

УДК 634.11 : 631.52 : 577.21

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СОРТИМЕНТА ЯБЛОНИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДНК-ТЕХНОЛОГИЙ

Савельев Н.И., *д-р с.-х. наук, академик РАН*, **Лыжин А.С.**, *канд. с.-х. наук,*
Савельева Н.Н., *д-р биол. наук*

*ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
генетики и селекции плодовых растений имени И.В. Мичурина»
(Мичуринск)*

Реферат. Представлены результаты использования ДНК-маркеров в селекции яблони на устойчивость к парше и колонновидный габитус роста. Идентифицировано аллельное состояние генов *Rvi6* и *Co* исходных форм и гибридных сеянцев яблони. Выделены генотипы, совмещающие в геноме доминантный аллель гена *Co* с геном *Rvi6* в доминантном гомозиготном состоянии (*Rvi6Rvi6*). Созданы новые высокоурожайные иммунные к парше и колонновидные сорта яблони.

Ключевые слова: яблоня, генотип, молекулярные маркеры, устойчивость к парше, колонновидность

Summary. The results of the used of DNA-markers in an apple breeding for scab resistant and columnar cultivars were presented. Allelic state *Rvi6* and *Co* genes of initial forms and hybrid apple seedlings were identified. The genotypes combining dominant allele *Co* with *Rvi6* gene in the homozygous dominant state (*Rvi6Rvi6*) in a genome were obtained. The new high-yield immune to scab and columnar apple varieties were created.

Key words: apple-tree, genotype, molecular markers, scab resistance, columnar

Введение. Одним из путей повышения продуктивности насаждений яблони в средней полосе России является создание и освоение в производстве новых сортов, превосходящих существующие аналоги по продуктивности, устойчивости к абиотическим и биотическим стрессорам, товарно-потребительским качествам плодов, пригодных для возделывания в садах интенсивного типа [1, 2, 3]. Успешное решение задачи создания новых сортов и повышения эффективности плодового хозяйства неразрывно связано с углублением генетических исследований, привлечением и созданием качественно нового исходного материала, совершенствованием методов подбора родительских пар. Перспективным направлением интенсификации селекционного процесса является использование современных молекулярно-генетических методов анализа генома растений на основе ДНК-маркеров. ДНК-анализ базируется на идентификации в геноме сцепленных с целевыми генами участков ДНК (маркеров) и на молекулярном уровне обеспечивает выявление наследственных основ формирования признаков [4, 5]. Особую актуальность методы молекулярного маркирования имеют для плодовых культур, в частности яблони, что обусловлено длительным периодом ювенильного развития, а также гетерозиготностью многих признаков [6, 7].

К настоящему времени для яблони идентифицированы молекулярные маркеры, сцепленные с такими хозяйственно-ценными признаками, как колонновидный габитус роста (ген *Co*) [8, 9, 10], моногенная устойчивость к парше (гены *Rvi6*, *Rvi5*, *Rvi4*, *Rvi12* и др.) [11, 12, 13, 14], устойчивость к мучнистой росе (ген *Pl-1*) [15], устойчивость к красногалловой яблонной тле (ген *Sd-1*) [16], устойчивость к бактериальному ожогу (QTL) [17], сниженный уровень биосинтеза этилена (гены *Md-ACS1*, *Md-ACO1*) и экспансина (ген *Md-Exp7*) [18, 19] и др. Использование молекулярных маркеров позволяет на ранних этапах онтогенеза определить присутствие в геноме целевых аллелей генов и ускорить процесс создания генотипов с заданными параметрами признаков. В настоящем исследовании

представлены результаты применения ДНК-маркеров в селекции яблони на иммунитет к парше (ген *Rvi6*) и колонновидный габитус роста (ген *Co*).

Объекты и методы исследований. Объектом исследования являлись сорта и гибридные формы яблони. Для выявления гена *Rvi6* использовали кодоминантный маркер AL07-SCAR [11]. Доминантный аллель гена *Rvi6* идентифицируется по присутствию на электрофореграмме фрагмента размером 570 п.н., рецессивный – фрагмента размером 823 п.н., присутствие обоих фрагментов свидетельствует о гетерозиготном состоянии гена [20]. Для идентификации доминантного аллеля гена *Co*, детерминирующего колонновидный габитус роста, использовали маркер 29f1-jw11r (целевой фрагмент размером 586 п.н.) [10].

