

УДК 634.1:631.52

UDC 634.1:631.52

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ УСТАНОВЛЕНИЯ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ НАСЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДОНОРОВ ЗНАЧИМЫХ ПРИЗНАКОВ ЯБЛОНИ*

USE OF MOLECULAR GENETIC METHODS OF ESTABLISHMENT OF INHERITANCE LAWS FOR REVEALING OF DONORS OF SIGNIFICANT SIGNS OF THE APPLE-TREE

Супрун Иван Иванович
канд. биол. наук

Suprun Ivan
Cand. Biol. Sci.

Ульяновская Елена Владимировна
д-р с.-х. наук

Ulyanovskaya Elena
Dr. Sci. Agr.

Государственное научное учреждение Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства Россельхозакадемии, Краснодар, Россия

State Scientific Organization North Caucasian Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture of the Russian Academy of Agricultural Sciences, Krasnodar, Russia

Седов Евгений Николаевич
д-р с.-х. наук, академик РАСХН

Sedov Evgeniy
Dr. Sci. Agr., Academician of the RAAS

Седышева Галина Алексеевна
д-р с.-х. наук

Sedysheva Galina
Dr. Sci. Agr.

Серова Зоя Михайловна
канд. с.-х. наук

Serova Zoya
Cand. Agr. Sci.

Государственное научное учреждение Всероссийский НИИ селекции плодовых культур Россельхозакадемии, Орел, Россия

State Scientific Institution All-Russian Research Institute of Horticultural Breeding of the Russian Academy of Agricultural Sciences, Orel, Russia

На основе полученных новых знаний по формированию и проявлению ценных селекционных признаков выделены новые доноры и комплексные доноры значимых признаков яблони.

New donors and complex donors of significant signs of an apple-tree are allocated on the basis of received new knowledge on formation and display of valuable selection signs.

Ключевые слова: СОРТ, ЯБЛОНЯ, ИММУНИТЕТ, ПАРША

Keywords: VARIETY, APPLE-TREE, IMMUNITY, SCAB

Введение. В настоящее время накопление генетического потенциала целесообразно вести на геноплазме адаптивных к стрессовым факторам среды видов или, если это возможно, созданных на их основе сортов, гено-

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и региональных инвесторов (проект № 11-04-96537 р_юг_ц).

типы которых включают в себя гены и блоки генов, обеспечивающих высокую выживаемость и стабильное плодоношение плодового растения при воздействии экстремальных факторов окружающей среды.

Использование в гибридизации наиболее прогрессивных генотипов, совмещающих комплекс значимых признаков высокого уровня на геноплазме адаптивных сортов яблони, способствует получению в дальнейших поколениях максимального совершенствования всех селекционных признаков.

Цель исследований – создание и выделение новых доноров значимых признаков яблони с использованием для идентификации генетической детерминанты целевых признаков методов молекулярного ДНК-маркирования.

Объекты и методы исследований. Научно-исследовательские работы проводили в ГНУ Всероссийский НИИ селекции плодовых культур (г. Орел) и ГНУ Северо-Кавказский зональный НИИ садоводства и виноградарства (г. Краснодар) согласно «Программе и методике селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур» (1995); «Программе и методике сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур» (1999); «Комплексной программе по селекции семечковых культур в России на 2001-2020 гг.» и др.[1-4].

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 [5]. ПЦР проводили по стандартным методикам [6]. При постановке реакции использовали стандартный набор реактивов с Taq-ДНК полимеразой фирмы «Сибензим». Стандарт наличия гена Vf – сорт яблони Прима, гена Vm – сорт Первинка.

Объекты исследования – новые сорта и элитные формы яблони селекции ВНИИСПК и селекции СКЗНИИСиВ совместно с ВНИИСПК.

Обсуждение результатов. В ходе исследований выделены новые доноры иммунитета к парше (*Venturia inaequalis*) на олиго- и дигенной основе, а также на основе совмещения в одном генотипе моногенной и полигенной устойчивости для создания генотипов с долговременной устойчивостью к парше (рис. 1), обладающих комплексом ценных агробиологических признаков, а также доноры диплоидных гамет и колонновидности.

