

УДК 634.11:632.4:57.088

КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К СОЗДАНИЮ УСТОЙЧИВЫХ К ПАРШЕ СОРТОВ ЯБЛОНИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ*

THE COMPLEX APPROACH FOR DEVELOPMENT OF SCAB RESISTANCE APPLE VARIETIES USING MOLECULAR GENETIC METHODS

И.И. Супрун, Е.В. Ульяновская, Я.В. Ушакова, Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства Россельхозакадемии, 350901, Россия, Краснодар, ул. 40 лет Победы, 39, тел.: (861) 252-58-65, e-mail: supruni@mail.ru
Е. Н. Седов, Г.А. Седышева, З.М. Серова, Всероссийский НИИ селекции плодовых культур Россельхозакадемии, 302530, Россия, Орел, п/о Жилина, тел.: (84862) 45-60-55, e-mail: info@vniispk.ru
I.I. Suprun, E.V. Ul'yanovskaya, J.A.V. Ushakova, North Caucasian Zone Scientific Research Institute of Gardening and Wine Growing, 350901, Russian Federation, Krasnodar, Street of 40 years of the Victory, 39, tel: (861) 252-58-65, e-mail: supruni@mail.ru
E.N.Sedov, G.A.Sedyшева, Z.M.Serova, All-Russian Scientific Research Institute of Selection of Fruit Crops, 302530, Russian Federation, Orel, Zhilin post office, tel.: (84862) 45-60-55, e-mail: info@vniispk.ru

Выполнена оценка и отбор селекционных форм и сортов яблони по комплексу хозяйственно ценных признаков. С применением молекулярно-генетических методов подтверждено наличие гена устойчивости к парше *Vf* у отобранных форм.

Ключевые слова: яблоня, устойчивость к парше, ДНК-маркерный анализ.

Estimation and selection of apple forms and varieties according to complex of agronomically valuable traits was performed. Molecular genetic methods were used for confirmation of presence of scab resistance gene *Vf*.

Key words: apple, scab resistance, DNA-markers analysis.

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 обуславливается еще и тем фактором, что в последнее время отмечается потеря чувствительности грибных патогенов к фунгицидным препаратам, а также изменение биологических особенностей возбудителей заболеваний и увеличение их вредности.

На сегодняшний день наиболее вредоносным грибным заболеванием для яблони на юге России является парша, вызываемая грибом аскомицетом *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. Во всех зонах садоводства Северного Кавказа из 10 лет наблюдений отмечено до 8 эпифитотий [1]. Потери урожая яблок от этой болезни не менее 40%, а в годы массового распространения — теряется почти весь урожай [2, 3].

По причине высокой вредности данного заболевания селекция на устойчивость к парше является наиболее важным направлением как в отечественной, так и в мировой селекционной практике яблони. Создание сортов, несущих два и более главных гена устойчивости, дает возможность получать эффект длительной устойчивости к данному заболеванию [4].

Следует, однако, отметить, что при иммунологической оценке на искусственном инфекционном фоне по фенотипу возможно получение неверных результатов по причине перекрывания спектров устойчивости в случае присутствия нескольких генов устойчивости в исследуемом генотипе.

Решением данной проблемы может являться применение технологии так называемой маркерной селекции (маркер-опосредованной селекции).

Маркерная селекция возникла благодаря развитию методов молекулярного ДНК-маркирования и основана на использовании ДНК-маркеров для идентификации генов, интересующих селекционера.

Одно из неоспоримых преимуществ маркерной селекции в том, что наличие гена определяется напрямую по генотипу, а не через его фенотипическое проявление. Кроме того, использование ДНК-маркирования позволяет проводить оценку практически на всех этапах вегетационного развития растения [5].

Среди генов устойчивости яблони к парше одним из наиболее изученных является *Vf*, расположенный на первой хромосоме. Ген *Vf* обладает наиболее широким спектром устойчивости к патогену. Для данного гена идентифицирован сонаследуемый SCAR ДНК-маркер [6]. Это дает возможность использовать технологию ДНК-маркирования для его идентификации при ведении селекционных программ на устойчивость к парше.

Сорта, создаваемые для условий современного промышленного садоводства помимо устойчивости к патогенам должны обладать всем комплексом хозяйственно ценных признаков. Поэтому для создания высокопродуктивных, устойчивых сортов яблони наиболее перспективно использование в качестве родительских форм комплексных доноров ценных признаков.

