

КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД В СОЗДАНИИ УСТОЙЧИВЫХ К ПАРШЕ ФОРМ ЯБЛОНИ: ФИТОПАТОЛОГИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ И МАРКЕР-ОПОСРЕДОВАННЫЙ ОТБОР

Супрун И.И., Насонов А.И., Лободина Е.В.,
Володина Е.А.

Северо-Кавказский федеральный научный центр
садоводства, виноградарства, виноделия
350901, Россия, Краснодарский край, г. Краснодар,
ул. им. 40 – летия Победы, 39
e-mail: supruni@mail.ru

Создание высокоустойчивых к парше генотипов яблони повышает рентабельность и экологичность производства основной плодовой продукции. Использование ранней оценки устойчивости получаемых гибридов с помощью фитопатологического тестирования и ДНК-маркеров позволяет ускорить этот процесс. Цель исследования состояла в комплексной оценке устойчивости к возбудителю парши гибридного потомства яблони, полученного от скрещивания восприимчивого (Ренет Симиренко) и устойчивого (Моди – донор гена *Rvi6*) сортов, с использованием естественного инфекционного фона и молекулярного маркирования целевого гена устойчивости. Фитопатологический анализ 207 гибридных сеянцев яблони на естественном фоне выявил 117 (56%) растений без поражений паршой (0 баллов). Оставшиеся сеянцы имели поражения разной степени. ДНК-маркерный анализ по гену *Rvi6* позволил идентифицировать 105 растений (51%) с генотипом *Rvi6rvi6* и 102 (49%) – *rvi6rvi6*, что близко к теоретическому расщеплению 1 : 1, получаемому при скрещивании такого типа. Сопоставление результатов инфекционной оценки и ДНК-маркирования показало 98% совпадений данных о наличии гена устойчивости с отсутствием поражений. В целом комплексное использование методов фенотипической и молекулярной оценки гибридной семьи на устойчивость к *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter показывает высокую степень совпадения результатов. Однако несовпадение качественных классов реакций на инфицирование с результатами молекулярно-генетического анализа указывает на недостаточную силу естественного инфекционного фона года исследования. Низкая интенсивность развития заболевания была обусловлена неблагоприятными погодноклиматическими условиями начала вегетационного периода и становления инфекции, выразившимися в более высокой по сравнению с нормой среднемесячной температурой и небольшим количеством осадков. Полученные нами результаты говорят о преимуществе комплексной оценки устойчивости к возбудителю парши с использованием инфекционного фона и молекулярного маркирования гена *Rvi6*, при котором на первом этапе проводится отбор устойчивых образцов на естественном инфекционном фоне с последующим подтверждением наличия искомого гена с помощью ДНК-маркерного анализа.

Ключевые слова: *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter, устойчивость, *Vf* (*Rvi6*), естественный инфекционный фон, маркер-опосредованный отбор

Прозрачность финансовой деятельности:
авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.
Конфликт интересов отсутствует

Супрун И.И., Насонов А.И., Лободина Е.В., Володина Е.А. Комплексный подход в создании устойчивых к парше форм яблони: фитопатологическое тестирование и маркер-опосредованный отбор. Биотехнология и селекция растений. 2018; 1(1):25-33. DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-25-33

Suprun I. I., Nasonov A. I., Lobodina E. V., Volodina E. A. An integrated approach to creating scab-resistant apple: phytopathological testing and marker-assisted selection. Plant Biotechnology and Breeding. 2018; 1(1):25-33. DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-25-33

AN INTEGRATED APPROACH TO CREATING SCAB-RESISTANT APPLE: PHYTOPATHOLOGICAL TESTING AND MARKER-ASSISTED SELECTION

Suprun I. I., Nasonov A. I., Lobodina E. V., Volodina E. A.

North Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture,
Viticulture, Wine-making
e-mail: supruni@mail.ru

The creation of highly scab-resistant apple genotypes increases the profitability and environmental friendliness of the production of this fruit crop. Early stage evaluation of the resistance using phytopathological testing and DNA markers allows to accelerate the process of breeding for this trait allows the use. The purpose of the study was to comprehensively assess resistance to the causative agent of scab of hybrid seedlings of apple obtained from crossing susceptible (Rennet Simirenko) and resistant (Modi) cultivars for the *Rvi6* gene, using infectious background and marker assisted selection. A phytopathological analysis of 207 hybrid apple seedlings against the natural background of apple scab pathogen revealed 117 (56%) plants without scab lesions (0 points). The remaining seedlings had lesions of varying degrees. DNA marker analysis of the *Rvi6* gene allowed identification of 105 plants (51%) with the *Rvi6rvi6* genotype and 102 (49%) – *rvi6rvi6*, which is close to a theoretical segregation ratio 1:1 in the crosses of this type. Comparison of the results of infectious evaluation and DNA-marker analysis showed 98% coincidence of the presence of the resistance gene with no lesions. In general, the complex use of the phenotypic and molecular markers evaluation of the hybrid family for resistance to *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter shows a high degree of agreement between the results of the methods. However, the discrepancy between the qualitative classes of reactions to infection and the results of molecular genetic analysis indicates an insufficient strength of the natural infectious background of the study year. The low efficiency of the development of the disease was due to the unfavorable weather and climatic conditions at the beginning of the vegetative period and the formation of infection, which were expressed in a higher average monthly temperature and a small amount of precipitation compared to the norm. Our results suggest an advantage, a comprehensive assessment of resistance to the scab pathogen using an infectious background and marker-assisted selection for the *Vf* gene (*Rvi6*) in which the first stage involves the selection of resistant samples against a natural infectious background, followed by confirmation of the presence of the desired gene using a DNA marker analysis.

