

УДК 634.11: 632.4

ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ К ПАРШЕ КЛОНОВЫХ ПОДВОЕВ ЯБЛОНИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

Шамшин Иван Николаевич

кандидат биологических наук, заведующий лабораторией

Ivan_Shamshin@mail.ru

Дубровский Максим Леонидович

кандидат сельскохозяйственных наук, заведующий лабораторией

element68@mail.ru

Мичуринский государственный аграрный университет

г. Мичуринск, Россия

Аннотация. Наиболее распространенным заболеванием яблони является парша. Она наносит значительный ущерб как в сортовых насаждениях яблони, так и в питомниках и маточниках. Представленная работа посвящена оценке устойчивости клонových подвоев яблони к парше с использованием молекулярного маркера. Проведена идентификация гена устойчивости к парше *Rvi6* с использованием наиболее распространенного маркера *VfC*. Проанализированы 32 генотипа клонových подвоев из коллекции Мичуринского ГАУ. Установлено, что среди исследуемых форм не выявлено генотипов с геном *Rvi6*. Идентифицированы генотипы с дополнительным фрагментом размером 400 п.н., возможно являющимся еще одним локусом гена *Rvi*.

Ключевые слова: клоновые подвои яблони, парша, ген *Rvi6*, молекулярные маркеры.

Введение

Одним из важнейших технологических элементов интенсивных насаждений яблони являются слаборослые клоновые подвои. Возделывание садов на таких подвоях имеет ряд преимуществ: раннее вступление в плодоношение, быстрое наращивание урожая, более удобные способы механизации и ухода за растениями, высокая продуктивность, а также ускоренная окупаемость затрат (Будаговский, 1976; Папихин и др., 2016; Соломатин, 2018; Чурикова, 2019).

Одной из важнейших характеристик посадочного материала яблони является устойчивость к возбудителям основных заболеваний.

Самой распространенной болезнью яблони является парша, вызываемая грибом *Venturia inaequalis* (Cocke) Wint. С развитием симптомов данного заболевания у растений повреждается листовая аппарат и нарушается нормальное протекание фотосинтетических процессов. В питомниках и маточных насаждениях в случае применения надкroнового орошения (с помощью спринклеров) развитие болезни протекает сильнее, так как загущенное расположение растений способствует длительному сохранению высокой влажности и их массовому поражению паршой. В связи с этим происходит ухудшение функционального состояния подвойных форм вплоть до значительного угнетения их развития и существенного снижения биологической продуктивности маточных кустов, вследствие чего доля стандартных подвоев окажется минимальной. Однако в ряде плодopитомников мира, находящихся в условиях действия неблагоприятных повышенных температур летнего периода, сочетание капельного и спринклерного орошения позволяет добиться лучшей водообеспеченности выращиваемого посадочного материала. В связи с этим весьма актуальным является отбор устойчивых к парше генотипов клоновых подвоев яблони (Папихин и др., 2016).

Существующий сортимент клоновых подвоев яблони характеризуется значительным разнообразием и вариабельностью. Однако генетические аспекты формирования признаков устойчивости подвойных форм, особенно

отечественной селекции, изучены недостаточно, что затрудняет целенаправленное создание новых генотипов с заданными параметрами признаков.

Современные методы молекулярной биологии существенно дополнили методы селекции растений. Широкое распространение получил метод молекулярных маркеров.

Генетические маркеры представляют собой фрагменты ДНК, соответствующие нуклеотидным последовательностям, входящих непосредственно в структуру агрономически важного гена или сцепленных с этим геном (Мягких, 2009).

У яблони было выявлено более 20 основных генов устойчивости к парше. Они отмечены как у различных сортов, так и у дикорастущих сородичей. Из всех этих генов *Rvi6* (*Vf* в предыдущей номенклатуре), полученный из *Malus floribunda*, наиболее широко используется в различных селекционных программах. Полигенная устойчивость на основе QTL также характерна для яблони. Молекулярные маркеры, связанные с большинством основных генов устойчивости к парше, были идентифицированы, и их положение было картировано в различных группах сцепления (Gardiner et al., 1996; Tartarini, 1999; Tartarini et al., 2000; Hemmat, 2003; Koller et al., 2003; Liebhard et al., 2003; Afunian et al., 2004; Boudichevskaia et al., 2004; Gygax et al., 2004; Patocchi et al., 2004; Patocchi et al., 2005; Soriano et al., 2009; Khajuria et al., 2018).

