


ДНК-ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ГИБРИДНОГО ФОНДА ЯБЛОНИ ВНИИСПК НА ПРИСУТСТВИЕ ГЕНА *Vf* УСТОЙЧИВОСТИ К ПАРШЕ

М.А. Должикова , м.н.с.
А.В. Пикунова, к.б.н.
Е.Н. Седов, д.с.-х.н., академик РАН
З.М. Серова, к.с.-х.н.


ФГБНУ ВНИИ селекции плодовых культур, 302530, Россия, Орловская область, Орловский район, д. Жилина, ВНИИСПК, dolzhikova@vniispk.ru

Аннотация

Парша – самое распространенное и вредоносное грибковое заболевание яблони, с которым сталкивается плодоводство во всём мире. Парша яблони вызвана сумчатым грибом *Venturia inaequalis*. Снижение урожая плодовых культур в средней полосе России от поражения паршой составляет не менее 40%, а в отдельные годы может достигать максимального значения – 70...80%. В настоящее время в селекции плодовых культур всё большую роль приобретает использование методов ДНК-маркерного анализа, которые позволяют на ранних этапах развития растения определять гены устойчивости яблони к парше и проводить выбраковку неустойчивых образцов. В статье изложены результаты ДНК-генотипирования гибридных и отборных сеянцев коллекции ВНИИСПК на присутствие *VfC* ДНК-маркера гена устойчивости к парше *Vf*. Протестированы гибридные семьи: № 6388, полученной скрещиванием по схеме Гирлянда × 30-47-88 (Либерти × 13-6-106); № 6389, полученной по схеме скрещивания: Гирлянда × 34-21-39 (30-47-88 × Краса Свердловска); № 6338 (схема скрещивания: Свежесть × Болотовское); № 6333 (Северный Синап × Афродита) и семья № 6339 (схема скрещивания: Свежесть × Пепин Орловский). Всего было протестировано 348 образцов гибридных и отборных сеянцев гибридного фонда Всероссийского научно-исследовательского института селекции плодовых культур. В результате были выявлены образцы, имеющие ДНК-маркер гена *Vf*, а так же образцы, у которых отсутствует ген устойчивости к парше. Проанализированный гибридный фонд представляет собой 5...6-е поколение от *M.Floribunda* 821. Маркер-вспомогательная селекция способствует повышению эффективности селекционных исследований..

Ключевые слова: яблоня, парша, ДНК-маркеры, ПЦР, гены устойчивости

DNA GENOTYPING OF THE HYBRID FUND OF APPLE VNIISPK FOR THE PRESENCE OF VfC DNA MARKER FOR RESISTANCE TO SCAB

M.A. Dolzhikova , research fellow
A.V. Pikunova, cand. boil. sci.
E.N. Sedov, doc. agr. sci., academician of RAS
Z.M. Serova, cand. agr. sci.

Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding, 302530, Russia, Orel region, Orel district, Zhilina, VNIISPK, dolzhikova@vniispk.ru

Abstract

Scab – the most common and harmful fungal disease of Apple, which faces fruit growing worldwide. Apple scab is caused by the marsupial fungus *Venturia inaequalis*. The decrease in the yield of fruit crops in Central Russia from scab damage is not less than 40%, and in some years can reach a maximum value – 70–80%. Currently, DNA-marker analysis becomes important tools in the breeding of fruit crops, which allows determination of resistant genes and culling of undesirable samples at the early stages of plant development. The article presents the results of DNA genotyping of hybrids and elite seedlings of VNIISPK collection for the presence of VfC based DNA marker (Afunian et al., 2004) of *Vf* scab resistance gene. Tested hybrid family: No. 6388, obtained by crossing a Garland 30-47-88 × (liberty × 13-6-106); No. 6389, obtained according to the scheme of crossing: Garland × 34-21-39 (30-47-88 × Beauty Sverdlovsk); No. 6338 (scheme crossing: Freshness × Bolotovskii); No. 6333 (Severny Sinap × Aphrodite) and family No. 6339 (scheme crossing a × Freshness Pepin Orlovskii). A total 348 samples were tested. As a result, samples that have a DNA marker of the *Vf* gene were identified. The analyzed hybrid Fund is the 5th–6th generation of the *M. Floribunda* 821. Marker-assisted selection helps to improve the efficiency of breeding research.

