

УДК 634.1:631.52

ЦИТОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ОПЫЛЕНИЯ ИММУННЫХ И УСТОЙЧИВЫХ К ПАРШЕ СОРТОВ ЯБЛОНИ*

CYTOLOGICAL AND GENETIC INVESTIGATION OF POLLINATION CHARACTERISTICS OF IMMUNE AND RESISTANT TO SCAB APPLE VARIETIES

И.И. Супрун, Е.В. Ульяновская, Я.В. Ушакова, Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства, 350901, г. Краснодар, ул. 40 лет Победы, 39, тел. (861) 252-58-65, e-mail: supruni@mail.ru; kubansad@kubannet.ru.
I.I. Suprun, E.V. Ul'yanovskaya, Y.V. Ushakova, SKZNIISV, 40 let Pobedy st., 39, Krasnodar, 350901, Russian Federation, tel. (861) 252-58-65, e-mail: supruni@mail.ru; kubansad@kubannet.ru.

Проведен цитологический анализ опыления иммунных и устойчивых к парше сортов и форм яблони. Определены совместимые и несовместимые комбинации сортов. Выполнена генетическая идентификация некоторых аллелей гена самонесовместимости у ряда сортов яблони отечественной селекции, иммунных к парше.

Ключевые слова: яблоня, устойчивость к парше, ген самонесовместимости, ДНК-маркирование.

Cytological analysis of pollination of immune and resistant to scab apple varieties was carried out. Compatible and incompatible varieties combinations were determined. Incompatibility gene allele's genetic identification in the Russian apple varieties immune to scab was conducted.

Key words: apple, scab resistance, self incompatibility, S-gene, DNA-markers approach.

Обострение проблемы охраны окружающей среды и здоровья людей все более настоятельно требует оптимизировать применение агрохимикатов при выращивании сельскохозяйственных культур. В садоводстве эти вопросы стоят особенно остро, т.к. пестициды в садах наносят непосредственно на части растений, употребляемые в пищу преимущественно в свежем виде [3].

При интенсивном использовании средств химической защиты у патогенных микроорганизмов может развиваться устойчивость к препаратам, ведущая к необходимости увеличения пестицидного пресса в экосистемах. Один из оптимальных путей решения проблемы поддержания благоприятного состояния агрофитоценозов — выращивание иммунных и высокоустойчивых к основным патогенам сортов [5, 6, 10].

Парша — *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint — наиболее вредоносное и широко распространенное на юге России заболевание яблони. Во всех зонах садоводства Северного Кавказа из 10 лет наблюдений отмечено до 8 эпифитотий [9]. Потери урожая от этой болезни — не менее 40%, а в годы массового распространения теряется почти весь урожай [7, 8].

В связи с высокой степенью вредоносности парши селекция на устойчивость к ней является наиболее важным направлением как в отечественной, так и в мировой селекционной практике. Возделывание устойчивых к парше сортов позволяет значительно сократить количество фунгицидных обработок и получать экологичную плодую продукцию с повышенными показателями качества [1, 7].

Совмещение олигогенной и полигенной устойчивости к парше, а также двух и более главных генов устойчивости в одном генотипе представляет интерес для создания сортов с более стабильной, долговременной устойчивостью к болезни [4].

Следует также отметить, что яблоня — основная плодовая культура Краснодарского края — практически самобесплодна. В связи с тем, что это многолетняя культура, подбору эффективных сортов-опылителей при закладке садовых насаждений должно уделяться первостепенное внимание. Способность к опылению у яблони контролируется геном самонесовместимости (S-ген).

С развитием молекулярно-генетических методов было идентифицировано на молекулярном уровне около 20 аллелей гена самонесовместимости в пределах вида *Malus domestica*. Знание аллельного состава S-гена позволит прогнозировать эффективность перекрестного опыления сортов и форм яблони с различными комбинациями алле-

лей гена, что может быть востребовано при разработке сортовых схем садовых насаждений.

Объектами исследования послужили иммунные и устойчивые к парше сорта и гибриды яблони. Для анализа эффективности опыления был использован цитологический анализ, позволяющий охарактеризовать изучаемые формы с точки зрения совместимости при опылении. Для идентификации аллелей гена самонесовместимости использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющий синтезировать целевые участки генома в условиях *in vitro*.