В связи с этим в задачи наших исследований входит комплексная оценка и отбор селекционных форм для дальнейшей селекционной работы, а также выполнение молекулярно-генетической идентификации гена устойчивости к парше *Vf* у выделенных форм и сортов яблони.

Объектами исследования послужили отечественные сорта и формы яблони, в том числе и устойчивые к парше, обладающие комплексом хозяйственно ценных признаков.

Исследования по оценке селекционного материала проводили согласно следующим принятым программам: «Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур» [7], «Программа и методика селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур» [8], «Программа селекционных работ по плодовым, ягодным, цветочно-декоративным культурам и винограду Союза селекционеров Северного Кавказа на период до 2010 г.» [9].

Молекулярную идентификацию гена *Vf* осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим электрофоретическим разделением продуктов ПЦР в 2% агарозном геле. В работе использовали внутригенный ДНК-маркер гена *Vf*, созданный на основе полиморфизма его нуклеотидной последовательности [2]. ПЦР проводили по стандартным методикам. При постановке реакции использовали стандартный набор реактивов с Taq-ДНК полимеразой фирмы «Сибензим».

Для создания новых генотипов яблони, устойчивых к парше и обладающих набором ценных признаков, нами

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и региональных инвесторов: проект № 09-04-99139-р_офи

Таблица 1. Доноры иммунитета к парше, обладающие комплексом хозяйственно ценных признаков

Сорта и элитные формы	Комплекс хозяйственно ценных признаков
12/1-21-61; 12/1-21-74; 28-42-32; 12/1-20-39	Слаборослость, скороплодность, высокие темпы нарастания продуктивности, устойчивость к мучнистой росе, морозоустойчивость, засухоустойчивость, крупноплодность, высокие вкусовые качества плодов
12/1-21-62	Слаборослость, скороплодность, поздний срок цветения, высокие темпы нарастания продуктивности, крупные плоды кандилевидной формы, равномерной желтой окраски, высоких вкусовых достоинств, зимнего срока созревания
Амулет; 44-30-48-з; 12/2-21-4	Слаборослость, скороплодность, высокие темпы нарастания продуктивности, яркая окраска и высокие вкусовые качества плодов
Талисман; 44-24-41-ю; 12/1-21-33	Слаборослость, скороплодность, высокие темпы нарастания продуктивности, устойчивость к мучнистой росе, крупноплодность, высокие вкусовые качества плодов
Купава; 12/3-21-17; 44-29-30-з; 44-24-38-с; 44-29-8-в; 12/2-21-59	Слаборослость, скороплодность, высокие темпы нарастания продуктивности, устойчивость к мучнистой росе, морозоустойчивость, засухоустойчивость, высокие вкусовые качества плодов
Василиса	Слаборослость, скороплодность, высокие темпы нарастания продуктивности, морозоустойчивость, засухоустойчивость, крупноплодность, высокие вкусовые качества плодов, ценный биохимический состав
12/3-21-9; 12/3-20-15; 44-30-45-в; 44-27-79-в; 44-27-75-з	Скороплодность, высокие темпы нарастания продуктивности, устойчивость к мучнистой росе, морозоустойчивость, засухоустойчивость, крупноплодность, высокие вкусовые качества плодов
12/2-20-20; 12/2-20-53	Скороплодность, высокая продуктивность, засухоустойчивость, крупные плоды зимнего срока созревания, высоких вкусовых достоинств
12/1-21-68; 12/1-21-43	Поздний срок цветения, скороплодность, высокая продуктивность, засухоустойчивость, устойчивость к мучнистой росе, крупные плоды зимнего срока созревания, высоких вкусовых достоинств
Красный янтарь, Рассвет	Раннелетний срок созревания, скороплодность, высокие темпы нарастания продуктивности, устойчивость к мучнистой росе, морозоустойчивость, засухоустойчивость, яркая окраска и высокие вкусовые качества плодов

предложен комплексный подход, основанный на использовании как новых (молекулярно-генетических) методов, так и классических, таких как отдаленная гибридизация, полиплоидия, гибридизация с использованием географически и экологически отдаленных пар, повторная гибридизация. При этом молекулярно-генетическая идентификация генов проводится у селекционных образцов, выделенных в отборные и элитные формы. В результате работы в Северо-Кавказском зональном НИИ садоводства и виноградарства совместно с Всероссийским НИИ селекции плодовых культур выделены доноры иммунитета к парше (прошли отбор на искусственном инфекционном фоне во ВНИИСПК) — сорта и элитные формы яблони, обладающие комплексом ценных агробиологических признаков (табл. 1).