Генетическое происхождение и целевые признаки выделенных доноров иммунитета к парше, диплоидных гамет и колонновидности – сортов и форм яблони нового поколения – приведены в табл. 1.

Таблица 1 – Доноры иммунитета к парше, диплоидных гамет и колонновидности

№ п/п	Сорт, гибрид	Происхождение	Признаки выделения
1	2	3	4
ВНИИСПК			
1.	22-34-86	814 х ПА-29-1-1-63	Донор иммунитета (ген V_f)
2.	29-38-97	Орлик х Река	Донор иммунитета (ген V_r)
3.	31-5-15	Северный синап х Река	Донор иммунитета (ген V_r)
4.	31-5-42	Северный синап х Река	Донор иммунитета (ген V_r)
5.	27-2-274	18-56-146 (SR0523 х 1924) х Бессемянка мичуринская	Донор дигенной устойчивости ($V_m V_f$)
6.	30-61-116	Первинка х 23-16-93 (814 – свободное опыление)	Донор дигенной устойчивости ($V_m V_f$)
7.	27-2-218	16-37-116 (Антоновка краснобочка х SR0523) х 18-61-139 (OR40T43 – свободное опыление)	Донор дигенной устойчивости ($V_m V_f$)
8.	27-1-222	Макфри х 18-36-139 (OR40T43 – свободное опыление)	Донор дигенной устойчивости ($V_f V_r$)
9.	30-33-25	Ремура х 21258 [Уэлси х 18-56-58 (814 х OR38T17)]	Донор дигенной устойчивости ($V_r V_f$)
10.	30-33-76	Река х 21214 (Уэлси х Макфри)	Донор дигенной устойчивости ($V_r V_f$)
11.	25-35-121 (4x)	Уэлси тетраплоидный х Папировка тетраплоидная	Донор диплоидных гамет
12.	25-35-144 (4x)	Уэлси тетраплоидный х Папировка тетраплоидная	Донор диплоидных гамет
13.	25-37-45 (4x)	Орловская гирлянда х Уэлси тетраплоидный	Донор диплоидных гамет
14.	13-6-106 (4x)	Сеянец сорта Суворовец	Донор диплоидных гамет

