

МАРКЕР-КОНТРОЛИРУЕМЫЙ СКРИНИНГ ГЕНОТИПОВ ЯБЛОНИ С ИММУНИТЕТОМ К ПАРШЕ

MARKER-ASSISTED SCREENING OF APPLE GENOTYPES WITH IMMUNITY TO SCAB

Савельева Н.Н., Лыжин А.С.

ФГБНУ «Федеральный научный центр им. И.В. Мичурина»,
393770, Россия, г. Мичуринск, ул. Мичурина, д. 30
E-mail: saveleva_natalya_nic@mail.ru, Ranenburzhetc@yandex.ru

Моногенная устойчивость к парше — важный селекционный признак яблони. К настоящему времени идентифицировано 20 генов, детерминирующих иммунитет яблони к различным расам парши. Использование молекулярных маркеров позволяет с высокой надёжностью на ранних этапах онтогенеза определить присутствие в геноме необходимых генов, значительно снизить уровень трудоемкости, уменьшить количество финансовых затрат и сократить время селекционного процесса. Цель исследования — выявление сортообразцов с наличием моногенной устойчивости к парше в коллекции яблони различного эколого-географического происхождения. В задачи исследований входило определение генотипической структуры сортов и гибридных сеянцев по гену Rvi6, выделение генотипов, несущих целевые аллели генов моногенной устойчивости к парше, в том числе с доминантным гомозиготным генотипом (Rvi6Rvi6). Исследования проведены в 2015–2018 гг. на базе генофонда Федерального научного центра им. И.В. Мичурина в Мичуринске-научограде Тамбовской области, насчитывающего около 6 тысяч генотипов с различными качественными показателями как плодов так и самих растений. В статье представлены результаты научных исследований по скринингу генотипов яблони на наличие генов моногенной устойчивости к парше. Молекулярно-генетический анализ позволил отобрать некоторые образцы *M. domestica* Borkh, которые содержат ген Rvi6, обеспечивающий абсолютную устойчивость к *Venturia inaequalis* (Cooke) Wht.). Выделенные генотипы представляют интерес для дальнейших селекционных программ, которые направлены на создание сортов, объединяющих в своем генотипе «пирамиду» генов, обеспечивающих хозяйственно ценные признаки фенотипа.

Ключевые слова: яблоня, гены, устойчивость к парше, молекулярные маркеры.

Для цитирования: Савельева Н.Н., Лыжин А.С. МАРКЕР-КОНТРОЛИРУЕМЫЙ СКРИНИНГ ГЕНОТИПОВ ЯБЛОНИ С ИММУНИТЕТОМ К ПАРШЕ. *Аграрная наука*. 2019;(3):135–137.
<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2019-326-3-135-137>

Яблоня является одной из самых распространенных и ценных плодовых культур по питательным качествам плодов и продуктивности. Она обладает основными показателями для интенсификации производства, что обеспечивает мировое расширение площадей выращивания и рост ее урожайности.

Основные усилия отечественных и зарубежных селекционеров направлены на создание новых генотипов, обладающих высоким потенциалом продуктивности, зимостойкостью, жаро- и засухоустойчивостью, иммунитетом или достаточной полигенной устойчивостью к болезням, высоким уровнем сопротивления к вредителям. При этом недостаточное распространение получила селекция яблони на полный иммунитет к парше — опаснейшему заболеванию средней полосы России, вызываемому грибом *Venturia inaequalis* (Cooke) Wht. Из более 10 тысяч сортов яблони, существующих в мире, сорта с моногенной устойчивостью к парше составляют менее 3%.

Saveleva N.N., Lyzhin A.S.

FSSI "I.V. Michurin Federal scientific Center"
30. Michurin St., Michurinsk, Tambov Region, Russia, 393774

