini, and C. Gessler // Genome, 2005.- 48.-P. 630–636.
9. Calenge, F. Quantitative Trait Loci (QTL) Analysis Reveals Both Broad-Spectrum and Isolate-Specific QTL for Scab Resistance in an Apple Progeny Challenged with Eight Isolates of *Venturia inaequalis* / F. Calenge, A. Faure, M. Goerre, C. Gebhardt, W. E. Van de Weg, L. Parisi, and C.-E. Durel. // PHYTOPATHOLOGY, 2004. - Vol. 94.- No. 4.- P.370-379.
10. Murray, M. G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA / M. G. Murray, W. F. Thompson // Nucleic Acids Research, 1980.-V. 10.- P. 4321-4325.
11. Шибата, Д.К. Полимеразная цепная реакция и молекулярно-генетический анализ биоплатов / Д.К. Шибата // Молекулярная клиническая диагностика. – М.: Мир, 1999. – С. 395-427.