Продолжение табл. 1

1	2	3	4
15.	30-47-88 (4x)	Либерти x 13-6-106 (сеянец сорта Суворовец)	Донор диплоидных гамет и иммунитета (ген V_f)
16.	Есения	224-18 (SR0523 x Важак) x 22-34-95 (814 x ПА-29-1-1-63)	Донор колонновидности (ген Co) и иммунитета к парше (ген V_f)
17.	29-35-123	Арбат x 23-15-38 (814 – свободное опыление)	Донор колонновидности (ген Co) и иммунитета к парше (ген V_f)
18.	Приокское	224-18 (SR0523 x Важак) – свободное опыление	Донор колонновидности (ген Co) и устойчивости к парше
19.	Поэзия	224-18 (SR0523 x Важак) – свободное опыление	Донор колонновидности (ген Co) и устойчивости к парше
СКЗНИИСчВ			
20.	12/2-20-53	Айдаред x Балсгард 0247E	Донор иммунитета (ген V_f)
21.	12/3-20-31	Делишес x Балсгард 0247E	Донор иммунитета (ген V_f)
22.	12/1-21-9	Блек Стейман x Прима	Донор иммунитета (ген V_f)
23.	12/1-20-57	Блек Стейман x Прима	Донор иммунитета (ген V_f)
24.	12/2-20-56	Айдаред x Балсгард 0247E	Донор иммунитета (ген V_f)
25.	12/1-20-6	Аленушкино x Прима	Донор иммунитета (ген V_f)
26.	12/1-20-34	Делишес x Балсгард 0247E	Донор иммунитета (ген V_f)
27.	12/1-20-71	Айдаред x Балсгард 0247E	Донор иммунитета (ген V_f)
28.	12/3-21-6	Айдаред x Балсгард 0247E	Донор иммунитета (ген V_f)
29.	12/3-21-8	Айдаред x Балсгард 0247E	Донор иммунитета (ген V_f)
30.	12/3-21-17	Голден Делишес тетраплоидный x OR18T13	Донор дигенной устойчивости (V_mV_f)
31.	12/1-21-74	Голден Делишес тетраплоидный x OR18T13	Донор дигенной устойчивости (V_mV_f)
32.	12/1-21-33	Голден Делишес тетраплоидный x OR18T13	Донор дигенной устойчивости (V_mV_f)
33.	12/1-21-19	Голден Делишес тетраплоидный x OR18T13	Донор дигенной устойчивости (V_mV_f)
34.	12/1-20-26	Голден Делишес тетраплоидный x OR18T13	Донор дигенной устойчивости (V_mV_f)
35.	Орфей	Голден Делишес тетраплоидный x OR18T13	Донор дигенной устойчивости (V_mV_f)
36.	Марго	Голден Делишес тетраплоидный x (F_2 M. floribunda x Голден Делишес тетраплоидный)	Донор иммунитета (ген V_f)
37.	Талисман	Редфри x Папировка тетраплоидная	Донор иммунитета (ген V_f)
38.	Любава	Прима x Уэлси тетраплоидный	Донор иммунитета (ген V_f)
39.	Кармен	Прима x Уэлси тетраплоидный	Донор иммунитета (ген V_f)
40.	Екатеринодарское	Прима x Уэлси тетраплоидный	Донор иммунитета (ген V_f)
41.	Фортуна	Прима x Алкмене	Донор иммунитета (ген V_f)
42.	Амулет	Редфри x Папировка тетраплоидная	Донор иммунитета (ген V_f)
43.	Рассвет	Редфри x Папировка тетраплоидная	Донор иммунитета (ген V_f)
44.	44-24-38-с	Редфри x Папировка тетраплоидная	Донор иммунитета (ген V_f)
45.	44-24-49-ю	Прима x Уэлси тетраплоидный	Донор иммунитета (ген V_f)
46.	Василиса	Прима x Уэлси тетраплоидный	Донор иммунитета (ген V_f)



АМУЛЕТ



44-24-49-ю



ФОРТУНА



44-24-38-с

Рис. 1. Доноры иммунитета к парше яблони, обладающие комплексом ценных хозяйственных признаков

В связи с актуальностью вопроса создания иммунных к парше сортов яблони на олиго- и дигенной основе, а также наличием информации о ДНК-маркерах к генам *Vf* и *Vm*, была поставлена задача идентификации искомым генов у новых сортов и форм яблони с помощью данных ДНК-маркеров.

Были отобраны для ДНК-анализа на предмет наличия доминантной аллели гена *Vf* новые сорта и формы яблони из гибридных семей: Прима ×

Уэлси тетраплоидный; Редфри × Папировка тетраплоидная; Голден Делишес тетраплоидный × (F₂ M. floribunda × Голден Делишес тетраплоидный); Голден Делишес тетраплоидный × OR18T13; Айдаред × Балсгард 0247E; Делишес × Балсгард 0247E; Блейк Стейман × Прима; Прима × Алкмене.



12/1-20-34

12/3-21-8

Рис. 2. Доноры иммунитета к парше яблони, обладающие комплексом ценных хозяйственных признаков

В ходе выполнения исследований молекулярно-генетический и цитологический анализ исходных родительских форм яблони позволил определить ценные отцовские формы – доноры иммунитета к парше (ген Vf) с высокой жизнеспособностью пыльцы: Талисман, Любава, Кармен, 12/1-21-9, 12/1-20-57, 12/2-20-56 (>90 %); Екатеринодарское, Фортуна, Рассвет, 44-24-38-с, 12/1-20-6, 12/1-20-34, 12/2-20-53 (>80 %); Василиса, Афродита, 12/1-20-71, 12/3-20-31 (>70 %).