Key words: *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter, resistance, *Rvi6* (*Rvi6*), natural scab inoculation, marker-assisted selection

УДК 632.4: 632.03: 631.52: 634.11
Поступила в редакцию 16.10.2018
Принята к публикации 26.11.2018

Введение

Потери, обусловленные эпифитотиями грибных фитопатогенов, являются одними из самых существенных в промышленном садоводстве Юга России. Лидирующее значение среди них занимает возбудитель парши яблони *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter. Регион характеризуется благоприятными условиями для широкого распространения заболевания (Yakuba, 2013). Для безопасного и высокоэффективного контроля за развитием патогена, на современном этапе товарного производства плодов рациональным является использование комплексного подхода, включающего как химические и биологические средства защиты, так и создание устойчивых к возбудителю заболевания сортов (Sedov et al., 2013). Применение высокоустойчивых генотипов яблони позволяет минимизировать пестицидный прессинг на агрофитоценоз и улучшить качественные показатели плодов.

Во многих странах-производителях яблок, в том числе и России, рекордно широко используется в селекционной практике ген устойчивости *Rvi6*, интрогрессированный от клона *Malus × floribunda* 821. Этот ген определяет полный иммунитет к пяти расам (1–5) *V. inaequalis*. Такое интенсивное использование этой детерминанты устойчивости в селекции определяется ее эффективностью в течение достаточно продолжительного времени. От момента первого применения гена в 1944 году до сегодняшнего дня прошло уже 74 года (Kozlovskaya, 2004; Sedov et al., 2013). Первые сообщения о его преодолении патогеном в Европе появились в 1993–1994 годах, это были единичные сады Германии (Parisi et al., 1993) и Англии (Roberts, Crute, 1994). И хотя распространение новых рас парши 6 и 7 продолжается, пока что оно ограничивается только территорией Европы, кроме Франции, Нидерландов, Дании, Швейцарии (Parisi et al., 2006), а также включает некоторые восточно-европейские, такие как Чехия, Польша и Беларусь (Vavra, Bocek, 2010; Masny, 2017; Kozlovskaya, 2006; Kozlovskaya et al., 2009). В России эти расы не зарегистрированы.

Временные затраты для создания сортов с длительной устойчивостью к парше яблони затруднены прежде всего изменчивостью возбудителя и возможным появлением его новых вирулентных форм. Преодоление эффективных генов, как это было с геном *Rvi6*, заставляет селекционеров осуществлять поиск новых источников устойчивости или проводить пирамидирование нескольких генов в одном генотипе, которое позволяет получать образцы с длительной устойчивостью.

Накопление данных о взаимодействии патоген-хозяин, не всегда систематическое, привело к необходимости ревизии всех имеющихся на данный момент генов устойчивости яблони к парше и создания коллекции сортов-дифференциаторов. Такая работа была проведена международной группой исследователей (Bus et al., 2010), предложившей новую номенклатуру 17 генов устойчивости с указанием номера расы, к которой ген определяет невосприимчивость растения-хозяина.

Создание новых сортов яблони требует интенсификации процесса селекции. Методическим подходом, ускоряющим селекцию, является оценка устойчивости образцов к болезням на ранних этапах онтогенеза с помощью фитопатологического теста, и/или с использованием ДНК-маркерного анализа, уже ставших важным инструментом в работе селекционера (Kozlovskaya et al., 2009; Suprun et al., 2016). Выбравка зараженных растений в условиях искусственного фона делает возможным исключение до 90%, а в некоторых случаях и 100% восприимчивых генотипов. Успех фитопатологической оценки во многом определяется качественным используемым инокулюмом, который должен иметь достаточно разнообразный биотипный набор патогенного агента, характеризующий состав его популяций в регионе возделывания культуры, а также наличием благоприятных условий для протекания реакции инфицирования растений (Zhdanov, Sedov, 1991). Особо важна достоверность оценки устойчивости к парше на естественном инфекционном фоне из-за отсутствия возможности создания контролируемых условий, оптимальных для развития инфекции.

Для некоторых генов устойчивости яблони к парше, в том числе и для гена *Rvi6* были созданы различные ДНК-маркеры, которые могут быть эффективно использованы в селекции (Gessler et al., 2006). Молекулярное маркирование позволяет оценивать гибридные семьи сеянцев на устойчивость на самых начальных этапах развития растений, значительно сокращая сроки оценки этого важного селекционного признака. Однако согласно современным знаниям, на проявление устойчивости, определяемой геном *Rvi6*, оказывает влияние генное окружение (Gessler et al., 2006). Поэтому некоторая часть потомства, несущая этот ген, может проявлять различные качественные реакции устойчивости, в том числе с незначительным спороношением (Gessler et al., 2006). Необходимо отметить, что в зависимости от родительских форм, некоторые сеянцы, не несущие известных генов устойчивости, могут обладать невосприимчивостью к патогену в силу наличия других генетических детерминант устойчивости. Использование системного подхода для определения устойчивых к парше сеянцев яблони в гибридных семьях с применением, как фитопатологического теста, так и молекулярного маркирования, позволяет получить более полную информацию о характере их устойчивости. Кроме того, немаловажным фактором является экономическая составляющая ДНК-маркерного анализа. Очевидно, что в потомстве, полученном от скрещивания устойчивого к парше сорта с геном *Rvi6* в гетерозиготе (*Rvi6rvi6*) и восприимчивого (*rvi6rvi6*) сорта, 50% потомства будет восприимчиво к патогену, так как будет иметь генотип *rvi6rvi6*. В случае получения гибридных семей значительных объемов (более 500 сеянцев) применение на первом этапе работы фитопатологического тестирования может снизить затраты ресурсов и времени в два раза. В то же время недостаточная сила инфекционного фона может привести к ложной оценке образцов как устойчивых. Поэтому, для получения максимально достоверных данных необходимо

применение ДНК-маркерного анализа в целях подтверждения наличия гена устойчивости.