Однако незначительно уделяется внимание изучению устойчивости клоновых подвоев яблони на генетическом уровне. При этом такие сведения могут быть актуальны для селекционера. Создание устойчивых форм подвоев является актуальным при стремительно изменяющемся инфекционном фоне и появлении новых рас возбудителей. Интерес представляет и получение конкретных сорто-подвойных комбинаций, полностью иммунных к парше.

Целью нашей работы был анализ генетической коллекции клоновых подвоев яблони Мичуринского ГАУ с использованием молекулярного маркера гена устойчивости к парше.

Материалы и методы

Биологическими объектами исследования служили 32 генотипа клоновых подвоев яблони из генетической коллекции Мичуринского ГАУ: 31 – селекции университета и зарубежный подвой G16.

ДНК экстрагировали из молодых листьев с использованием набора Quick-DNA Plant/Seed Miniprep Kit (Zymo Research, USA) согласно протоколу производителя.

Амплификацию проводили в приборе SimpliAmp производства «Applied Biosystems» (USA).

Реакционная смесь для ПЦР объемом 15 мкл содержала: 20 нг ДНК, 1,5 mM dNTP, 2,5 mM MgSO₄, 10 пМ каждого праймера, 1 ед. Taq-полимеразы и 10x стандартный ПЦР-буфер (Thermo Fisher Scientific, UK).

Последовательности праймерных пар, используемых для молекулярно-генетического анализа, представлены в таблице 1.

Таблица 1

Последовательности праймерных пар, используемых в работе

№	Название	Последовательность	Температура отжига, °C	Оригинальный автор
1	VfCF	GGTTTCCAAAGTCCAATTCC	58	Afunian et al., 2004
2	VfC R	CGTTAGCATTTTGAGTTGAC		

После амплификации образцы разделяли путем электрофореза в 2% агарозном геле, затем анализировали в ультрафиолетовом свете и фотографировали с использованием цифровой фотокамеры.

Результаты исследований и обсуждение

Идентификацию гена устойчивости к парше яблони проводили с использованием ранее созданного и успешно используемого в селекции яблони маркера *VfC*. Данный маркер создан на основании анализа консервативных последовательностей *HcrVf* паралогов и является внутригенным. Надежность его высока, т.к рекомбинация между геном и маркером отсутствует (Afunian et al., 2004; Dunemann et al., 2012).

Маркер очень часто применяется для анализа генетических коллекций и маркер-опосредованной селекции (Talaie et al., 2009; Caffier et al., 2010; Choupannejad R. et al., 2018; Савельев и др, 2014; Козловская и др., 2018).

При амплификации ДНК яблони с праймерами VfCF и VfCR синтезируются фрагменты размером 646 и 484 п.н. Эти фрагменты характерны как для устойчивых, так и для восприимчивых генотипов. Для иммунных форм характерно наличие фрагмента размером 286 п.н. (Xu&Korban, 2002; Afunian et al., 2004).

Анализ электрофоретических спектров ДНК клоновых подвоев яблони показал, что у 25 форм подвоев выявлено наличие двух фрагментов размером 646 и 484 п.н. (табл. 2).

Таблица 2

Результаты анализа гена *Rvi6* у клоновых подвоев яблони

№	Генотип	Размер фрагмента, п.н.		
		484	646	400
1	87-7-12	+	+	+
2	76-3-6	+	+	
3	70-20-20	+	+	
4	Парадизка Будаговского (ПБ, В9)	+	+	
5	57-491	+	+	
6	71-7-22	+	+	
7	Малыш Будаговского (МБ)		+	
8	54-118	+	+	
9	62-396	+	+	
10	83-1-15		+	
11	2-12-10	+	+	
12	2-15-2	+	+	
13	3-4-7	+	+	
14	14-1	+	+	+
15	4-6-5	+	+	+
16	2-9-102	+	+	
17	16-1	+	+	
18	G16	+	+	
19	70-20-21	+	+	
20	2-12-15	+	+	
21	2-9-49	+	+	
22	2-3-49	+		
23	9-1-9	+		
24	9-1-2		+	
25	9-1-1	+		
26	9-1-3	+	+	
27	4-2-50	+		
28	5-21-27	+	+	
29	9-1-4	+	+	
30	9-1-5	+	+	
31	2-3-8	+	+	
32	2-3-17	+	+	

Отмечены генотипы только с одним фрагментом. Так, фрагмент 646 п.н. идентифицирован у подвоев МБ, 83-1-15 и 9-1-2, а у форм 2-3-49, 9-1-9, 9-1-1, 4-2-50 удалось обнаружить только фрагмент 484 п.н. Фрагмент 286 п.н., соответствующий гену *Rvi6*, не был выявлен в коллекционных образцах.