Для идентификации с помощью молекулярно-генетических методов генов иммунитета к парше и гена колонновидности листа 21 гибридной формы были направлены из ВНИИСПК в СКЗНИИСИВ.

Ниже дается краткая характеристика 21 гибридной формы селекции ВНИИСПК с предполагаемыми генами (табл. 2).

В ходе выполнения молекулярно-генетических исследований получены следующие результаты (рис. 3, 4).

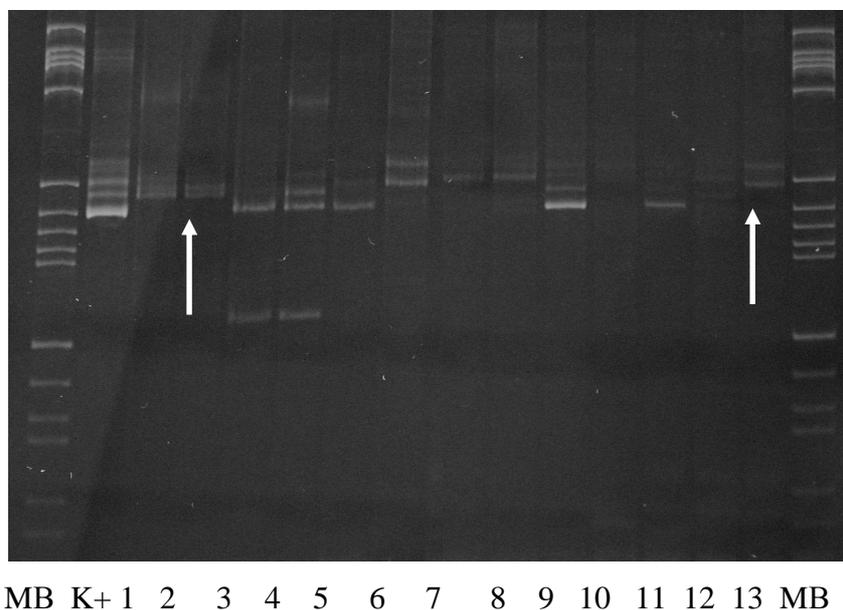


Рис. 3. Электрофоретический анализ ПЦР продуктов ДНК-маркера гена *Vm* у сортов и форм яблони селекции ВНИИСПК

Примечание: MB – маркер молекулярного веса,

K+ – положительный контроль (носитель гена *Vm* сорт Первинка),

1-13 – сорта и элитные формы яблони: 1 – 30-33-123;

2 – 30-33-81; 3 – 27-2-276; 4 – 27-2-274; 5 – 27-1-222; 6 – 31-5-42;

7 – Восторг; 8 – 30-61-116; 9 – Есения; 10 – Созвездие;

11 – Поэзия; 12 – 30-61-110; 13 – 29-7-101

На рис. 3 представлены результаты ДНК-маркерного анализа новых сортов и элитных форм яблони селекции ВНИИСПК. У образцов 3, 4, 5, 9, 11 присутствует продукт, размером около 300 пар оснований (указан стрелкой).

В данном случае сортом-стандартом наличия гена *Vm* являлся сорт яблони Первинка (электрофоретические дорожка K+). Исследуемые образцы, также как и сорт Первинка, имеют указанный ПЦР – фрагмент, что свидетельствует о наличии у них доминантной аллели гена *Vm*.

Таблица 2 – Краткая характеристика сортов и форм яблони для определения молекулярно-генетическими методами предполагаемых по происхождению генов иммунитета к парше (V_f , V_m и V_r) и колонновидности (ген Co)