Abstract. Monogenic scab resistance is important breeding trait of apple. To this moment, there were identified 20 genes determined resistances to apple scab of different races. The use of molecular markers allows in the early stages of ontogenesis to determine with high reliability the presence of the necessary genes in the genome, significantly reduce the level of complexity and reduce the amount of financial costs and to reduce the time of the selection process. The purpose of the study is to identify variety samples with the presence of monogenic resistance to scab in the collection of Apple trees of various ecological and geographical origins. The tasks of the research were to determine the genotypic structure of varieties and hybrid seedlings according to the Rvi6 gene, to identify genotypes carrying target alleles of monogenic resistance to scab genes, including those with dominant homozygous genotype (Rvi6Rvi6). Research carried out in 2015–2018 years on the basis of the gene-pool of the I.V. Michurin Federal scientific center in Michurinsk-Naukograd of the Tambov region, numbering about 6 thousand genotypes with different quality characteristics as the fruits and of the plants themselves. The article presents the results of scientific research on screening of apple genotypes for the presence of genes of monogenic resistance to scab. Molecular genetic analysis allowed us to select some samples of *M. domestica* Borkh, which contain the Rvi6 gene, providing absolute resistance to the *Venturia inaequalis* (Juice) Wht.). The selected genotypes are of interest for further breeding programs, which are aimed at creating varieties that combine in their genotype the "pyramid" of genes that provide economically valuable traits of the phenotype.

Key words: apple, genes, scab resistance, molecular markers.

For citation: Saveleva N.N., Lyzhin A.S. MARKER-ASSISTED SCREENING OF APPLE GENOTYPES WITH IMMUNITY TO SCAB. *Agrarian science*. 2019;(3):135–137. (In Russ.)
<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2019-326-3-135-137>

Создание таких сортов является весьма перспективным, так как яблоки-это ценный пищевой продукт и полный иммунитет к парше позволит получать плоды высоких товарно-потребительских качеств и ценного биохимического состава. Выращивание таких сортов позволит улучшить экологическую обстановку вследствие исключения обработок насаждений фунгицидами. В этой связи является очевидным необходимость усиления селекционной работы по созданию отечественных сортов с моногенной устойчивостью к парше, не уступающим по хозяйственно-биологическим показателям лучшим мировым аналогам [1, 2].

К настоящему времени разработаны молекулярные маркеры, позволяющие идентифицировать различные гены, контролирующие устойчивость к парше. Это дает возможность вести скрининг сеянцев по селекционно значимым признакам на начальных стадиях селекционного процесса по аллелям контролирующих генов, а не по фенотипическому проявлению, повысить эффек-

тивность отбора ценных генотипов, сократить площади селекционных садов, сэкономить трудовые и материальные ресурсы и тем самым ускорить селекционный процесс [3, 4].

Для идентификации гена *Rvi6* моногенной устойчивости к парше у исходных форм и гибридных сеянцев яблони были использованы маркеры VfC [5] и AL07-SCAR [6].

Геномную ДНК выделяли из молодых листьев по методу Diversity Arrays Technology P/L (DArT) [7] с модификациями, позволяющими согласно проведенным ранее исследованиям [8, 9] получать экстракт геномной ДНК дикорастущих видов и сортов яблони необходимой для постановки ПЦР концентрации и чистоты.

Реакционную смесь для ПЦР объемом 15 мкл содержала 20 нг ДНК, 1,5 мМ dNTPs, 2,5 мМ MgCl₂, 10 пМ каждого праймера, 1 ед. Taq-полимеразы и 1,5 мМ 10× стандартного ПЦР-буфера. Все компоненты произведены фирмой Thermo Fisher Scientific.

Амплификацию проводили в термоциклере T100 (BIO-RAD) по следующим программам:

- маркер VfC: 94 °C — 4 мин., 30 циклов: 94 °C — 1 мин., 58 °C — 1 мин., 72 °C — 1 мин.; 72 °C — 7 мин.
- маркер AL07-SCAR: 94 °C — 4 мин., 35 циклов: 94 °C — 30 с, 60 °C — 1 мин., 72 °C — 2 мин.; 72 °C — 8 мин.

Разделение ампликонов осуществляли методом электрофореза в 2% агарозном геле. Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали маркер молекулярной массы Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Ген *Rvi6* локализован в группе сцепления 1 в локусе гомологичных рецептор-подобных генов *HcrV₁1*, *HcrV₁2*, *HcrV₁3*, *HcrV₁4*, один из которых, предположительно, детерминирует устойчивость к *Venturia inaequalis* [5, 10].