Цель исследования состояла в комплексной оценке устойчивости к возбудителю парши гибридного потомства яблони, полученного от скрещивания восприимчивого и устойчивого сортов, с использованием естественного инфекционного фона и молекулярных маркеров гена *Rvi6*, и обоснование целесообразности их совместного применения.

Материалы и методы

В работе, выполненной на вегетационной площадке и в лаборатории генетики и микробиологии Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия (СКФНЦСВВ), были исследованы

гибридные сеянцы яблони, полученные от скрещивания сортов Ренет Симиренко (восприимчив к парше) и Моди (устойчив к парше, несет ген *Rvi6* в гетерозиготе) в 2016 г. Гибридные семена извлекали из зрелых плодов, сушили в течение 3-4 дней и хранили в холодильнике при +4°C. Перед высевом семена стратифицировали. Посев осуществляли в открытый грунт весной 2017 г. по схеме 0,5 × 0,05–0,1 м. Все сеянцы этикетировали (рис. 1).

В результате скрещивания было получено 457 гибридных семян. Выход всходов сеянцев составил 236 растений. Фитопатологическому и ДНК-маркерному анализу были подвергнуты 207 оставшихся двухлетних сеянцев. Доля погибших сеянцев ко второму году эксперимента составила 12%.



Рис. 1. Общий вид плотной посадки гибридных сеянцев в школке

Примечание: А – общий вид школки гибридной семьи сеянцев; Б – маркированные сеянцы.

Fig. 1. General view of dense planting of hybrid seedlings in apple seedling nursery

Note: A is a general view of seedling nursery; Б – labeled seedlings.

Оценку сеянцев на устойчивость к парше осуществляли на естественном инфекционном фоне в июле 2018 г. В качестве контроля наличия инфекционного фона служили взрослые деревья восприимчивых сортов Ренет Симиренко и Айдаред, произрастающие в непосредственной близости от школки сеянцев (2 м). Посадки сорта Айдаред представляли собой 12 деревьев возрастом 20 лет, характеризующиеся высоким (5 баллов) ежегодным уровнем поражения паршой яблони на естественном фоне. Ренет Симиренко был представлен двумя трехлетними деревьями, которые поражались на 4 балла. Контрольные деревья и гибридные сеянцы не подвергались обработкам средствами химической защиты в течение всего вегетационного периода.

Метеорологические условия в период вегетации представлены в таблице 1. В целом можно отметить более высокие среднемесячные показатели температуры и низкие

значения влажности и количества осадков текущего года по сравнению с многолетними данными. Наиболее благоприятными для развития заболевания условиями является диапазон температур 19–25°C при влажности от 70% и выше.

Поражение учитывали по шкале качественных классов инфекции, предложенной Chevalier et al. (1991, цит по Gessler et al., 2006) в баллах: 0 – отсутствие признаков поражения; 1 – гиперчувствительный ответ типа «булавочных уколов»; 2 – хлоротические пятна без спороношения; 3а – хлоротические и некротические пятна со слабым спороношением; 3б – как в предыдущем типе, но с более сильным спороношением; 4 – темно-оливковые пятна с обильным спороношением. Также оценку степени поражения вели по количественной шкале, отражающей площадь поражения листа паршой: 0 – листья здоровые; 1 – единичные мелкие пятна, занимающие до 1% поверхности

листа; 2 – поражено 1–10 % поверхности листа; 3 – поражено 11–25% поверхности листа; 4 – поражено 26–50% поверхности листа, пятна крупные, с темным налётом спороношения; 5 – пятна, занимающие более 50% поверхности листа, крупные, сливающиеся, с темным налётом спороношения гриба (Zhdanov, Sedov, 1991).

роношения; 5 – пятна, занимающие более 50% поверхности листа, крупные, сливающиеся, с темным налётом спороношения гриба (Zhdanov, Sedov, 1991).

Таблица 1. Сравнение средних месячных метеорологических характеристик в вегетационный период 2018 г. с многолетними данными
Table 1. Comparison of the average monthly meteorological characteristics of growing season of 2018 with multi-year data

Условия/ Conditions		Месяц/ Month			
		май may	июнь june	июль july	август august
Температура воздуха, °C Air temperature, °C	текущая ¹ current	19,4	24,1	26,2	25,8
	многолетняя ² perennial	17,2	21,3	24,1	23,7
Относительная влажность воздуха, % Relative humidity, %	текущая current	64	53	58	41
	многолетняя perennial	66	68	63	62
Сумма осадков, мм The amount of precipitation, mm	текущая current	43	11	117	57
	многолетняя perennial	68	86	56	44
Количество дней с осадками Number of days with precipitation	текущее current	8	5	11	2
	многолетнее perennial	14	14	10	9

Примечание: ¹метеорологические показатели текущего года исследования, составлены на основании данных интернет-портала rp5.ru (номер метеостанции 34927, Круглик);

²многолетние показатели были получены с использованием данных интернет-портала pogodaiklimat, точка удалённого доступа <http://www.pogodaiklimat.ru/climate/34927.htm>.

Note: ¹the current year meteorological indicators of the study compiled on the basis of data from the Internet portal rp5.ru (meteorological station number 34927, Kruglik);

²long-term indicators were obtained using data from the Internet portal pogodaiklimat, remote access point <http://www.pogodaiklimat.ru/climate/34927.htm>.

Экстракцию ДНК из молодых листьев проводили методом, основанным на использовании буфера с ЦТАБ (Murray, 1980). ПЦР проводили в 25 мкл смеси содержащей 50-70 нг ДНК, 0,1 mM dNTPs (дезоксинуклеотидтрифосфаты), 0,3 мкМ каждого праймера; 2,5 мкл 10X реакционного буфера, 2,5 mM MgCl₂, 1 единицу Taq-полимеразы. Условия реакции были следующими: начальная денатурация – 5 мин при 95°C, далее – 35 циклов: денатурация 15 сек 95°C, отжиг праймеров – 30 сек при 58°C, элонгация – 30 сек при 72°C, финальный цикл элонгации – 3 мин при 72°C. Для проведения ПЦР использовали амплификатор Bio-Rad T100. Для проведения ПЦР использовали пару праймеров Vfc1F+Vfc2R, которая амплифицирует три фрагмента размерами 286, 484 и 646 пар нуклеотидов (пн) при наличии доминантного аллеля искомого гена. При отсутствии доминантного аллеля гена *Rvi6* амплифицируется два фрагмента – 484 и 646 пн. Целевым является фрагмент 286 пн (Afunian et al. 2004).