Key words: apple, scab, DNA markers, PCR, resistant genes

Введение

В умеренной климатической зоне из всех возделываемых плодовых культур ведущее место занимает яблоня (*Malus Mill.*) В свою очередь, культура яблони подвержена ряду заболеваний, вызываемых различными патогенами. Самым распространенным и вредоносным заболеванием во всех районах выращивания яблони, в том числе и в Орловской области, на протяжении многих лет остается парша, вызываемая грибом *Venturia inaequalis* (Cokke) Wint. из отдела *Ascomukota*, класса *Ascomycetes*, порядка *Pleosporales*, семейства *Venturiaceae* [2].

Несмотря на высокую изученность патогенна, разработанные на сегодняшний день программы борьбы с ним не обеспечивают стабильной и высокой защиты урожая.

Во Всероссийском научно-исследовательском институте селекции плодовых культур долгие годы одним из направлений работы остается селекция яблони (*Malus Mill.*) на устойчивость к парше (*Venturia inaequalis* (Cokke) Wint.) [6, 7]. В настоящее время выведено на базе института порядка 30 сортов, устойчивых к парше (иммунных, с геном *Vf*) [8].

Исследования популяции *V. Inaequalis* с помощью молекулярных маркеров показали,

что популяции патогена значительно различаются на уровне генома. На данный момент выделяют более 15 генов устойчивости к различным расам парши. Для большого количества генов обнаружены тесно сцепленные ДНК-маркеры и разработаны методики для маркер-опосредованной селекции [3, 4].

В частности, ген *Vf* на данный момент один из самых востребованных генов в селекции яблони на устойчивость к парше. Ген широко используется в селекции и всесторонне изучен молекулярно-генетическими методами.[5, 10]. В настоящее время для гена *Vf* разработан ряд ДНК-маркеров, различных типов для его детекции (SCAR, CAPS и другие) [9].

В статье описаны результаты ДНК-генотипирования нового гибридного фонда и ряда отборных сеянцев коллекции ВНИИСПК.

Материалы и методика исследования

Выделение ДНК проводилось из высушенных молодых листьев СТАВ методом (Diversity Arrays Technology P/L (DArT) (www.DiversityArrays.com)).

Протестировано 348 образцов гибридных и отборных сеянцев. Применяемые ПЦР условия и последовательности праймеров детально описаны у Afunian et al. (2004), использованы следующие пары праймеров: *VfC1F* (5'GGTTTCCAAAGTCCAATTCC3') и *VfC2* (5'CGTTAGCATTTTGAGTTGAC3').

Условия ПЦР следующие: денатурация 5 мин при 95°C, затем 30 циклов – 30 с при 95°C, 56°C – 30 с, 72°C – 30 с; финальная элонгация 72°C – 10 мин. Детекцию продуктов осуществляли путем разделения в 1,7% агарозном геле.

Результаты исследований и их обсуждение

Основное внимание при молекулярно-генетическом изучении уделялось детекции гена *Vf*. Всего было протестировано 320 гибридных сеянцев из пяти гибридных семей (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты молекулярно-генетического анализа гибридов на наличие ДНК-маркера гена *Vf*

Семья, происхождение	Всего, шт	Наличие гена <i>Vf</i> , шт (%)	Отсутствие гена <i>Vf</i> , шт (%)
Семья 6388 Гирлянда × 30-47-88(Либерти × 13-6-106)	145	110 (75,9)	35 (24,1)
Семья 6389 Гирлянда × 34-21-39 (30-47-88 × Краса Свердловска)	113	84 (74,3)	29 (25,7)
Семья 6338 Свежесть (F4 <i>M.floribunda</i> 821) × Болотовское (F5 от <i>M.floribunda</i> 821)	35	24 (68,6)	11 (31,4)
Семья 6333 Северный Синап × Афродита (F4 от <i>M.floribunda</i> 821)	16	11 (68,75)	5 (31,25)
Семья 6339 Свежесть (F4 от <i>M.floribunda</i> 821) × Пепин Орловский	11	5 (45,5)	6 (54,5)

Примечание – полужирным выделены генотипы с геном *Vf*

Проанализированный гибридный фонд представляет собой 5...6 поколение от *M.floribunda* 821 (в семьях, у которых сорт Либерти в родословной, установить поколение не удалось в связи с отсутствием детальной родословной этого сорта вплоть до *M.floribunda* 821).

В гибридной семье № 6388, полученной скрещиванием по схеме Гирлянда × 30-47-88 (Либерти × 13-6-106) протестировано 145 образцов гибридных форм, из которых 110 образцов имеют ген *Vf*, и 35 не имеют ген устойчивости к парше. В процентном

соотношении 75,9% и 21,4% соответственно.

