

УДК 634.1:631.52

**КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД
К ОТБОРУ ЦЕННЫХ ГЕНОТИПОВ
ЯБЛОНИ, УСТОЙЧИВЫХ
К СТРЕССОВЫМ ФАКТОРАМ
СРЕДЫ***

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

Супрун Иван Иванович
канд. биол. наук

Токмаков Сергей Вячеславович
канд. биол. наук

Ушакова Яна Владимировна

*Государственное научное учреждение
Северо-Кавказский зональный научно-
исследовательский институт садовод-
ства и виноградарства Россельхозака-
демии, Краснодар, Россия*

Выделены новые генотипы яблони, сочетающие высокое качество плодов с устойчивостью к абио- и биотическим стрессорам среды на основе отбора по фенотипу в комплексе с идентификацией целевых признаков методом молекулярного ДНК-маркирования и биохимическими методами исследования.

Ключевые слова: ЯБЛОНЯ, СОРТ, ИММУНИТЕТ, ПАРША, АБИОТИЧЕСКИЕ И БИОТИЧЕСКИЕ СТРЕСС-ФАКТОРЫ СРЕДЫ

UDC 634.1:631.52

**COMPLEX APPROACH
TO SELECTION OF VALUABLE
APPLE'S GENOTYPES STEADY
TO STRESS ENVIRONMENTAL
FACTORS**

Ulyanovskaya Elena
Dr. Sci. Agr.

Suprun Ivan
Cand.Sci.Biol.

Tokmakov Sergey
Cand.Sci.Biol.

Ushakova Yana

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

The new apple's genotypes combining the high quality of fruits with stability to abiotic and biotic stress-factors of environment are allocated on the basis of selection on a phenotype in the combination with identification of target signs by method of molecular DNA marking and biochemical methods of research.

Key words: APPLE-TREE, VARIETY, IMMUNITY, SCAB, ABIOTIC AND BIOTIC STRESS-FACTORS OF THE ENVIRONMENT

Введение. В последнее время отмечена тенденция увеличения силы и частоты воздействия стрессоров среды на плодовые растения. Кроме того, наблюдается снижение устойчивости к болезням у многих сортов плодовых культур, что нередко приводит и к снижению устойчивости растений к абиотическим стрессовым факторам [1-5].

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 13-04-96-552- р_юга)

Известно, что основой высокой продуктивности плодовых растений является использование оздоровленных от вирусных заболеваний саженцев сортов, комплексно устойчивых к стрессовым факторам среды различного происхождения [6-10].

Из-за участвовавших в последнее время экстремальных природных факторов, значительно влияющих на величину и качество урожая плодовых растений, необходимо создание и выделение новых генотипов яблони, совмещающих ценные агробиологические признаки: скороплодность, высокую продуктивность и качество плодов, регулярность плодоношения, технологичность в сочетании с комплексной устойчивостью к стрессовым факторам окружающей среды.

Цель исследований – выделение высококачественных генотипов яблони, устойчивых к абио- и биотическим стрессорам, на основе отбора по фенотипу в сочетании с биохимическими методами исследования и идентификацией целевых признаков методом молекулярного ДНК-маркирования.

Объекты и методы исследований. Научно-исследовательские работы проводили в ГНУ Северо-Кавказском зональном НИИ садоводства и виноградарства (Краснодар) согласно «Программе и методике селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур» (1995); «Программе и методике сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур» (1999); «Современным методологическим аспектам организации селекционного процесса в садоводстве и виноградарстве» (2012) и др.[5-8, 10].

Для выполнения биохимических исследований использована система капиллярного электрофореза, оснащенная кварцевым капилляром длиной не менее 50 см до детектора, внутренним диаметром 75 мкм, фотометрическим детектором, работающим на длине волны 254 нм или спектрофотометрическим детектором в интервале длин волн от 200 до 300 нм, компью-

тером с программным обеспечением для обработки электрофореграмм (система капиллярного электрофореза «Капель 103») [11].