Для электрофоретического анализа продуктов ПЦР использовали 2% агарозный гель. Для окрашивания гелевых

пластин использовали 0,1% раствор бромистого этидия, после чего их фотографировали в ультрафиолетовом свете.

Результаты

На ранних этапах вегетационного периода нами было отмечено регрессивное развитие заболевания исследуемых растений паршой. Так, в середине и в конце мая поражение на контрольных деревьях сортов Ренет Симиренко и Айдаред отмечалось только на уровне 2 баллов и на единичных опытных растениях в виде качественных реакций. В июне изменения в динамике развития болезни не были замечены в обеих группах растений. Только к концу июля было зафиксировано поражение на контрольных растениях на уровне 4–5 баллов и проявление инфекции на значительной части сеянцев. Контрольные растения сорта Айдаред (20-летние деревья) поразились сильнее трехлетних растений сорта Ренет Симиренко.

Значительное влияние на развитие качественного инфекционного фона оказывают погодно-климатические характеристики вегетационного периода года. Сравнение средних месячных метеорологических показателей мая, июня и июля, имеющих критическое значение для развития инфекционного процесса с многолетними значениями (см. табл. 1) показывает отклонения от нормы по некоторым параметрам. Для температуры разница составила +2,1 и +2,2°C для всех рассматриваемых месяцев, т.е. средняя температура этого года оказалась выше по сравнению с нормой. Имелись также отклонения, как по относительной влажности, так и количеству осадков, в основном в сторону более низких значений за исключением показателей по второму параметру в июле. Так, сумма осадков в мае оказалась на 37% ниже нормы, а в июне на 87%. Более низкой оказалась и относительная влажность июля – на 22 % от нормы. Между тем, количество осадков в

июле превысило климатическую норму на 109%. Более высоким оказалось и количество дней с осадками в этом летнем месяце.

Оценка поражения паршой сеянцев яблони с использованием качественной шкалы показало наличие четырех классов реакции: 0, 3а, 3б и 4 (рис. 2). Классы поражений 3а (рис. 2Б) и 3б (2В) различаются степенью развития спороношения и относятся к слабой устойчивости и слабой восприимчивости, соответственно (Clark et al., 2014). Реакции 1 и 2 не были зафиксированы в исследованной выборке сеянцев. Данные оценки с применением количественной шкалы приведены вместе с результатами молекулярно-генетического анализа на наличие гена устойчивости (табл. 2). Сравнение результатов оценки по количественной и качественной шкале показали, что классы поражений 3а и 3б соотносятся с восприимчивой реакцией на 1 балл по количественной шкале.

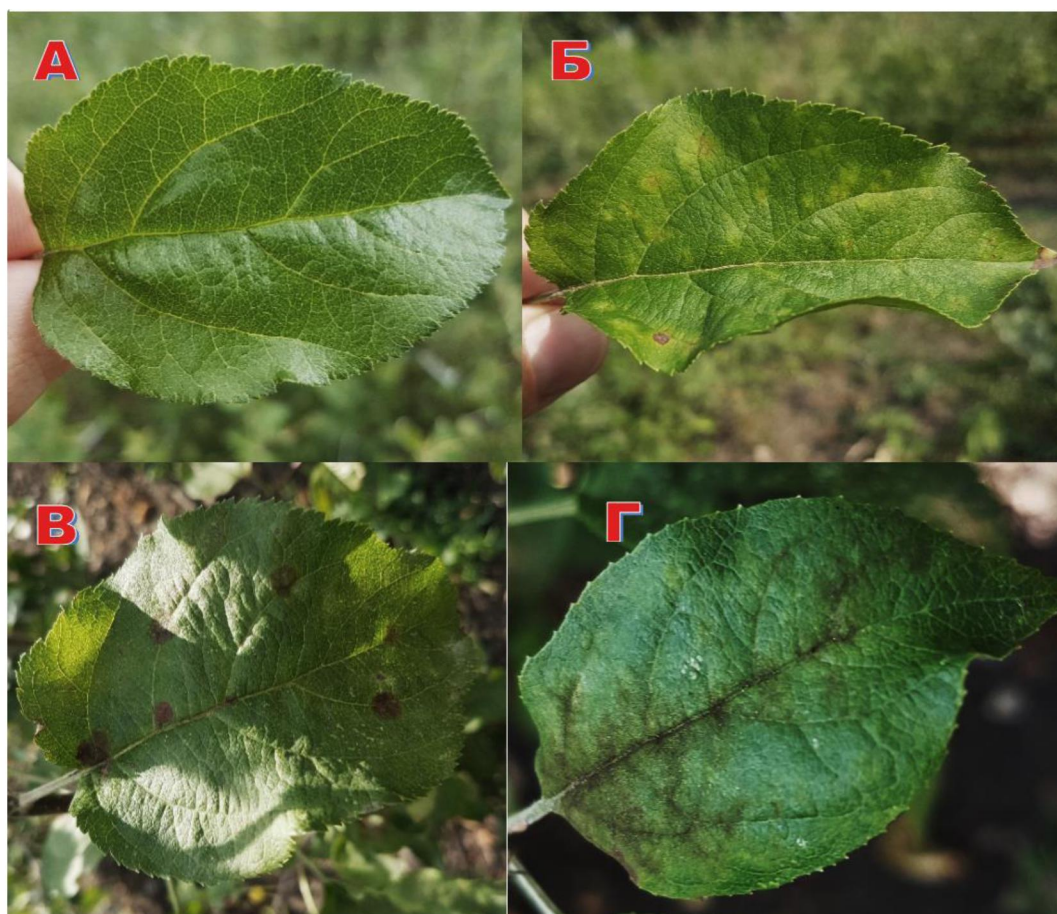


Рис. 2. Типичный вид поражений, идентифицированных в исследовании для различных баллов качественной шкалы Chevalier et al. (1991)

Примечание: А – отсутствие симптомов (0 баллов), Б – хлоротические и некротические пятна со слабым спороношением (балл 3а), В – хлоротические и некротические пятна с более сильным, чем в предыдущем классе спороношением (балл 3б), Г – обильное спороношение (4 балла).