Однако у исследуемых образцов идентифицированы уникальные фрагменты. Так, у клоновых подвоев 87-7-12, 14-1 и 4-6-5 присутствует фрагмент, ориентировочный размер которого составляет 400 п.н. (рис. 1).

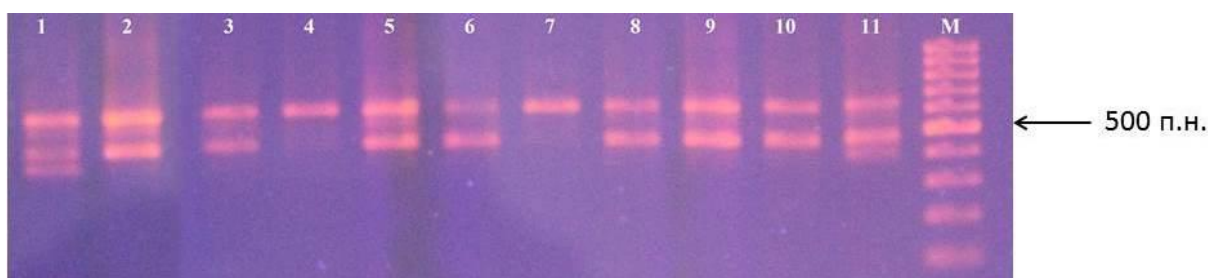


Рисунок 1 – Идентификация гена *Rvi6* у клоновых подвоев яблони: 1 – 87-7-12; 2 – 70-20-20; 3 – ПБ; 4 – 2-3-49; 5 – 57-491; 6 – 71-7-22; 7 – 9-1-9; 8 – 2-9-49; 9 – 2-15-15; 10 – 16-1; 11 – 14-1; М – маркер молекулярного размера (100 п.н.)

В предыдущих работах отмечено, что аналогичный фрагмент был идентифицирован у ряда дикорастущих видов яблони (Savel'ev et al, 2016). Возможно, что данный фрагмент является дополнительным локусом гена *Rvi*. Однако это требует дальнейшего проведения исследований.

Заключение

Проведенные исследования с использованием молекулярного маркера *VfC* показали, что в коллекции клоновых подвоев яблони не выявлен ген устойчивости к парше *Rvi6*. Установлено наличие дополнительного фрагмента, ранее идентифицированного только у дикорастущих видов яблони.

Список литературы:

1. Будаговский, В.И. Культура слаборослых плодовых деревьев / В.И. Будаговский. – М.: Колос, 1976. – 304 с.
2. Выявление новых комплексных источников устойчивости к болезням яблони с использованием молекулярных методов в Беларуси / З.А.

Козловская, Ю.Г. Кондратенко, Т.А. Гашенко, С.А. Ярмолич // Садоводство и виноградарство. – 2018. - № 5. - 23-29.

3. Мягких, Ю.А. Молекулярно-генетический подход к созданию исходного материала в программах селекции / Ю.А. Мягких, Ж.М. Мухина, С.В. Токмаков // Сб.: Селекция сортов риса, устойчивых к абиотическим и биотическим стрессам, для стран умеренного климата и Центральной Азии»: материалы международной научно-практической конференции, 2009. - 60-63.

4. Папихин, Р. В. Устойчивость клоновых подвоев яблони к парше на естественном инфекционном фоне / Р.В. Папихин, М.В. Маслова // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2016. - № 42 (06).

5. Савельев, Н.И. Перспективные иммунные к парше сорта яблони для промышленного садоводства / Н.И. Савельев, Н.Н. Савельева // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2014. - № 2. - 42-44.

6. Соломатин, Н.М. Генофонд вегетативно размножаемых форм яблони для улучшения сортимента подвоев, сырьевых и декоративных сортов в условиях ЦЧР: автореф. дис. ... д. с.-х. н. – М., 2018. – 42 с.

7. Чурикова, Н.Л. Агробιοлогическая оценка новых клоновых подвоев яблони селекции Мичуринского ГАУ в условиях ЦЧР: автореф. дис. ... к. с.-х. н. – Мичуринск, 2019. – 22 с.

8. Afunian, M.R. Linkage Vfa4 in *Malus domestica* and *Malus floribunda* with Vf resistance to the apple scab pathogen *Venturia inaequalis* / M.R. Afunian // Plant Pathology. – 2004. - V 53. – P. 461-467.