№ п/п	Форма	Предполагаемые гены	Происхождение	Срок созревания	Масса плодов, г	Внешний вид, балл	Вкус плодов, балл
1.	27-2-274	V_m, V_f	18-56-146 (SR0523 x 1924) x Бессемянка мичуринская	з	110	4,2	3,8
2.	27-2-276	V_m, V_f (ЭЛС)	18-56-146 (SR0523 x 1924) x Бессемянка мичуринская	з	130	4,3	4,2
3.	29-7-101	V_m, V_f	16-37-86 (Антоновка краснобочка x SR0523) x Болотовское	з	130	4,2	4,0
4.	30-61-110	V_m, V_f	Первинка x 23-16-93 (814 – свободное опыление)	п-л	140	4,4	4,3
5.	30-61-116	V_m, V_f (ЭЛС)	Первинка x 23-16-93 (814 – свободное опыление)	п-о	120	4,3	4,3
6.	27-1-222	V_r, V_f	Макфри x 18-61-139 (OR40T43 – свободное опыление)	р-з	90	4,3	4,2
7.	30-33-81	V_r, V_f	Река x 21214 (Уэлси x Макфри)	з	130	4,3	4,1
8.	30-33-123	V_r, V_f	Река x 21214 (Уэлси x Макфри)	з	110	4,1	4,1
9.	29-40-99	V_r	Орлик x Река	з	120	4,2	4,1
10.	29-40-127	V_r	Орлик x Река	з	120	4,2	4,1
11.	29-40-186	V_r	Орлик x Река	з	130	4,3	4,1
12.	29-41-205	V_r	Орлик x Река	з	120	4,2	4,1
13.	31-5-15	V_r	Северный синап x Река	з	110	4,2	3,9
14.	31-5-42	V_r	Северный синап x Река	з	120	4,2	4,1
15.	Приокское	$V_m + Co$	224-18 (SR0523 x Ваяк) – свободное опыление	з	150	4,5	4,4
16.	Поэзия	$V_m + Co$	224-18 (SR0523 x Ваяк) – свободное опыление	з	140	4,4	4,3
17.	Зеленый шум	$V_m + V_f + Co$	224-18 (SR0523 x Ваяк) x 22-34-95 (814 x ПА-29-1-1-63)	з	135	4,4	4,2
18.	Есения	$V_m + V_f + Co$	224-18 (SR0523 x Ваяк) x 22-34-95 (814 x ПА-29-1-1-63)	з	120	4,3	4,2
19.	Созвездие	$V_m + V_f + Co$	224-18 (SR0523 x Ваяк) x 22-34-95 (814 x ПА-29-1-1-63)	з	110	4,2	4,1
20.	Восторг	$V_f + Co$	270 -124 (Маяк x KB103) x 23-17-62 (814 – свободное опыление)	з	130	4,2	4,1
21.	29-35-123	$V_f + Co$ (ЭЛС)	Арбат x 23-15-38 (814 – свободное опыление)	з	130	4,3	4,1

На рис. 4 представлены результаты ДНК-маркерного анализа новых сортов и элитных форм яблони селекции ВНИИСПК. У образцов 1, 2, 4, 5, 6, 7 присутствует продукт, размером около 300 пар оснований (указан стрелкой). Таким образом, исследуемые образцы сортов и форм: Восторг, 30-61-116, Созвездие, Поэзия, 30-61-110 и 29-7-101 имеют указанный ПЦР – фрагмент, что свидетельствует о наличии у них доминантной аллели гена Vf.