Fig. 1. A typical patterns of lesions identified in the study for different scores using qualitative scale (Chevalier et al., 1991)

Note: A – no symptoms (0), Б – chlorotic and necrotic lesion with weak sporulation (3a), В – chlorotic and necrotic lesion with stronger than in the previous class sporulation (3b), Г – abundant sporulation (4).

**Таблица 2. Оценка устойчивости к парше гибридных сеянцев яблони
с использованием количественной шкалы и молекулярных гена *Rvi6***
**Table 2. Evaluation of hybrid seedlings for resistance to apple scab
quantitative scale and molecular markers of the *Rvi6* gene**

№ п/п	Балл поражения/ Class of infection	<i>Rvi6</i>	№ п/п	Балл поражения/ Class of infection	<i>Rvi6</i>	№ п/п	Балл поражения/ Class of infection	<i>Rvi6</i>	№ п/п	Балл поражения/ Class of infection	<i>Rvi6</i>
1	1	-	52	0	+	103	1	-	156	1	-
2	0	+	53	1	+	104	0	+	157	0	+
3	0	+	54	0	+	105	0	+	158	0	+
4	1	-	55	0	+	106	0	+	159	0	+
5	0	-	56	1	-	107	0	+	160	1	-
6	0	+	57	1	-	108	1	-	161	1	-
7	0	+	58	0	+	109	0	+	162	0	+
8	0	+	59	1	-	110	2	-	163	1	+
9	0	+	60	0	+	111	0	-	164	1	-
10	0	-	61	0	+	112	1	-	165	0	+
11	0	+	62	0	+	113	0	+	166	0	+
12	0	+	63	0	+	114	0	-	167	0	+
13	0	+	64	0	-	115	1	-	168	0	+
14	0	+	65	0	+	116	0	+	169	0	+
15	0	+	66	0	+	117	0	+	170	0	+
16	0	-	67	1	-	118	2	-	171	1	-
17	1	-	68	4	-	119	0	+	172	1	-
18	1-2	-	69	3	-	120	1	-	173	0	+
19	0	+	70	0	+	121	3	-	174	0	+
20	0	+	71	0	+	122	2	-	175	0	-
21	0	+	72	0	+	123	0	+	176	0	+
22	2	-	73	1	+	124	0	+	177	1	+
23	0	+	74	0	+	125	2	-	178	1	-
23/1	1	-	75	1	-	126	3	-	179	0	+
24	0	+	76	1	-	127	0	+	180	0	-
25	2	-	77	1	-	128	0	+	181	2	-
26	1	-	78	1	-	129	0	+	182	0	+
27	0	+	79	0	+	130	0	+	183	0	+
28	0	+	80	0	+	132	1-2	-	184	0	+
29	0	+	81	0	+	133	3	-	185	0	+
30	0	+	82	0	+	134	1	-	186	0	+
31	0	+	83	1	-	135	1	-	187	1	-
32	0	+	84	1	-	136	1	-	188	0	+
33	1	-	85	1	-	137	0	+	189	3	-
34	0	+	86	0	+	138	1	-	190	0	+
35	2	-	87	0	+	139	3	-	191	1	-
36	0	+	88	0	+	140	1	-	192	1	-
37	1	-	89	2	-	141	1	-	193	0	+
38	2	-	90	0	+	142	1	-	194	0	-
39	1	-	91	1	-	143	0	+	195	2	-
40	1	-	92	0	-	144	1	-	196	0	-
41	0	-	93	0	+	145	1	-	197	0	-
42	0	-	94	0	-	146	0	+	198	3	-
43	0	+	95	1	-	147	0	+	199	1	-
44	1	-	96	0	+	148	2	-	200	3	-
45	0	+	97	0	+	149	2	-	201	2	-
46	1	+	98	1	-	150	0	-	202	1-2	-
47	1	-	99	0	-	151	2	-	203	1	-
48	1	-	100	0	+	152	1	-	204	1	-
49	0	+	101	1	-	153	0	+	205	3	-
50	0	+	102	1	-	154	0	+	206	5	-
51	0	+	102/1	0	+	155	0	+	207	1	-

Примечание: «+» – наличие гена *Rvi6*; «-» – отсутствие гена *Rvi6*.

Как видно из таблицы 2, количество растений без поражений (0 баллов) составило 117 (56%). С помощью молекулярных маркеров гена *Rvi6* идентифицированы 105 растений (51%) с генотипом *Rvi6rvi6* и 102 (49%) с генотипом *rvi6rvi6*, что близко к теоретическому расщеплению 1:1, получаемому при скрещивании генотипа, несущего ген *Rvi6* в гетерозиготе с восприимчивым сортом (*rvi6rvi6*).

По результатам молекулярно-генетического анализа, 16 семян, показавшие балл поражения 0, не содержали ген *Rvi6*. Отсутствие развития заболевания у данных растений, очевидно, является следствием влияния фактора окружающей среды в условиях естественного инфекционного фона – наличием неблагоприятных условий для интенсивного развития инфекции.