В задачи исследований входила цитологическая оценка эффективности опыления и молекулярно-генетическая идентификация аллелей гена S у иммунных и устойчивых к парше сортов и форм яблони с выполнением предварительной апробации ДНК-маркеров к ряду аллелей изучаемого гена.

Методом люминесцентной микроскопии была изучена совместимость сортов и гибридов для оценки их как опылителей. Цитологические препараты изготавливали по методике Литвак [2], модифицированной нами для семечковых культур, а исследовали при помощи люминесцентного микроскопа МЛ-4 в отраженном ультрафиолетовом свете. Применяемый метод основан на том, что полисахарид каллоза, содержащийся в пыльцевых трубках в большом количестве, поглощая ультрафиолет, излучает свет в видимом диапазоне. Это позволяет наблюдать пыльцевые трубки на препаратах практически по всей их длине.

Установлено, что количество проросших пыльцевых зерен и активность роста пыльцевых трубок в тканях пестика зависит от степени генетической и физиологической совместимости исходных форм. У большинства изученных нами сортов и гибридов отмечено прорастание пыльцы на рыльце пестика через 5–18 ч после гибридизации. В комбинациях, где качество опылителя использовали триплоидные сорта и гибриды яблони (Родничок, Союз, Тайна, 44-27-28-в), проросшей пыльцы на рыльце пестика было мало, в тканях пестика прорастали единичные пыльцевые трубки, входение в семязпочку наблюдалось на третьи сутки после опыления.

В физиологически несовместимых комбинациях наблюдалось подавление роста пыльцевых трубок в тканях пестика, уже в первой 1/3 его длины происходил поворот в обратном направлении и прекращение роста. В этом случае бесплодие — результат нарушения обмена веществ между тканями столбика и пыльцевой

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края (проект № 09-04-96552)

трубкой.

В высокосовместимых комбинациях не все пыльцевые трубки, активно начавшие свой рост на рыльце и в тканях пестика, достигают завязи. Активный рост пыльцевых трубок на рыльце и далее по всей длине пестика (свыше 60%) отмечен в комбинациях Анис кубанский × Прима, Кубань × Прима, Кубань × Редфри, Кубань × Джонафри, Прима × Джонафри, Прима × Либерти, Прима × Талисман, Либерти × Прима, Либерти × Редфри, Либерти × Джонафри, Любава × 44-30-6, Талисман × 44-30-6, Кармен × 44-30-8, Родничок × Фортуна, Талида × Любава, Палитра × Любава, Палитра × Флорина, Золотое летнее × Редфри, Золотое летнее × Прима, Золотое летнее × Красный янтарь, Золотое летнее × Красный мак, Золотое летнее × Сочи 4-5, Купава × Любава, Купава × Василиса.

В ходе люминесцентного анализа было установлено, что лучшими опылителями являются иммунные к парше сорта и формы Редфри, Сочи 4-5, Любава, Талисман, Кармен, Прима, Джонафри, Фортуна, а также устойчивые к парше сорта Золотое летнее, Престиж, Орион, Линда.

Несовместимыми оказались комбинации Флорина × Любава, Василиса × Любава, Василиса × Тайна, Купава × Красный мак, 44-27-52-сз × Любава, 44-27-52-сз × Красный мак, 44-27-52-сз × Родничок, 44-27-52-сз × Редфри, 44-27-32-сз × Прима, Родничок × 44-27-29-в, 44-27-60-с × Родничок.

Сорта и гибриды, входящие в эти комбинации, в дальнейшем будут проанализированы с использованием ДНК-маркерного анализа с целью идентификации аллельного набора S-гена у них. Сопоставление и анализ данных цитологического и молекулярно-генетического анализа S-гена позволит разработать ряд подходов, направленных на прогнозирование эффективности опыления яблони.

На начальном этапе идентификации аллелей гена провели апробацию ДНК-маркеров для аллелей S2, S3. Для этого оптимизировали ряд параметров полимеразной

цепной реакции (ПЦР) с целью максимально эффективного синтеза целевых участков при минимальном «выходе» неспецифически синтезированных фрагментов.