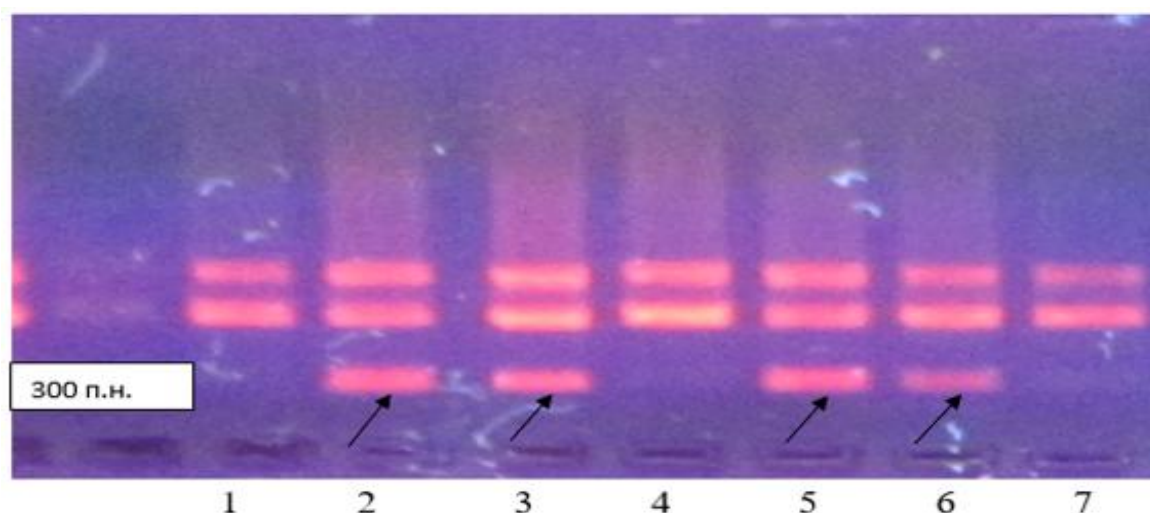
В гибридной семье под номером 6389, полученной по следующей схеме скрещивания: Гирлянда × 34-21-39 (30-47-88 × Краса Свердловска) протестировано 113 образцов гибридных форм, из них 74,3% имеют ген *Vf*, а соответственно 25,7% от общего числа тестируемых образцов данной семьи - нет.

Тридцать пять образцов было протестировано в гибридной семье 6338 (схема скрещивания: Свежесть × Болотовское). Из них наличие и отсутствие гена *Vf* в процентном соотношении составило 68,6 и 31,4% соответственно.

В семье 6333 (Северный Синап × Афродита) было отобрано и изучено 16 образцов, из которых у 11 наблюдалось наличие гена *Vf*, а у 5 – нет.

В семье 6339, полученной от скрещивания Свежесть × Пепин Орловский, протестировано 11 образцов, из которых у 5 образцов присутствует ген *Vf*, а у 6 – нет.

На электрофореграмме (рисунок 1) представлены продукты амплификации с *VfC* праймерами.



1 – 30-30-128; 2 – 35-1-42; 3 – 35-1-31; 4 – 30-30-1; 5 – 35-1-50; 6 – 35-1-70; 7 – 35-1-25

Рисунок 1 – Фрагмент электрофореграммы продуктов амплификации с *VfC* праймерами в 1,7% агарозном геле; указаны фрагменты, размером 286 п.н., которые свидетельствуют о наличии *VfC* маркера гена *Vf*

Помимо анализа гибридных семей, были также протестированы на наличие гена *Vf* 28 отборных сеянцев. Из которых у 17 образцов маркер гена *Vf* обнаружен, а у 11 соответственно – нет (таблица 2).

Селекция на иммунитет к парше обусловленный геном *Vf* впервые в России была начата во ВНИИСПК под руководством селекционера Седова Е.Н. Первоначально донорами иммунитета являлись сеянец 814 (F3 от *M.floribunda* 821), сеянец 1924 (F4 от *M.floribunda* 821), PR12T67 (F3 от *M.floribunda* 821). Привлекаются в селекцию и зарубежные сорта (например, Прима, Либерти). Отборные сеянцы, включенные в изучение, представляют собой 5-6 поколение от *M.floribunda* 821. Для отборных сеянцев в родословных которых сорт Поэзия точное поколение от *M.floribunda* 821 установить не удалось, т.к. Поэзия, вероятно, унаследовала ген *Vf* от неизвестного донора пыльцы.