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 [12]. ПЦР проводили по стандартным методикам [13]. При постановке реакции использовали стандартный набор реактивов с Taq-ДНК полимеразой фирмы «Сибензим». Стандарт наличия гена Vf – сорт яблони Прима.

Объектами исследования являются новые сорта и элитные формы яблони селекции СКЗНИИСиВ и селекции СКЗНИИСиВ совместно с ВНИИСПК (Орел).

Обсуждение результатов. Изучение влияния факторов природной среды, в том числе абио- и биотических стрессоров, на растительный организм необходимо для получения возможности управления продуктивностью многолетних растений (в частности, яблони). При оценке влияния указанных стрессоров на растения яблони в системе «генотип – среда» нами установлено, что в южной зоне садоводства наибольший ущерб отрасли наносят абиотические стрессы (ранние морозы, критические морозы в середине зимы, весенние заморозки, засуха, неустойчивый режим увлажнения) и биотические (эпифитотии основных грибных заболеваний яблони).

Наиболее вредоносная и широко распространенная болезнь основной плодовой культуры яблони – парша (возбудитель – гриб *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter). В южном регионе за последние 13 лет наблюдений (2001-2013 гг.) отмечено 11 эпифитотий этого опасного заболевания. Поражение растений яблони паршой значительно снижает показатели качест-

ва плодов, в том числе стандартности и товарности, лежкоспособности и транспортабельности.

Необходимо отметить, что признаки устойчивости к парше, к засухе, к морозам имеют разный генетический контроль, но эти признаки влияют друг на друга через обменные процессы. Низкая устойчивость к одному из стрессоров среды ослабляет растительный организм в период действия стрессора и снижает его устойчивость к другому стрессору, даже если она была высокой. Например, у страдающих от засухи или пострадавших от мороза растений яблони снижаются защитные силы, и они становятся более подверженными грибным заболеваниям. Поэтому для решения задачи управления продуктивностью растений яблони необходимо выделение генотипов, совмещающих комплекс ценных признаков адаптивности – устойчивости к абиотическим стрессам и устойчивости к парше (на олиго- и полигенной основе).

Основные погодные стрессоры последнего десятилетия: длительные оттепели в январе-феврале, морозы в период покоя и после оттепели, понижение температуры в апреле-мае или аномально жаркая и сухая погода в этот период (например, в 2013 году), высокая солнечная радиация, аномально высокая температура воздуха и почвы, засуха, недостаток влаги и (или) неустойчивый режим естественного увлажнения и неравномерное распределение осадков в весенне-летний период. Негативное действие абиотических стрессов особенно опасно в период цветения, завязывания, формирования и роста плодов, закладки генеративных почек – наиболее энергоемкие фазы жизнедеятельности яблони.

В ходе исследований выявлено значительное увеличение за последнее десятилетие суммы активных температур. Аномально высокие температуры воздуха и почвы, длительная засуха, неустойчивый режим увлажнения и неравномерное распределение осадков в период вегетации – экс-

тремальное сочетание этих факторов ведет не только к снижению продуктивности и качества плодов яблони, но и к значительному ослаблению растения, снижению устойчивости к стрессовым факторам среды (морозам и грибным заболеваниям), а также к снижению закладки генеративных почек, что влияет в дальнейшем на продуктивность растения. Выявлено, что в последние годы (2001-2013 гг.) не отмечено минимальных сумм активных температур и, соответственно, таких характеристик лета, как недостаточно жаркое (сумма активных температур 3000-3200 °С), очень теплое (2800-3000 °С), теплое (2600-2800 °С), наблюдавшихся в предшествующий период (табл. 1).