В результате апробации ДНК-маркеров к аллелям S-гена S2, S3 была выполнена оптимизация ряда параметров ПЦР для ДНК-маркеров данных аллелей. Оптимальная температура отжига для них 55°C, при длительности цикла отжига 30 с. Общее количество циклов реакции — 30. Оптимальной концентрацией дезоксинуклеотидтрифосфатов в ПЦР-смеси определили концентрацию 0,3 мМ, праймеров — 0,3 мМ.

При проведении ДНК-анализа сорта Голден Делишес, несущего вышеуказанные аллели, в ходе электрофоретического разделения продуктов ПЦР для аллелей S2, S3 выявлены продукты размером около 450, 500 пар оснований соответственно, что соответствует литературным данным [11]. После выполненной апробации данные ДНК-маркеры были использованы для выполнения анализа устойчивых к парше сортов яблони с целью идентификации аллельного набора S-гена у них.

В ходе работы провели идентификацию аллелей S2 и S3 у ряда сортов яблони, несущих гены устойчивости к парше — Афродита, Солнышко, Союз, Рассвет, Василиса (ген Vf), Первинка, Орловский пионер (ген Vm). В результате было определено наличие S2 аллели у сортов Союз и Рассвет, S3 аллели — у сорта Солнышко.

Таким образом, выделены высокосовместимые комбинации опыления и лучшие сорта-опылители, отобран материал для дальнейшей идентификации аллелей S-гена с использованием молекулярно-генетических методов анализа. Выполнена апробация ДНК-маркеров аллелей S2, S3 данного гена; идентифицированы S2-, S3-аллели у некоторых иммунных к парше сортов яблони. В дальнейшем результаты работы будут использованы в исследованиях, направленных на идентификацию аллелей гена самонесовместимости у отечественных сортов яблони, а также для разработки подходов к прогнозированию эффективности опыления. □

Литература

- Инденко И.Ф. Роль устойчивых сортов и конструкций насаждений яблони в решении проблем адаптивного садоводства / Инденко, И.Ф., Смагин, Н.Е. // Проблемы и перспективы адаптивного садоводства России: Тез. докл. Всерос. научн.-метод. совещ., Москва, 14–17 сентября, 1994. — М., 1994. — С. 127–129.
- Литвак А.И. Люминесцентная микроскопия в исследованиях плодовых культур и винограда. — Кишинев: Штиница, 1978. — 111 с.
- Подгорная М.Е. Степень загрязнения почв садового агроценоза инсектицидами // Организационно-экономический механизм инновационного процесса и приоритетные проблемы научного обеспечения развития отрасли. — Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2003. — С. 257–260.
- Программа и методика селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур. — Орел, 1995. — 503 с.
- Савельев Н.И., Юшков А.Н., Акимов М.Ю., Чивилев В.В., Чмир Р.А. Сорта плодовых растений с генетической устойчивостью к болезням // Селекционно-генетическое совершенствование породно-сортового состава садовых культур на Северном Кавказе. — Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2005. — С. 88–92.
- Сатибалов А.В., Гучапшев Р.Х., Беккиев Т.Ю. Сорта семечковых культур селекции СКНИИСПС для экологизации садоводства юга России // Новации и эффективность производственных процессов в плодоводстве. — Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2005. — С. 167–171.
- Седов Е.Н. Селекция семечковых культур на устойчивость к парше и мучнистой росе — приоритетное направление науки // Садоводство и виноградарство. — 1992. — №1. — С. 11–14.
- Седов Е.Н. Устойчивость яблони к парше / Седов, Е.Н., Жданов, В.В. — Орел, 1983. — 113 с.
- Смольякова В.М. Роль биотических факторов в управлении патосистемами садовых агроценозов // Системообразующие экологические факторы и критерии зон устойчивого развития плодоводства на Северном Кавказе. — Краснодар, 2001. — С. 94–140.
- Ульяновская Е.В. Новые иммунные к парше формы яблони для южной зоны садоводства // Садоводство и виноградарство. — 2007. — №6 — С. 15–16.
- Broothaerts W. New findings in apple S-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some S-alleles // Theor Appl Genet. — 2003. — V. 106 — P. 703–714.