Таблица 2 – Результаты молекулярно-генетического анализа отборных семян на наличие ДНК-маркера гена *Vf*. сс 34 (кв.26)

Номер семени, поколение от <i>M. floribunda</i> 821	Происхождение	Наличие <i>VfC</i> маркера (1 или 0)
28-37-10 (3х), F5	Афродита (F4 от <i>M.Floribunda</i> 821) × Папировка тетраплоидная	1
30-67-78, F5	Северный синап × Солнышко (от <i>M. Floribunda</i> 821)	1
31-2-96 (3х)	Афродита (F4 от <i>M.Floribunda</i> 821) × 13-6 – 106 (с-ц Суворова)	0
30-32-1 (3х), F5	Прима (F4 от <i>M.Floribunda</i> 821) × Уэлси тетраплоидный	1
31-34-40	23-16-96 (F4 от <i>M.Floribunda</i> 821) × Первинка	0
34-12-75	Свежесть (F4 от <i>M.Floribunda</i> 821) × Пепин Орловский	0
34-37-22, F5	Орлик × Свежесть (F4 от <i>M.Floribunda</i> 821)	1
34-42-67 (3х)	Орлик × 30-47-88 × (Либерти × 13-6-106)	0
31-36-149 (3х), F5	Веньяминовское (F4 от <i>M.Floribunda</i> 821) × 25-35-144 (Уэлси тетр. × Папировка тетраплоидная)	1
30-30-135 (3х)	23-20-74 (F4 от <i>M.Floribunda</i> 821) × Джаент Спай	0
30-32-28	Прима × Уэлси тетраплоидный	0
30-30-1 (3х)	j (F4 от <i>M.Floribunda</i> 821) × 13-6-106 (с-ц Суворова)	0
30-30-138 (3х)	23-20-74 (F4 от <i>M.Floribunda</i> 821) × Джаент Спай	0
30-30-128 (3х)	23-20-74 (F4 от <i>M.Floribunda</i> 821) × Джаент Спай	0
30-30-115 (3х), F5	23-20-74 (F4 от <i>M.Floribunda</i> 821) × Джаент Спай	1
30-29-118 (3х), F5	23-14-86 × 13-6-106 (с-ц Суворова)	1
31-46-98	Неизвестного происхождения	0
28-19-69	21-45-63 (13-76-55 × 13-62-73 × Имрус)	1
35-1-25	Восторг (F5 от <i>M.Floribunda</i> 821) × 25-37-45 (Орл.гирл. × Уэлси тетр.)	0
35-1-31, F6	Восторг (F5 от <i>M.Floribunda</i> 821) × 25-37-45 (Орл.гирл. × Уэлси тетр.)	1
35-1-37, F6	Восторг (F5 от <i>M.Floribunda</i> 821) × 25-37-45 (Орл.гирл. × Уэлси тетр.)	1
35-1-42, F6	Восторг (F5 от <i>M.Floribunda</i> 821) × 25-37-45 (Орл.гирл. × Уэлси тетр.)	1
35-1-45, F6	Восторг (F5 от <i>M.Floribunda</i> 821) × 25-37-45 (Орл.гирл. × Уэлси тетр.)	1
35-1-50, F6	Восторг × 25-37-45 (Орл.гирл. × Уэлси тетр.)	1
35-1-70, F6	Созвездие × 25-37-45 (Орл.гирл. × Уэлси тетр.)	1
35-1-110, F?	Поэзия × 30-47-88 (Либерти × 13-6-106)	1
35-2-117, F6	Московское ожерелье × Кандиль орловский (F5 от <i>M.Floribunda</i> 821)	1
35-2-124, F6	Московское ожерелье × Кандиль орловский (F5 от <i>M.Floribunda</i> 821)	1
26-43-116 (3х)	Северный Синап × Уэлси тетраплоидный	0

Примечание – полужирным выделены генотипы с геном *Vf*.

Выводы

Проведено ДНК-генотипирование нового гибридного фонда яблони ВНИИСПК на присутствие гена *Vf* устойчивости к парше. Выявлены генотипы (гибридные и отборные семена) у которых амплифицируется ДНК маркер гена *Vf*. Из всех протестированных образцов гибридных и отборных семян у 251 обнаружен ген *Vf*

Анализ родословных проанализированного гибридного фонда показал, что большинство генотипов представляют собой 5...6 поколение от *M.floribunda* 821.