Таблица 1 – Характеристика лета по теплообеспеченности за период 2001-2013 гг. в сравнении с периодом 1981-2000 гг. (Краснодар)

Год	Сумма активных температур, °С	Характеристика лета	Частота наступления, %
1991, 1994, 1998, 2000	>3800	Очень жаркое	20
2001, 2005, 2006, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013			69
1981, 1989, 1990, 1995, 1996, 1997, 1999	3400-3800	Жаркое	35
2002, 2003, 2007			23
1983, 1984, 1988	3200-3400	Умеренно жаркое	15
2004			8
1982, 1986, 1993	3000-3200	Недостаточно жаркое	15
1987, 1992	2800-3000	Очень теплое	10
1985	2600-2800	Теплое	5

В 2001-2013 гг. летний период в основном был очень жаркий или жаркий, частота наступления – 69 и 23 % соответственно (в сумме 92 %), в отличие от предшествующего периода (1981-2000 гг.), когда частота наступления очень жаркого и жаркого лета составляла соответственно 20 и 35 % (в сумме 55 %) (см. табл. 1).

Таким образом, за последние годы, если рассматривать последние 13 лет (2001-2013 гг.), частота наступления очень жаркого лета (сумма активных температур >3800 °С) увеличилась почти в 3,5 раза в сравнении с предшествующим 20-летним периодом, а если рассматривать последние 6 лет (2008-2013 гг.), то частота наступления очень жаркого лета – 100 %.

Среднемесячная температура воздуха с мая по сентябрь в последние годы возросла в сравнении с многолетними данными. Так, в 2010-2013 гг. среднемесячная температура этого периода выше (особенно в сравнении с 1950-1980 гг.) и особенно в мае и июне – на 4,11 °С и 3,43 °С соответственно, а также в июле, августе, сентябре – на 2,48 °С; 2,93 °С и 1,42 °С соответственно (рис. 1).

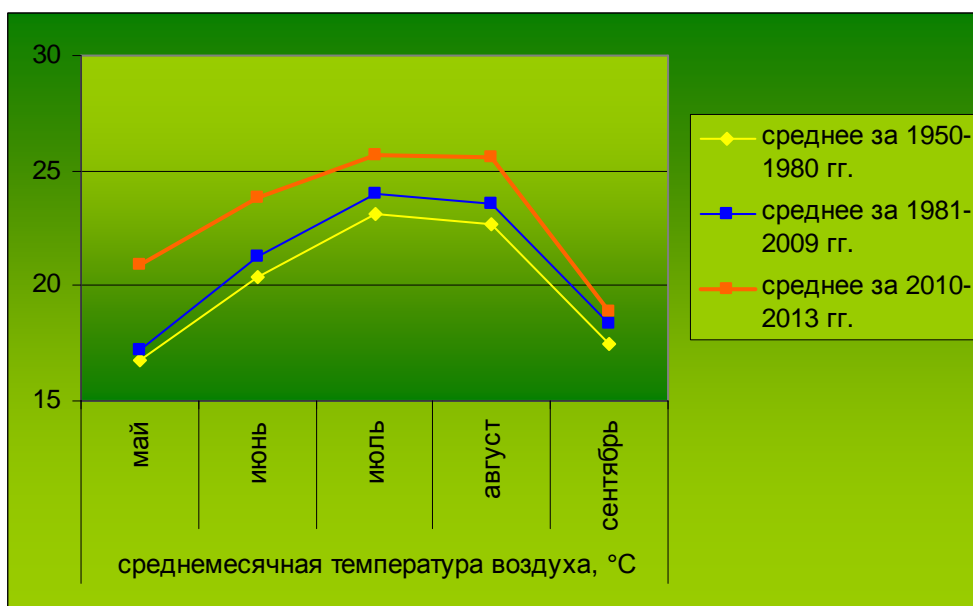


Рис. 1. Среднемесячная температура воздуха (°С) с мая по сентябрь в период 2010-2013 гг. в сравнении с многолетними данными (Краснодар)

В последнее время (2006-2013) дефицит количества осадков наблюдается в энергоемкие фазы развития плодовых растений – в мае, июне и, особенно, в августе (в сравнении со средними многолетними данными). Значительный дефицит количества осадков отмечен в августе – показатель

почти в два раза ниже в сравнении с периодами 1981-2005 гг. и 1950-1980 гг. (рис. 2).