Согласно имеющимся данным, в условиях искусственного инфекционного фона возможно исключение до 90%, а в некоторых случаях и 100% восприимчивых генотипов

(Zhdanov, Sedov, 1991). Учитывая данный факт, можно сделать вывод о достаточно высоком уровне эффективности использования естественного инфекционного фона, который позволил выбраковать 91 растение из 107 восприимчивых, что составляет 85%.

Как видно из рисунка 3, на котором представлена электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных с парой праймеров, специфичных для гена *Rvi6*, фрагмент размером 286 пн отсутствует у ряда образцов. На электрофореграмме видно, что у образцов 182–186 и 188 имеется данный целевой фрагмент, также присутствующий и у сорта-контроля. В 98% случаев у пораженных на 1–5 баллов генотипов был отрицательный результат на наличие молекулярных маркеров гена *Rvi6*. Всего пять растений (46, 53, 73, 163 и 177) имели несовпадение с ожидаемыми результатами, что согласуется с данными Gessler et al. (2006) о влиянии генного окружения на фенотипическое проявление данного гена.

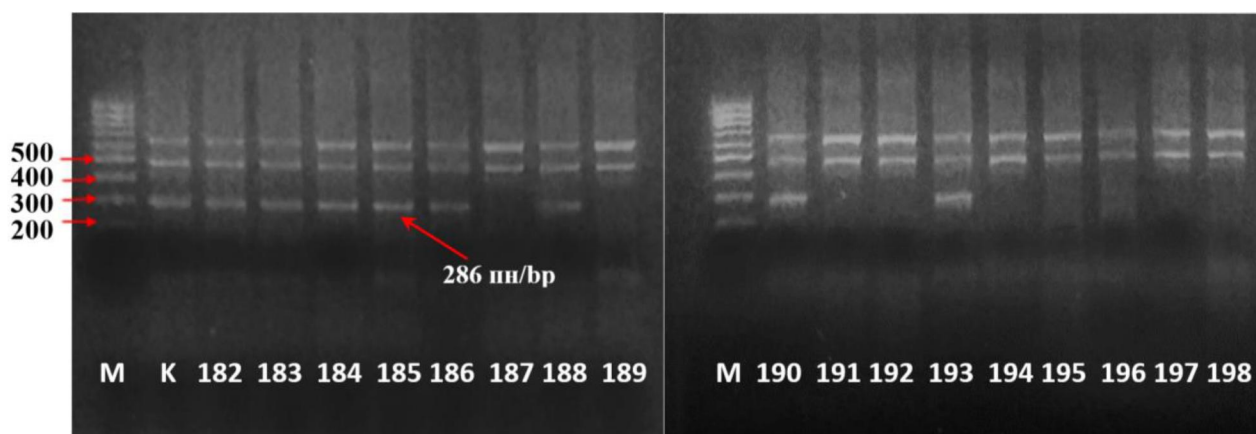


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР, амплифицируемых с использованием пары праймеров VfC1F+VfC2R

Примечание: с левого края рисунка приведены размеры фрагментов маркера молекулярной массы ДНК; длинной красной стрелкой показан целевой ПЦР-продукт; М – маркер молекулярной массы ДНК; К – контрольный образец (сорт Флорина), имеющий ген *Rvi6*; 182–198 – исследуемые образцы

Fig. 3. Electrophoregram of PCR products amplified using primer pair VfC1F+VfC2R.

Note: from the left edge of the figure the sizes (in base pairs, bp) of the DNA molecular weight marker fragments are shown; a long red arrow shows the band of the target PCR product; M – DNA molecular weight marker; K – lane with the control sample having the *Rvi6* gene; 182–198 – the investigated samples

Обсуждение

Анализ погодно-климатических характеристик года исследования показал наличие неблагоприятных условий окружающей среды в начале вегетационного периода для развития сильного естественного инфекционного фона, выразившиеся в более высоких температурах и пониженной влажности. Усиление или ослабление инфекционного фона может происходить не только в результате колебаний инфекционной нагрузки, но и под действием изменений внешних условий в период инокуляции и инкубации. Важность влияния температуры и влажности на успешное развитие парши яблони было показано ранее (Fedorova, 1977; Zhdanov, Sedov, 1991). Влага важна на всех этапах развития патогена и инфицирования растения:

при распространении, закреплении на поверхности хозяина, при прорастании, инвазии и развитии внутри его тканей. Так, для прорастания споры на поверхности листа необходимо не просто увлажнение, а наличие капельно-жидкой воды, такое требование характерно для аэрогенных возбудителей (Fedorova, 1977). Продолжительность периода увлажнения яблони тесно связана с температурой. При создании прогностических кривых скорости становления инфекционного процесса Миллом были учтены количество часов оптимальной влажности при разных показателях температуры (MacHardy, 2001). Keit, Jones (1926, цит. по Zhdanov, Sedov, 1991) установили, что наименьшая продолжительность при заражении аскоспорами колебалась от 13–14 ч при 6°C до 4–6 ч при 20–24°C.

Yakuba (2013) отмечает, что в степных районах Краснодарского края, где количество осадков за вегетационный период составляет 160 мм, а в результате неравномерного ее распределения случаются засухи, вредоносность парши яблони значительно снижена.

В июле достаточное количество дождливых дней обеспечило развитие инфекционного фона, позволившего провести оценку гибридных растений на устойчивость к заболеванию. Кроме факторов окружающей среды на становление инфекционного процесса в этом месяце могло способствовать накопление естественного инфекционного фона в течение сезона. Так Nasonov et al. (2017) отмечают возрастание естественного инфекционного фона ко второму месяцу лета.

Развитие более сильного инфекционного фона на контрольных растениях обусловлено долговременным существованием карантинного необрабатываемого насаждения, особенно сорта Айдаред (20 летний сад), в котором произошёл отбор наиболее агрессивных форм возбудителя. Некоторыми учеными также отмечалось более сильное поражение старых деревьев по сравнению с молодыми, в силу большого загущения и многолетнего накопления инокулаума (Zhdanov, Sedov, 1991).