На основании анализа консервативных последовательностей *HcrV₁* генов подобран внутригенный маркер VfC, позволяющий идентифицировать устойчивые к парше генотипы. Целевыми продуктами маркера VfC являются фрагменты размером 646, 484 и 286 п.н. Фрагменты размером 646 и 484 п.н. амплифицируются как у устойчивых, так и у восприимчивых сортов яблони. Фрагмент размером 286 п.н. характерен только для иммунных к парше по гену *Rvi6* форм [5].

Проведенный анализ сортов и гибридных сеянцев с использованием маркера VfC подтвердил наличие в геноме доминантного аллеля гена *Rvi6* у отечественных сортов Былина, Чародейка, Красуля, Свежесть, Кандиль орловский, Академик Казаков, Рождественское, а также зарубежных — Топаз, Дьямант, Прима, полученных на основе родительских форм, производных клона *M. floribunda* 821 (рис. 1).

Ген *Rvi6* идентифицирован также у характеризующихся полевым иммунитетом к парше сортов се-

лекции ФНЦ им И.В. Мичурина — Благовест, Вымпел, Скала, Флагман, Фрегат, Успенское.

Сорт Памяти Нестерова не несет ген *Rvi6*, хотя и получен от скрещивания иммунного к парше сорта Летнее иммунное с Галой (рис. 1). Колонновидный сорт Стрела также выведен от гибридизации иммунной к парше формы 25–12 (Прима × Бессемянка мичуринская) с колонной 69–157, но в его генотипе также не присутствует ген *Rvi6*. Не обнаружено искомого гена и в сортах Антоновка обыкновенная, Лобо и колоннах Гейзер, Стела и элитной форме 40–10.

Доминантный аллель гена *Rvi6* выявлен у более 79 % гибридных сеянцев, полученных от скрещивания двух иммунных к парше сортов Кандиль орловский и Былина (рис. 2). В потомствах семей Валюта (*Rvi6*) × Белорусское сладкое (*Rvi6*) и Валюта (*Rvi6*) × Успенское (*Rvi6*) доминантный аллель гена *Rvi6* имели соответственно 74,4 и 78,8% сеянцев.

Для детекции аллельного состояния гена *Rvi6* в геноплазме изучаемых форм яблони был использован маркер AL07-SCAR, картированный на расстоянии 0,2 сМ от гена [11]. На электрофореграмме доминантному аллелю гена соответствует фрагмент размером 570 п.н., рецессивному — 823 п.н. Присутствие обоих фрагментов свидетельствует о гетерозиготном состоянии гена [12].

С использованием маркера AL07-SCAR в гибридном потомстве яблони идентифицированы генотипы с доминантным гомозиготным, гетерозиготным и рецессивным гомозиготным состоянием гена *Rvi6* (рис. 3).

Рис. 1. Электрофоретический спектр маркера VfC сортов и форм яблони: 1 — Былина, 2 — Чародейка, 3 — Красуля, 4 — Стрела, 5 — Свежесть, 6 — Кандиль орловский, 7 — Памяти Нестерова, 8 — Академик Казаков, 9 — Топаз, 10 — Дьямант, 11 — 40–10, 12 — Прима, 13 — Рождественское; М — маркер молекулярного веса

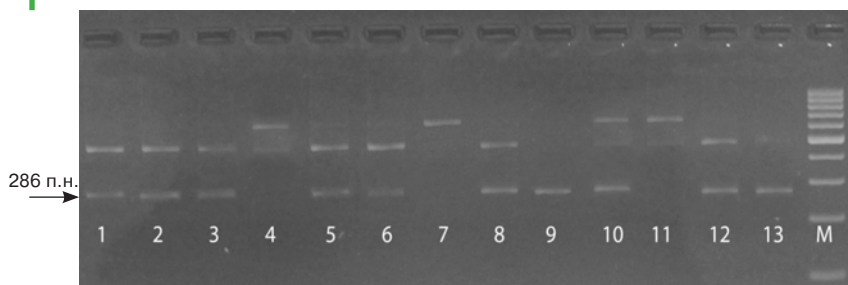


Рис. 2. Электрофоретический спектр маркера VfC гибридной семьи Кандиль орловский Былина: К — Кандиль орловский, Б — Былина, 4–19 — гибридные сеянцы, М — маркер молекулярного веса