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. Программа и методика селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур. — Орел, 1995. — 503 с.
5. Tanksley S.D. Molecular markers in plant breeding // Plant. Mol. Biol. Rep.— 1983.— V. 1.— P. 3—8.

Для подтверждения наличия гена устойчивости Vf на заключительных этапах селекции использовали ДНК-маркирование локуса данного гена. В ходе работы была проведена идентификация доминантной аллели целевого гена у ряда отобранных в ходе предварительной оценки форм яблони.

ДНК-анализ дал возможность четко идентифицировать аллели гена устойчивости яблони к парше Vf (см. рисунок).

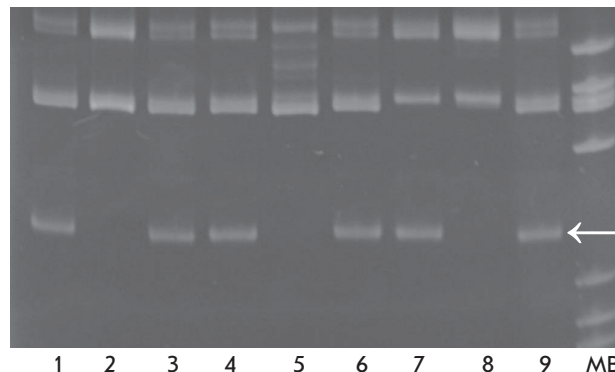


Рис. 1. Электрофоретический анализ ПЦР продуктов ДНК маркера гена Vf.

1 — 12/2-21-4, 2 — 12/2-20-1, 3 — 12/1-21-68, 4 — Василиса, 5 — Первинка, 6 — Солнышко, 7 — Рассвет, 8 — Орловский пионер, 9 — Прима, MB — маркер молекулярного веса ДНК.

Из рисунка видно, что у образцов 1, 3, 4, 6, 7, 9 синтезируется продукт, специфичный только для них (отмечен стрелкой). Данный продукт с молекулярной массой 286 пар оснований синтезируется с участка доминантной аллели гена Vf. В данном случае сортом-стандартом наличия гена Vf являлся сорт Прима, который в настоящее время наиболее часто используется как сорт-донор этого гена в селекционных программах яблони [6]. Образцы 1, 3, 4, 6, 7, так же как и сорт Прима, имеют указанный ПЦР-фрагмент. Это свидетельствует о наличии у них доминантной аллели искомого гена.

В ходе проведения исследований по молекулярной идентификации гена Vf были подтверждены данные фитопатологического тестирования о наличии гена у выделенных по комплексу ценных агробиологических признаков образцов: 12/1-21-74, 12/1-21-62, 12/2-21-4, 12/3-21-17, 12/3-21-9, 12/3-20-15, 12/2-20-20, 12/2-20-53, 12/1-21-68, 12/1-21-43, что свидетельствует об эффективности применения ДНК-маркирования для идентификации данного гена.

В дальнейшем нами планируется продолжить исследование по ДНК-идентификации гена Vf в селекционном материале яблони, совмещающем устойчивость к парше (по данным фитопатологического теста) с комплексом ценных признаков. Предложенный комплексный подход к оценке селекционных форм позволит эффективно отбирать наиболее ценные генотипы, обладающие набором ценных признаков в сочетании с иммунитетом к парше. Привлечение в селекционный процесс ДНК-маркерного анализа дает возможность с высокой степенью точности идентифицировать наличие целевого гена устойчивости в изучаемых селекционных образцах. ■

6. Afunian M. R., 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, 53: 461—467.
7. Программа и методика селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур. — Орел, 1995. — 503 с.
8. Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур. — Орел, 1999. — 606 с.
9. Программа селекционных работ по плодовым, ягодным, цветочно-декоративным культурам и винограду Союза селекционеров Северного Кавказа на период до 2010 г. — Краснодар, 2005. — 343 с.