В целом, комплексное использование фенотипической оценки на естественном инфекционном фоне и молекулярно-генетического анализа гибридной семьи на устойчивость к *V. inaequalis* показывает достаточно высокую степень совпадения результатов, полученных разными методами, между собой.

Несоответствие между некоторыми результатами фитопатологического теста, показавшими отсутствие поражения, и данными молекулярного анализа, не подтвердившими наличие гена устойчивости, может говорить, с одной стороны, об ошибке в одном из методов, а с другой – о наличии другого источника устойчивости к патогену. Наличие другого источника устойчивости к патогену маловероятно, так как используемые в эксперименте родительские сорта хорошо изучены по этим показателям и один них характеризуется полной восприимчивостью. Более вероятна ошибка в результатах фитопатологической оценки, которая могла быть обусловлена недостаточной силой естественного инфекционного фона текущего года на гибридных сеянцах. Это предположение подтверждается, с одной стороны, анализом погодных климатических показателей (см. табл. 1.) начала вегетационного периода, а с другой – слабым развитием инфекции на сортах-контролях в начале вегетационного периода. Таким образом, как качественные реакции на некоторых сеянцах, так и отсутствие симптомов поражения, могли стать результатом остановки развития инфекционного

процесса, а некоторых случаях и гибели патогена, в силу более высоких температур и засушливых периодов года исследований. Так, начавшееся инфицирование могло быть прервано на любом из этапов, в том числе и на стадии спороношения, что приводило к изменению его степени и выражалось в появлении качественных реакций 3а и 3б, носящих частично количественный характер (см. рис. 2.), а также, возможно, и к нарушению распознавания Avr-фактора патогена, обеспечивающего совместимые взаимоотношения с растением-хозяином. Применение ДНК-маркерного анализа позволило подтвердить, как относительную эффективность естественного инфекционного фона для оценки по целевому признаку, так и наличие у устойчивых сеянцев доминантного аллеля гена *Rvi6*.

Заключение

Комплексная оценка гибридной семьи, полученной от скрещивания восприимчивого (*rvi6rvi6*) и устойчивого (*Rvi6rvi6*) сортов яблони на устойчивость к парше с использованием естественного инфекционного фона и молекулярного маркирования показала необходимость такого подхода. С одной стороны, точность фитопатологического тестирования зависит от множества различных факторов, наиболее существенным из которых является влияние погодных климатических условий. С другой стороны, использование только молекулярного маркирования исключает возможность оценки степени проявления устойчивости по конкретному гену в зависимости от его генного окружения или условий окружающей среды. Однако, такая оценка не обладает высокой актуальностью при решении селекционных задач, когда необходим отбор исключительно устойчивых образцов.

Полученные нами результаты говорят в пользу алгоритма, при котором на первом этапе проводится отбор устойчивых образцов на естественном инфекционном фоне, для которых в последствии подтверждается наличие искомого гена с помощью ДНК-маркерного анализа. Такой подход позволяет сократить затраты ресурсов и времени на ДНК-маркерную идентификацию гена устойчивости в два раза за счет выбраковки порядка 50% неустойчивых сеянцев на основании фенотипической оценки.

Полученные в ходе работы гибридные сеянцы, устойчивые к парше с маркером гена *Rvi6*, представляют ценность для использования в селекции по данному признаку.

Благодарности (работа выполнена в рамках Госзадания: тема № 0689-2018-0003).

References/Литература

- Afuman MR, Goodwin PH, Hunter DM (2004) Linkage Vfa4 in *Malus domestica* and *Malus floribunda* with Vf resistance to the apple scab pathogen *Venturia inaequalis*. Plant Pathology 53: 461–467 DOI: 10.1111/j.1365-3059.2004.01047.x
- Bus VGM, Rikkerink EH, Caffier V, Durel CE, Plummer KM (2011) Revision of the nomenclature of the differential host–pathogen interactions of *Venturia inaequalis* and *Malus*. Annual Review of

Phytopathology 49: 391–413 DOI: 10.1146/annurev-phyto-072910-095339.

Chevalier M, Lespinasse Y, Renaudin S (1991) A microscopic study of the different classes of symptoms coded by the Vf gene in apple for resistance to scab (*Venturia inaequalis*). Plant Pathology 40(2): 249–256.

Clark MD, Bus VG, Luby JJ, Bradeen JM (2014) Characterization of the defence response to *Venturia inaequalis* in ‘Honeycrisp’ apple, its