Литература

1. Afunian M. R., Goodwin P. H., Hunter D. M. Linkage of *Vfa4* in *Malus* × *domestica* and *Malus floribunda* with *Vf* resistance to the apple scab pathogen *Venturia inaequalis* // Plant Pathology. 2004. Vol. 53, №. 4. P. 461-467. DOI:10.1111/j.1365-3059.2004.01047.x
2. Жданов В. В., Седов Е.Н. Селекция яблони на устойчивость к парше. Тула: Приок. кн. изд-во, 1991. 208 с.
3. Кудрявцев, А.М. Маркер–опосредованная селекция растений // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Минск, 2009. Т. 9. С. 28-31.

4. Пикунова А.В., Князев С.Д., Павловская Н.Е. Молекулярные маркеры хозяйственно ценных признаков ягодных культур //Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии: материалы 18-ой Всероссийской молодежной научной конференции. Орел: ОрелГАУ, 2012. С. 51-53.
5. Савельев Н.И. Генетические основы селекции яблони. Мичуринск: ВНИИГиСПР, 1998. 304 р.
6. Седов Е.Н., Седышева Г.А., Серова З.М. Селекция яблони на полиплоидном уровне. Орел: ВНИИСПК, 2008. 368с.
7. Седов Е.Н., Седышева Г.А., Макаркина М.А., Левгерова Н.С., Серова З.М., Корнеева С.А., Горбачева Н.Г., Салина Е.С., Янчук Т.В., Пикунова А.В., Ожерельева З.Е. Инновации в изменении генома яблони. Новые перспективы в селекции. Орел: ВНИИСПК, 2015. 336 с.
8. Ульяновская Е.В., Супрун И.И., Седов Е.Н., Седышева Г.А., Серова З.М. Ускоренное создание иммунных к парше сортов яблони с использованием молекулярно-генетических методов исследования. Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2011. 55 с.
9. Чесноков Ю.В. ДНК-фингерпринтинг и анализ генетического разнообразия у растений // Сельскохозяйственная биология. 2005. Т.40, №1. С. 20-40.
10. Шамшин И.Н., Савельев Н.И., Кудрявцев А.М. Применение молекулярных маркеров для идентификации генотипов яблони с геном устойчивости к парше. // Плодоводство и ягодоводство России. 2011. 26. С. 126-129.

References

1. Afunian, M.R., Goodwin, P.H., & Hunter, D.M. (2004). Linkage of Vfa4 in *Malus × domestica* and *Malus floribunda* with Vf resistance to the apple scab pathogen *Venturia inaequalis*. *Plant Pathology*, 53(4), 461-467. DOI:10.1111/j.1365-3059.2004.01047.x
2. Zhdanov, V.V., & Sedov, E.N. (1991). *Apple breeding for scab resistance*. Tula: Priokskoe knizhnoe izdatelstvo. (In Russian).
3. Kudryavtsev, A.M. (2009). Marker-assisted selection of plants. In *Molecular and Applied Genetics: Proceedings*. (vol. 9, pp. 28-31). Minsk: Pravo i ekonomika. (In Russian, English abstract).
4. Pikunova, A.V., Knyazev, S.D., & Pavlovskaya, N.E. (2012). Molecular markers of economically valuable traits of berry crops. In *Biotechnology in crop, livestock and veterinary science* P. 51-53. (In Russian).
5. Savelyev N.I. (1998). *Genetic basis for apple breeding*. Michurinsk. (In Russian).
6. Sedov, E.N., Sedysheva, G.A., & Serova, Z.M. (2008). *Apple breeding on a polyploidy level*. Орел: VNIISPK. (In Russian).
7. Sedov, E.N., Sedysheva, G.A., Makarkina, M.A., Levgerova, N.S., Serova, Z.M., Korneyeva, S.A., Gorbacheva, N.G., Salina, E.S., Yanchuk, T.V., Pikunova, A.V. & Ozherelieva, Z.E. (2015). *The innovations in apple genome modification opening new prospects in breeding*. Орел: VNIISPK. (In Russian).
8. Ulyanovskaya, E.V., Sedov, E.N., Suprun, I.I., Sedysheva, G.A., & Serova, Z.M. (2011). *Acceleration of the development of scab immune Apple cultivars using molecular-genetic methods of research*. Krasnodar. (In Russian).
9. Chesnokov Yu.V. (2005). DNA fingerprinting and analysis of genetic diversity in plants. *Agricultural biology*, 40(1), 20-40. (In Russian, English abstract).
10. Shamshin, I.N., Savelyev, N.I., & Kudryavtsev, A.M. (2011). Application of molecular markers for identification of apple genotypes with scab resistance gene. *Pomiculture and small fruits culture in Russia*, 26, 126-129. (In Russian, English abstract).