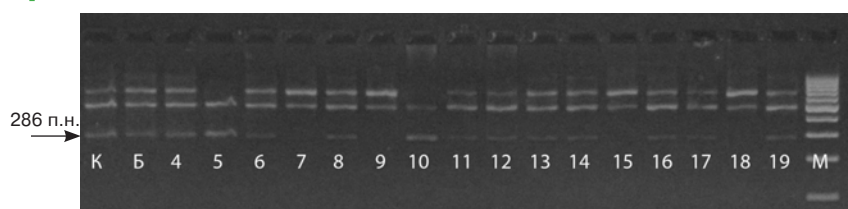
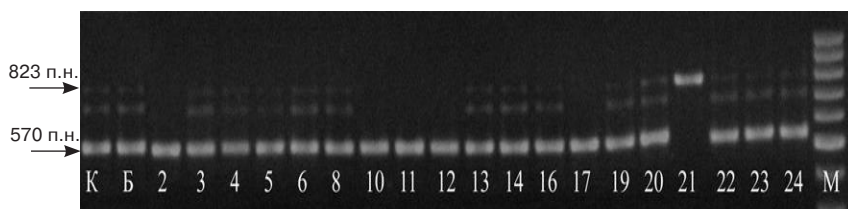


Рис. 3. Электрофоретический спектр маркера AL07-SCAR гибридной семьи Кандиль орловский Былина: К — Кандиль орловский, Б — Былина, 2–24 — гибридные сеянцы; М — маркер молекулярного веса



На представленной электрофореграмме сорта Кандиль орловский, Былина, гибридные сеянцы № 3, 4, 5, 6, 8, 13, 14, 16, 19, 20, 22, 23, 24 — имеют гетерозиготный генотип (*Rvi6Rvi6*); №№2, 10, 11, 12, 17 — доминантный гомозиготный генотип (*Rvi6Rvi6*); сеянец № 21 — рецессивный гомозиготный генотип (*rvi6rvi6*). Общее количество сеянцев с генотипом *Rvi6Rvi6* в комбинации Кандиль орловский х Былина составило 22,9%, с генотипом *Rvi6rvi6* — 56,2% и с генотипом *rvi6rvi6* — 20,8%.

Статистический анализ частот распределения аллелей гена *Rvi6* в гибридном потомстве по критерию χ^2

показал, что с вероятностью 95% фактическое расщепление по генотипу соответствует теоретически ожидаемому 1:2:1, а по фенотипу 3:1.

В результате проведенных исследований с помощью специфических маркеров к гену *Rvi6* выявлена генотипическая структура сортов и гибридных сеянцев яблони. Выделены гомозиготные генотипы по доминантному аллелю гена *Rvi6*, который связан с иммунитетом растений к грибу *Venturia inaequalis* (Cooke) Wht. Такие образцы представляют интерес для селекционных программ яблони, направленных на повышение устойчивости к парше.

ЛИТЕРАТУРА

1. Савельева Н.Н. Биологические и генетические особенности яблони и селекция иммунных к парше и колонновидных сортов. — Мичуринск, 2016. — 280 с.
2. Урбанович О.Ю. Молекулярные методы идентификации и генотипирования яблони и груши. — Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. — Минск: Право и экономика, 2013. — 210 с.
3. Nybom H., Ahmadi-Afzadi M., Sehis J., Hertog M. DNA marker-assisted evaluation of fruit firmness at harvest and post-harvest fruit softening in a diverse apple germplasm // *Tree Genetics and Genomes*, 2013. — V. 9. — P. 279-290.
4. Савельева Н.Н. Генетические особенности и методические подходы в селекции иммунных к парше и колонновидных сортов яблони. — Мичуринск-наукоград РФ, 2014. — 128 с.
5. Afunian M.R., Goodwin P.N., 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. — V. 53. — C. 461-467.
6. Tartarini S., Gianfranceschi L., Sansavini S. Development of reliable PCR markers for the selection of the *Vf* gene conferring scab resistance in apple // *Plant Breeding*. — 1999. — V. 118. — P. 183-186.
7. DArT, 2014 URL: http://www.diversityarrays.com/sites/default/files/resources/DaRT_DNA_isolation.pdf (дата обращения: 10.07.2018).
8. Savel'ev N.I., Lyzhin A.S., Savel'eva N.N. Genetic diversity of genus *Malus* Mill. for scab resistance genes // *Russian Agricultural Sciences*, 2016. — V. 42. — №5. — P. 310-313. Doi: 10.3103/S1068367416050189.
9. Лыжин А.С., Савельева Н.Н. Идентификация генов устойчивости к парше у сортов и гибридных форм яблони с использованием молекулярных маркеров // *Плодоводство и виноградарство Юга России*, 2018. — № 53(5). — С. 1-14. Doi: 10.30679/2219-5335-2018-5-53-1-14.
10. Dunemann F., Gläss R., Bartsch S., Eldin M.A.S., Peil A., Bus V.G.M. Molecular cloning and analysis of apple *HcrVf* resistance gene paralogs in a collection of related *Malus* species // *Tree Genetics & Genomes*, 2012. — V. 8. — P. 1095-1109.
11. Xu M.L., Korban S.S. Saturation mapping of the apple scab resistance gene *Vf* using AFLP markers // *Theor. Appl. Genet.*, 2000. — V. 101. — P. 844-851.
12. Patrascu B., Pamfil D., Sestras R., Botez C., Gaboreanu I., Barbos A., Qin C., Raluca R., Bondrea I., Dirlu E. Marker assisted selection for response attack of *Venturia inaequalis* in different apple genotypes // *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*, 2006. — V. XXXIV — P. 121-132.