- ancestors, and progeny. *European journal of plant pathology* 140(1): 69–81.
- Fedorova RN* (1977) Scab of apple trees (Parsha yablони). – Leningrad: 61 [in Russian] (*Фёдорова Р. Н.* Парша яблони. – Ленинград: Колос, 1977. 61 с).
- Gessler C, Patocchi A, Sansavini S, Tartarini S, Gianfranceschi L* (2006) Venturia inaequalis resistance in apple. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25 (6): 473–503.
- Gianfranceschi L, Koller B, Seglias N, Kellerhals M, Gessler C* (1996) Molecular selection in apple for resistance to scab caused by Venturia inaequalis. *Theoretical and Applied Genetics* 93 (1–2): 199–204 DOI: 10.1007/BF00225746.
- Kozlovskaya ZA, Vasekha VV, Gashenko TA, Urbanovich OYU* (2009) The effectiveness of the use of the original forms of different genetic origin in the selection of apple trees for resistance to scab (Rezultativnost' ispol'zovaniya iskhodnykh form razlichnogo geneticheskogo proiskhozhdeniya v selekcii yablони na ustojchivost' k parshe). *Plodovodstvo – Orchardng: nauch. tr. RUP «Institut plodovodstva – Institute for Orchardng: 9–17* [in Russian] (*Козловская З. А., Васеха В. В., Гащенко Т. А., Урбанович О. Ю.* Результативность использования исходных форм различного генетического происхождения в селекции яблони на устойчивость к парше // Плодоводство: науч. тр. / РУП «Институт плодovодства». 2009. С. 9–17).
- Kozlovskaya ZA* (2004) Modern trends in apple selection (review of foreign breeding programs) (Sovremennye napravleniya selekcii yablони (obzor zarubezhnykh selekcionnykh program)). *Plodovodstvo – Orchardng* 16: 256–270. [in Russian] (*Козловская З. А.* Современные направления селекции яблони (обзор зарубежных селекционных программ) // Плодоводство. 2004. Т. 16. С. 256–270).
- Kozlovskaya ZA* (2006) Scientific basis of apple selection for intensive gardens of Belarus (Nauchnye osnovy selekcii yablони dlya intensivnykh sadov Belarusi): avtoref. Dis. BGSKHA. Gorki: 39 [in Russian] (*Козловская З. А.* Научные основы селекции яблони для интенсивных садов Беларуси: автореф. Дис. БГСХА. – Горьки. 2006. С. 39).
- Masny S* (2017) Occurrence of Venturia inaequalis races in Poland able to overcome specific apple scab resistance genes. *European Journal of Plant Pathology* 147 (2): 313–323 DOI: 10.1007/s10658-016-1003-x.
- Murray MG, Thompson WF* (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 10: 4321–4325.
- Nasonov AI, Suprun II, Lobodina EV, Stepanov IV, Barsukova ON* (2017) Artificial scab resistance evaluation of Malus Orientalis forms – a potential source of new genes for resistance to apple scab (Ocenka na iskusstvennom infekcionnom fone form Malus orientalis – potencial'nykh istochnikov genov ustojchivosti k parshe yablони). *Politematicheskij setevoy ehlektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agramogo universiteta – Polythematic network electronic scientific journal of the Kuban State Agrarian University (Scientific journal of KubSAU)* 131: 1377–1388[in Russian] (*Насонов А. И., Сунрун И. И., Лободина Е. В., Степанов И. В., Барсукова О. Н.* Оценка на искусственном инфекционном фоне форм Malus orientalis – потенциальных источников генов устойчивости к парше яблони // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2017. № 131. С. 1377–1388) DOI: 10.21515/1990-4665-131-113.
- Osterman LA* (1981) Methods for the study of nucleic acids (Metody issledovaniya nukleinykh kislot). M.: Nauka: 288 [in Russian] (*Остерман Л. А.* Методы исследования нуклеиновых кислот. – М.: Наука, 1981. С. 288).
- Parisi L, Lespinasse Y, Guillaumes J, Krüger J* (1993) A new race of Venturia inaequalis virulent to apples with resistance due to the Vf gene. *Phytopathology* 83 (5): 533–537 DOI: 10.1094/Phyto-83-533.
- Parisi L, Laurens F, Didelot F, Evans K, Fischer C, Fouillet V, Tsipouridis C* (2006) Geographical distribution of Venturia inaequalis strains virulent to the Vf gene in Europe. *IOBC WPRS BULLETIN* 29 (1): 49.
- Roberts T, Crute I* (1994) Apple scab resistance from Malus floribunda 821 (Vf) is rendered ineffective from Malus floribunda. *Norwegian Journal of Agricultural Science* 17: 403–406.
- Sedov EN, Zhdanov VV, Serova ZM, Makarkina MA* (2013) Apple tree breeding for scab resistance: the development of the ideas of NI Vavilova and IV Michurin (Selekcija yablони na ustojchivost' k parshe: razvitie idej NI Vavilova i IV Michurina). *Sel'skohozyajstvennaya biologiya – Agricultural biology* 1: 42–52 [in Russian] (*Седов Е. Н., Жданов В. В., Серова З. М., Макаркина М. А.* Селекция яблони на устойчивость к парше: развитие идей НИ Вавилова и ИВ Мичурина // Сельскохозяйственная биология. 2013. № 1. С. 42–52) DOI: 10.15389/agrobiol-ogy.2013.1.42rus.
- Suprun II, Nasonov AI, Yakuba GV, Lobodina EV, Barsukova ON* (2016) Effective selection of apple seedlings in a seed plot on resistance to scab and powder mildew (Ehffektivnost' otbora seyancev yablони v shkolkе na ustojchivost' k parshe i muchnistoj rose). *Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii – Journal Kubansad* 38(2): 117–129 [in Russian] (*Сунрун И. И., Насонов А. И., Якуба Г. В., Лободина Е. В., Барсукова О. Н.* Эффективность отбора сеянцев яблони в школке на устойчивость к парше и мучнистой росе // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2016. № 38 (2). С. 117–129).
- Vavra R, Bocek S* (2010) Apple scab (Venturia inaequalis (Cooke) Wint.) attacks on cultivars and genotypes carrying different resistant genes in plantings with breaking through Vf-Rvi6 gene. *XIV International Conference on Organic Fruit Growing. Germany.* 22–24.02.2010: 10–15.
- Yakuba GV* (2013) Protection of apple from scab in a climate of change (Ehkologizirovannaya zashchita yablони ot parshi v usloviyah klimaticheskikh izmenenij): Monograph – Krasnodar: GNU SKZ-NIISiV: 213 [in Russian] (*Якуба Г. В.* Экологизированная защита яблони от парши в условиях климатических изменений: Монография – Краснодар: ГНУ СКЗНИИСИВ. 2013. С. 213).
- Zhdanov VV, Sedov EN* (1991) Apple breeding for scab resistance (Selekcija yablони na ustojchivost' k parshe). Tula: Priok. kn. izd-vo: 208 [in Russian] (*Жданов В. В., Седов Е. Н.* Селекция яблони на устойчивость к парше. Тула: Приок. кн. изд-во, 1991. 208 с.).