9. Aggressiveness of eight *Venturia inaequalis* isolates virulent or avirulent to the major resistance gene Rvi6 on a non-Rvi6 apple cultivar / V. Caffier, F. Didelot, B. Pumo [et al.] // Plant pathology. – 2010. - № 59(6). – P. 1072-1080.

10. Boudichevskaja, A. Identification and molecular analysis of candidate genes homologous to HcrVf genes for scab resistance in apple / A. Boudichevskaja, H. Flachowsky, F. Dunemann // Plant breeding. – 2009. - № 128(1). – P. 84-91.

11. Development of reliable PCR markers for the selection of the Vf gene conferring scab resistance in apple / S. Tartarini, L. Gianfranceschi, S. Sansavini, C. Gessler // Plant breeding. – 1999. - 118(2). - 183-186.
12. Gardiner, S.E. A detailed linkage map around an apple scab resistance gene demonstrates that two disease resistance classes both carry the Vf gene / S.E. Gardiner // Theor. Appl. Genet. – 1996. – № 93. – P. 485-493.
13. Genetics of resistance in apple against *Venturia inaequalis* (Wint.) Cke / Y. P. Khajuria, S. Kaul, A. A. Wani, M. K. Dhar // Tree genetics & genomes. – 2018. - № 14(2). – P. 16.
14. Gyga, M. Molecular markers linked to the apple scab resistance gene Vb₁ derived from *Malus baccata* Jackii / M. Gyga // Theor Appl Genet. – 2004. - № 109. - 1702-1709.
15. Hemmat, M. Mapping and evaluation of *Malus* × *domestica* microsatellites in apple and pear / M. Hemmat, N. F. Weeden, S. K. Brown // Journal of the American Society for Horticultural Science. – 2003. - № 128(4). – P. 515-520.
16. Molecular cloning and analysis of apple HcrVf resistance gene paralogs in a collection of related *Malus* species / F. Dunemann, R. Gläss, S. Bartsch [et al.] // Tree genetics & genomes. – 2012. - № 8(5). - P. 1095-1109.
17. Patocchi, A. Identification by genome scanning approach (GSA) of a microsatellite tightly associated with the apple scab resistance gene Vm / A. Patocchi // Genome. – 2005. - № 48. – P. 630–636.
18. Savel'ev, N. I. Genetic diversity of genus *Malus* Mill. for scab resistance genes / N. I. Savel'ev, A. S. Lyzhin, N. N. Savel'eva // Russian Agricultural Sciences. – 2016. - 42(5). – P. 310-313.
19. Searching for resistance genes to *Venturia inaequalis* in wild and domestic apples in Iran / R. Choupannejad, B. Sharifnabi, M. Bahar, M. Talebi // Scientia Horticulturae. – 2018. - № 232. – P. 107-111.
20. Soriano, J.M. Identification and mapping of the novel apple scab resistance gene Vd3 / J.M. Soriano // Tree Genetics & Genomes. – 2009. - № 5. – P. 475–482.

21. The role of Iran (Persia) in apple (*Malus domestica* Borkh.) domestication, evolution and migration via the Silk Trade Route / A. Talaie, R. Fattahi, H. Hajnajari [et al.] // International Symposium on Molecular Markers in Horticulture. – 2009. - № 859. – P. 229-236.

22. Xu, M. A cluster of four receptor-like genes resides in the Vf locus that confers resistance to apple scab disease / M. Xu, S.S. Korban // Genetics. – 2002. - 162(4). - 1995-2006.

UDC 634.11: 632.4

ESTIMATION OF THE SCAB RESISTANCE OF APPLE CLONAL ROOTSTOCKS USING MOLECULAR MARKERS

Shamshin Ivan Nikolayevich

Candidate of Biological Sciences, Head of Laboratory

Ivan_Shamshin@mail.ru

Dubrovsky Maksim Leonidovich

Candidate of Agricultural Sciences, Head of Breeding laboratory

element68@mail.ru

Michurinsk State Agrarian University

Michurinsk, Russia

Abstract. The most common apple disease is scab. It causes significant damage both in apple orchards and in nurseries and stoolbeds. The presented work is devoted to the estimation of the resistance of apple clonal rootstocks to scab using the molecular marker. The scab resistance gene *Rvi6* was identified using the most common *VfC* marker. 32 forms of clonal rootstocks from the collection of Michurinsk State Agrarian University were analyzed. It was found that among the studied forms, no genotypes with the *Rvi6* gene were identified. Genotypes with an unique additional 400 bp fragment (which is possibly another locus of the *Rvi* gene) were identified.

Key words: apple clonal rootstocks, scab, gene *Rvi6*, molecular markers.