ОБ АВТОРАХ:

Савельева Н.Н., доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник
Лыжин А.С., кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник

REFERENCES

1. Saveleva N.N. Biological and genetical features of apple and breeding of scab immune and columnar varieties. — Michurinsk, 2016. — 280 pp.
2. Urbanovich O. Yu. Molecular methods of identification and genotyping of apple and pear. — Institute of Genetics and Cytology of National Academy of Sciences of Belarus. — Minsk: Law and Economics, 2013. — 210 pp.
3. Nybom H., Ahmadi-Afzadi M., Sehis J., Hertog M. DNA marker-assisted evaluation of fruit firmness at harvest and post-harvest fruit softening in a diverse apple germplasm // *Tree Genetics and Genomes*, 2013. — V. 9. — P. 279-290.
4. Saveleva N.N. Genetic features and methodological approaches in the breeding of immune to scab and columnar apple varieties. — Michurinsk-research center RF, 2014. — 128 pp.
5. Afunian M.R., Goodwin P.N., 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. — V. 53. — C. 461-467.
6. Tartarini S., Gianfranceschi L., Sansavini S. Development of reliable PCR markers for the selection of the *Vf* gene conferring scab resistance in apple // *Plant Breeding*. — 1999. — V. 118. — P. 183-186.
7. DArT, 2014 URL: http://www.diversityarrays.com/sites/default/files/resources/DaRT_DNA_isolation.pdf (дата обращения: 10.07.2018).
8. Savel'ev N.I., Lyzhin A.S., Savel'eva N.N. Genetic diversity of genus *Malus* Mill. for scab resistance genes // *Russian Agricultural Sciences*, 2016. — V. 42. — №5. — P. 310-313. Doi: 10.3103/S1068367416050189.
9. Lyzhin A.S., Saveleva N.N. Identification of the scab resistance genes in the varieties and hybrid forms of apples with the molecular markers // *Fruit growing and viticulture of South Russia*, 2018. — № 53(5). — P. 1-14. Doi: 10.30679/2219-5335-2018-5-53-1-14.
10. Dunemann F., Gläss R., Bartsch S., Eldin M.A.S., Peil A., Bus V.G.M. Molecular cloning and analysis of apple *HcrVf* resistance gene paralogs in a collection of related *Malus* species // *Tree Genetics & Genomes*, 2012. — V. 8. — P. 1095-1109.
11. Xu M.L., Korban S.S. Saturation mapping of the apple scab resistance gene *Vf* using AFLP markers // *Theor. Appl. Genet.*, 2000. — V. 101. — P. 844-851.
12. Patrascu B., Pamfil D., Sestras R., Botez C., Gaboreanu I., Barbos A., Qin C., Raluca R., Bondrea I., Dirlu E. Marker assisted selection for response attack of *Venturia inaequalis* in different apple genotypes // *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*, 2006. — V. XXXIV — P. 121-132.

ABOUT THE AUTHORS:

Saveleva N.N., doctor of biological sciences, leading researcher,
Lyzhin A.S., candidate of agricultural sciences, leading researcher