Экстракция геномной ДНК была проведена по методу Diversity Arrays Technology P/L (DArT) (www.DiversityArrays.com) с модификациями. Реакционная 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 2,5 мМ 10x Taq-буфера (+ (NH₄)₂SO₄, -KCL). Амплификацию проводили в приборе T100 производства фирмы «BIO-RAD» в режимах, описанных в оригинальных публикациях. Разделение целевых продуктов маркеров осуществляли методом электрофореза в 2% агарозном геле. Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали маркер молекулярного веса Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Обсуждение результатов. Проведенный молекулярно-генетический анализ показал, что в изучаемой коллекции у сортов, характеризующихся в условиях ЦЧР полевым иммунитетом к парше, в геноме присутствует доминантный аллель ген *Rvi6*. У сорта Фридом – в доминантном гомозиготном состоянии (*Rvi6Rvi6*), у сортов Былина, Чародейка, Красуля, Кандиль орловский, Академик Казаков, Дьямант, Прима, Рождественское, Благовест, Скала, Флагман, Вымпел, Имант, Белорусское сладкое, Фрегат, Галарина, Валюта, Успенское – в гетерозиготной форме (*Rvi6rvi6*).

Сорта Памяти Нестерова и Стрела, полученные с использованием в гибридизации иммунных к парше форм, согласно результатам ДНК-анализа характеризуются рецессивным гомозиготным генотипом (*rvi6rvi6*) (рис. 1).

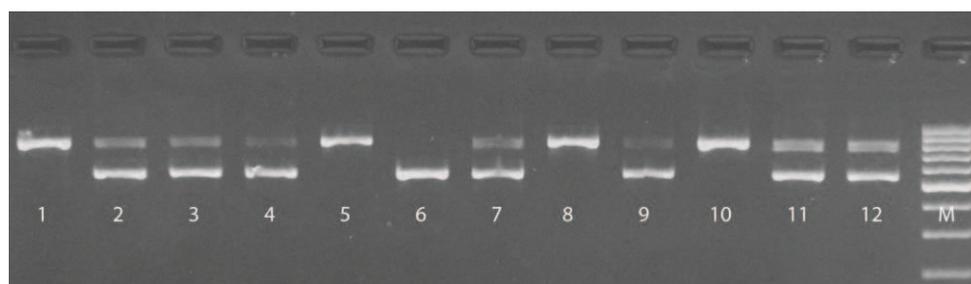


Рис. 1. Электрофоретический спектр маркера AL07-SCAR сортов и форм яблони

1 – Антоновка обыкновенная, 2 – Былина, 3 – Чародейка, 4 – Красуля, 5 – Стрела, 6 – Свежесть, 7 – Кандиль орловский, 8 – Памяти Нестерова, 9 – Академик Казаков, 10 – 40-10, 11 – Прима, 12 – Рождественское, М – маркер молекулярного веса

Анализ генетической коллекции яблони по гену *Co* подтвердил присутствие доминантного аллеля у генотипов колонновидного фенотипа, ведущих происхождение от колонновидной формы Важак – сорта Валюта, Президент, Васюган, Останкино, Стрела, Телеймон, Каскад, Гейзер, Готика, Зелёный шум, Приокское, формы 3-19, 11-6-2, 32-26, 33-57, 10-16 (рис. 2).

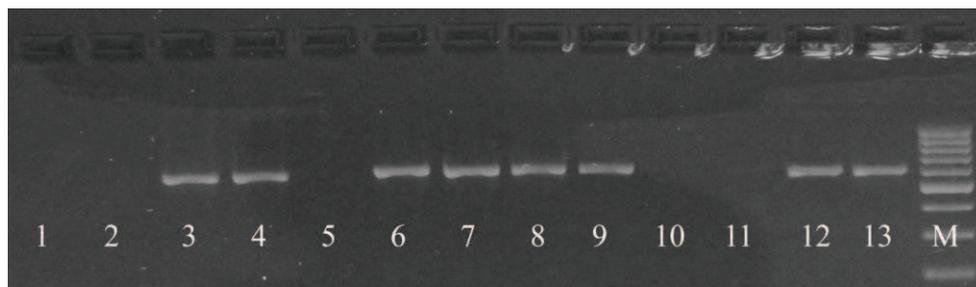


Рис. 2. Электрофоретический спектр маркера 29f1-jw11r сортов и форм яблони

1 – Антоновка обыкновенная, 2 – Богатырь, 3 – Валюта, 4 – Каскад, 5 – Академик Казаков, 6 – 11-6-2, 7 – Президент, 8 – Кумир, 9 – 3-19, 10 – Жигулёвское, 11 – Лобо, 12 – Готика, 13 – Гейзер, М – маркер молекулярного веса

Молекулярно-генетический анализ гибридного потомства яблони комбинаций скрещивания Валюта (*Rviv6rviv6, Coco*) x Успенское (*Rviv6rviv6, coco*) и Валюта (*Rviv6rviv6, Coco*) x Белорусское сладкое (*Rviv6rviv6, coco*) выявил различные аллельные сочетания указанных генов (табл.).