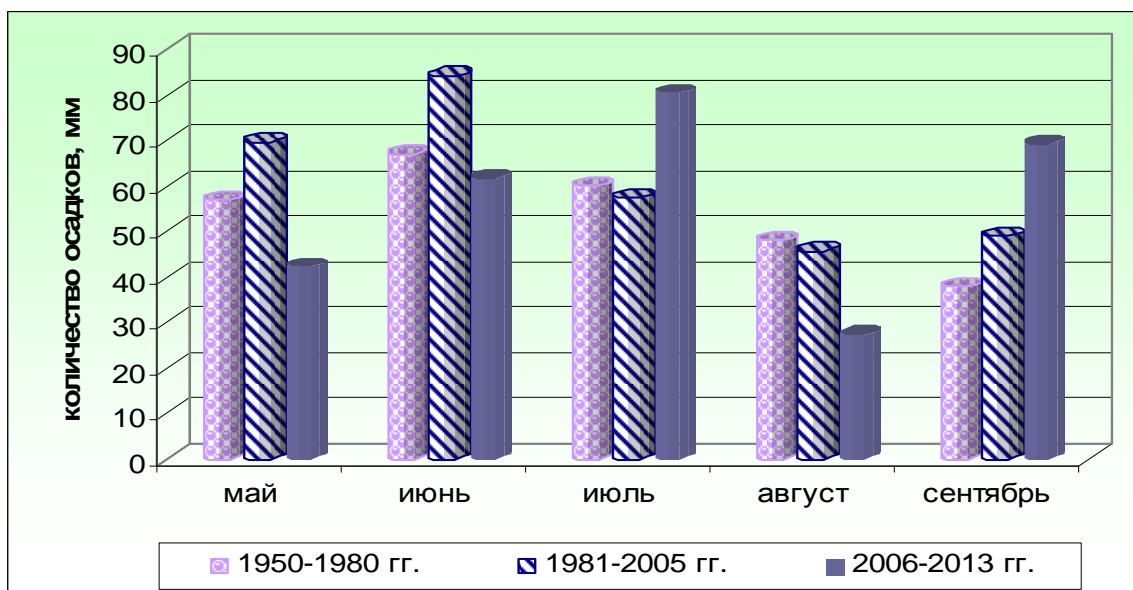


Рис. 2. Динамика влагообеспеченности с мая по сентябрь (количество осадков, мм) периода 2006-2013 гг. в сравнении с многолетними данными (Краснодар)

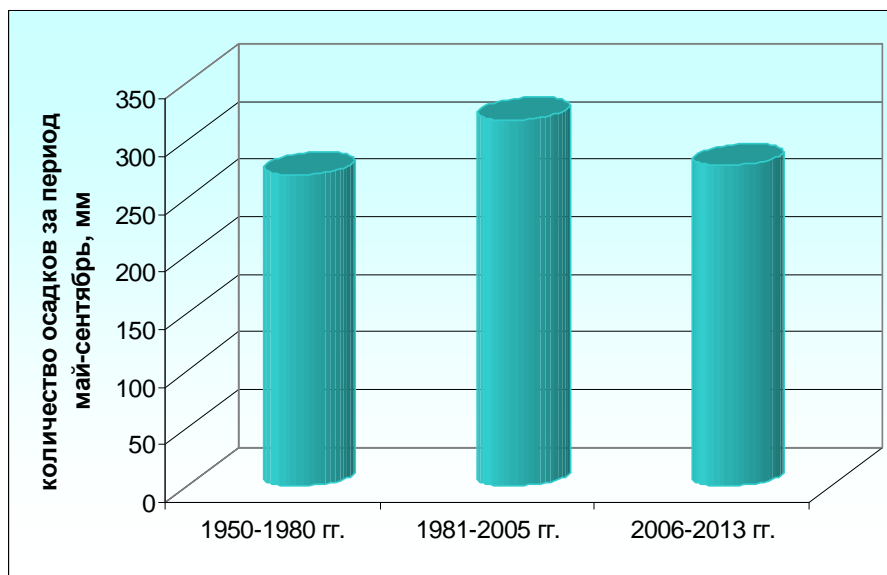


Рис. 3. Сумма осадков (май-сентябрь, мм) в среднем за период 2006-2013 гг. в сравнении с многолетними данными (Краснодар)