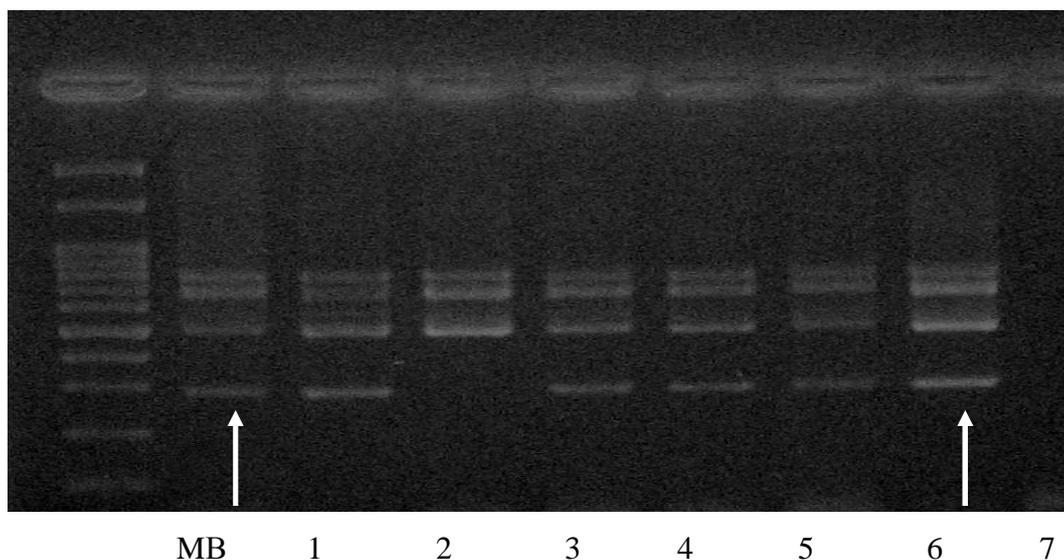


Рис. 4. Электрофоретический анализ ПЦР продуктов ДНК-маркера гена Vf у сортов и форм яблони селекции ВНИИСПК

Примечания: MB-маркер молекулярного веса, 1-6 – сорта и элитные формы яблони:
1 – Восторг; 2 – 30-61-116; 3 – Есения; 4 – Созвездие;
5 – Поэзия; 6 – 30-61-110; 7 – 29-7-101

В ходе выполнения молекулярно-генетических исследований с помощью ДНК-маркерного анализа выделены генотипы яблони селекции ВНИИСПК: Поэзия и 27-2-276, у которых идентифицированы два гена устойчивости к парше Vf и Vm.

Для дальнейшей идентификации двух генов иммунитета к парше (Vf и Vm) с помощью ДНК-маркеров отобраны образцы яблони селекции СКЗНИИСиВ совместно с ВНИИСПК: Орфей, 12/3-21-17, 12/1-21-74,

12/1-21-33, 12/1-21-19, 12/1-20-26 из семьи Голден Делишес тетраплоидный х OR18T13. Отобраны для ДНК-анализа на предмет наличия доминантной аллели гена колонновидности (Co) новые комплексные доноры ценных признаков яблони селекции ВНИИСПК: Приокское, Поэзия, Зеленый шум, Есения, Созвездие, Восторг, 29-35-123.

Заключение. Таким образом, наиболее эффективному и обоснованному выявлению новых доноров значимых признаков способствует использование для идентификации генетической детерминанты целевых признаков методов молекулярного ДНК-маркирования на уникальной коллекции яблони ВНИИСПК и СКЗНИИСиВ. Это позволит создать поколение сортов яблони на новой генетической основе, сочетающих хозяйственно-ценные и адаптивно-значимые свойства, пригодных для ведения интенсивного садоводства, обеспечивающих получение продукции с высокими параметрами экологической безопасности и качества.

Литература

1. Программа и методика селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур. – Орел, 1995. – 503 с.
2. Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур. – Орел, 1999. – 606 с.
3. Комплексная программа по селекции семечковых культур в России на 2001-2010 гг. – Орел, 2001. – 29 с.
4. Программа селекционных работ по плодовым, ягодным, цветочно-декоративным культурам и винограду Союза селекционеров Северного Кавказа на период до 2010г. – Краснодар, 2005. – 343 с.
5. Еремин, Г.В. Ускорение и повышение эффективности селекции плодовых культур / Г.В. Еремин, Р.Ш. Заремук, И.И. Супрун, Е.В. Ульяновская – Краснодар, 2010. – 55 с.
6. Afunian M. R. Linkage Vfa4 in Malus × domestica and Malus floribunda with Vf resistance to the apple scab pathogen Venturia inaequalis / Afunian M. R., Goodwin P. H., Hunter D. M. // Plant Pathology 2004, 53: 461-467.
7. Murray M.G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA / M.G. Murray and W.F. Thompson // Nucleic Acids Research. – 1980.– V.10.– P. 4321-4325.