Результаты молекулярно-генетического анализа семян яблони по генам *Rviv6* и *Co*

Комбинация скрещивания	Количество семян, %				
	Ген <i>Rviv6</i>			Генотип <i>Coco</i>	
	Генотип <i>Rviv6Rviv6</i>	Генотип <i>Rviv6Rviv6</i>	Генотип <i>Rviv6Rviv6</i>	Генотип <i>Coco</i>	Генотип <i>Coco</i>
Валюта x Успенское	22,2	55,6	22,2	48,1	51,9
Валюта x Белорусское сладкое	14,0	54,0	32,0	46,8	53,2

Статистический анализ полученных результатов по критерию χ^2 подтвердил соответствие фактического расщепления теоретически ожидаемому: 1:2:1 – для гена *Rviv6* ($\chi^2 = 0,666$ и 3,560 при критическом значении 5,99 для уровня значимости 0,05), 1:1 – для гена *Co* ($\chi^2 = 0,076$ и 0,191 при критическом значении 3,84 для уровня значимости 0,05). Независимое наследование генов *Rviv6* и *Co*, вследствие локализации в разных группах сцепления (1 и 10 соответственно), позволило идентифицировать генотипы, сочетающие иммунитет к парше с колонновидным габитусом роста.

В комбинации скрещивания Валюта x Успенское выделено 40,4% колонновидных семян с доминантным аллелем гена *Rviv6*, а семена №3-10-9, 3-10-12, 3-10-19, 3-10-26, 3-10-36, 3-10-48 сочетают в своём генотипе колонновидный габитус кроны (ген *Co*) и ген *Rviv6* в доминантном гомозиготном состоянии (*Rviv6Rviv6*).

В комбинации скрещивания Валюта x Белорусское сладкое доля иммунных к парше семян яблони с колонновидным габитусом кроны составила 33,3% от общего количества генотипов. Сочетание колонновидного габитуса кроны с доминантным гомозиготным состоянием гена *Rviv6* выявлено у семян №7-12-32 и №7-12-33.

На основании проведённых селекционно-генетических исследований созданы новые высокоурожайные сорта яблони зимнего срока потребления:

с генетически детерминированным иммунитетом к парше (ген *Rviv6*): Академик Казаков, Благовест, Вымпел, Флагман, Фрегат;

с колонновидным габитусом роста (ген *Co*): Гейзер, Готика, Каскад, Стела, Стрела.

Выводы. Таким образом, применение в селекционной практике ДНК-маркеров позволяет значительно ускорить процесс создания новых сортов яблони, обеспечивая на ранних этапах онтогенеза эффективный отбор перспективных генотипов и доноров хозяйственно-значимых признаков.

Литература

1. Кичина, В.В. Методические указания по селекции яблони / В.В. Кичина. – М., 1988. – 63 с.
2. Седов, Е.Н. Селекция и новые сорта яблони / Е.Н.Седов. – Орел, 2011. – 624 с.
3. Савельева, Н.Н. Генетические особенности и методические подходы в селекции иммунных к парше и колонновидных сортов яблони / Н.Н. Савельева. – Мичуринск-наукоград РФ, 2014. – 128 с.
4. Collard, B.C., Mackill, D.J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2008. – V. 363(1491). – P. 557-572.
5. Xu, Y., Crouch, J.H. Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice // *Crop Science*, 2008. – V. 48(2). – P. 391-407.
6. Dirlewanger, E. Comparative mapping and marker-assisted selection in *Rosaceae* fruit crops / E. Dirlewanger, E. Graziano, T. Joobeur, F. Garriga-Calderé, P. Cosson, W. Howad, P. Arús // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. – V. 101(26). – P. 9891-9896.
7. Baumgartner, I.O. Breeding elite lines of apple carrying pyramided homozygous resistance genes against apple scab and resistance against powdery mildew and fire blight / I.O. Baumgartner, A. Patocchi, J.E. Frey, A. Peil, M. Kellerhals // *Plant Molecular Biology Reporter*, 2015. – V. 33(5). – P. 1573-1583.
8. Bai, T. Fine genetic mapping of the *Co* locus controlling columnar growth habit in apple / T. Bai, Y. Zhu, F. Fernandez-Fernandez, J. Keulemans, S. Brown, K. Xu // *Mol. Genet. Genomics*, 2012. – V. 287. – P. 437-450.
9. Baldi, P. Genetic and physical characterisation of the locus controlling columnar habit in apple (*Malus × domestica* Borkh.) / P. Baldi, P. J. Wolters, M. Komjanc, R. Viola, R. Velasco, S. Salvi // *Mol. Breeding*, 2013. – V. 31. – P. 429-440.
10. Wolters, P.J. Evidence for regulation of columnar habit in apple by a putative 2OG-Fe(II) oxygenase / P.J. Wolters, H.J. Schouten, R. Velasco, A. Si-Ammour, P. Baldi // *New Phytologist*. – 2013. – V. 200. – P. 993-999.
11. Tartarini S. Development of reliable PCR markers for the selection of the *Vf* gene conferring scab resistance in apple / S. Tartarini, L. Gianfranceschi, S. Sansavini, C. Gessler // *Plant Breeding*, 1999. – V. 118. – P. 183-186.
12. Patocchi, A. Identification by genome scanning approach (GSA) of a microsatellite tightly associated with the apple scab resistance gene *Vm* / A. Patocchi, M. Walser, S. Tartarini, G.A.L. Broggin, F. Gennari, S. Sansavini, C. Gessler // *Genome*, 2005. – V. 48. – P. 630-636.
13. Boudichevskaia, A. Development of a multiallelic SCAR marker for the scab resistance gene *Vr1/Vh4/Vx* from R12740-7A apple and its utility for molecular breeding / A. Boudichevskaia, H. Flachowsky, A. Peil, C. Fischer, F. Dunemann // *Tree Genetics & Genomes*, 2006. – V. 2(4). – P. 186-195.
14. Erdin, N. Mapping of the apple scab-resistance gene *Vb* / N. Erdin, S. Tartarini, G.A.L. Broggin, F. Gennari, S. Sansavini, C. Gessler, A. Patocchi // *Genome*, 2006. – V. 49. – P. 1238-1245.
15. Dunemann, F. Mapping of the apple powdery mildew resistance gene *P11* and its genetic association with an NBS-LRR candidate resistance gene / F. Dunemann, A. Peil, A. Urbanietz, T. Garcia-Libreros // *Plant Breeding*, 2007. – V. 126. – P. 476-481.
16. Cevik, V., King, G.L. High-resolution genetic analysis of the *Sd-1* aphid resistance locus in *Malus spp.* // *Theor. Appl. Genet*, 2002. – V. 105. – P. 346-354.
17. Khan, M.A. Development of molecular markers linked to the ‘Fiesta’ linkage group 7 major QTL for fire blight resistance and their application for marker-assisted selection / M.A. Khan, C.-E. Durel, B. Duffy, D. Drouet, M. Kellerhals, C. Gessler, A. Patocchi // *Genome*, 2007. – V. 50. – P. 568-577.
18. Costa F. Role of the genes *Md-ACO1* and *Md-ACS1* in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh) / F. Costa, S. Stella, W.E. Van de Weg, W. Guerra, M. Cecchin, J. Dallavia, B. Koller, S. Sansavini // *Euphytica*, 2005. – V. 141. – P. 181-190.
19. Costa F. Map position and functional allelic diversity of *Md-Exp7*, a new putative expansin gene associated with fruit softening in apple (*Malus × domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus communis*) / F. Costa, W.E. Van de Weg, S. Stella, L. Dondini, D. Pratesi, S. Musacchi, S. Sansavini // *Tree Genetics & Genomes*, 2008. – V. 4. – P. 575-586.
20. Patrascu B. Marker assisted selection for response attack of *Venturia inaequalis* in different apple genotypes / B. Patrascu, D. Pamfil, R. Sestras, C. Botez, I. Gaboreanu, A. Barbos, C. Qin, R. Raluca, I. Bondrea, E. Dirle // *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*, 2006. – V. XXXIV – P. 121-132.