В то же время, если анализировать влагообеспеченность (количество осадков, мм) за период с мая по сентябрь, то в последние годы (2006-2013) отмечено незначительное увеличение влагообеспеченности на 3 % и уменьшение на 12,5 % соответственно в сравнении с многолетними данными (1950-1980 гг. и 1981-2005 гг.) (рис. 3).

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что в последние годы значительно усилилось негативное воздействие комплекса стрессовых факторов летнего периода на растение: аномальные высокотемпературные стрессы, дефицит количества осадков, неустойчивый режим увлажнения и неравномерная влагообеспеченность в период вегетации. А так как действие факторов внешней среды на растение происходит одновременно и комплексно, то постоянно возрастающая в последняя время нестабильность и изменчивость воздействия на растительный организм природных стрессоров вызывает ответную приспособительную (адаптивную) реакцию растений яблони. В таких благоприятных для селекционного отбора условиях значительно возрастает роль выделения адаптивных генотипов яблони, сочетающих комплексную устойчивость к абио- и биотическим стрессам с высокой продуктивностью и качеством плодов.

В ходе выполнения исследований проведена комплексная оценка основных агробиологических признаков разнохромосомных сортов и форм яблони в нестабильных условиях окружающей среды, характеризующихся увеличением частоты и силы воздействия стрессоров на растение.

Установлено, что высокая устойчивость и иммунитет растений яблони разной ploидности к абио- и биотическим стрессорам оказывает значительное положительное влияние на продуктивность и качество плодов. Исходный селекционный материал яблони разной ploидности оценивали по комплексу агробиологических признаков: устойчивости к основным грибным заболеваниям (парше и мучнистой росе), качеству плодов и их леж-

костоспособности, а также засухо- и морозостойкости, скороплодности, слаборослости, срокам цветения, завязывания и созревания плодов, степени и срокам осыпаемости плодов, регулярности плодоношения, уровню продуктивности. У выделенных по комплексу значимых признаков разнохромосомных генотипов яблони выявлена их полная родословная с анализом предков по наиболее важным селекционным признакам.

В качестве генетически ценного исходного материала, на основе оценки урожайности, качества плодов и устойчивости к основным грибным патогенам сортов и форм яблони разного уровня плоидности, выделены высокопродуктивные генотипы с плодами высоких вкусовых достоинств, сочетающие иммунитет к парше с высокой полевой устойчивостью к мучнистой росе: Ника, Марго, 12/1-21-60 (из семьи Голден Делишес тетраплоидный × 2034 [F2 *M. floribunda* × Голден Делишес]), 12/1-20-3 (из семьи Делишес × Балсгард 0247E), 12/1-21-48, 12/3-21-28 (Айдаред × Балсгард 0247 E), 12/2-20-23, 12/2-20-26, 12/2-20-43, 12/2-21-65 (Корей × Прима), 12/3-21-18, 12/3-21-20 (Голден Делишес тетраплоидный × [Вольф Ривер × (Вольф Ривер × *M. atrosanguinea* 804/240-57)]) и др. Эти генотипы прошли отбор на искусственном инфекционном фоне во ВНИИСПК (г. Орел). В дальнейшем в ходе выполнения исследований данные сорта и формы яблони были отобраны для подтверждения наличие гена Vf молекулярно-генетическим методом ДНК-маркирования.

Для выявления устойчивых генотипов яблони к действию стрессоров летнего периода (длительная засуха, длительное воздействие на растение аномально высоких и высоких температур воздуха и почвы, неустойчивый режим увлажнения и неравномерное распределение осадков) наряду с полевыми (прямыми) методами оценки использовали лабораторные (биохимические), так называемые косвенные методы оценки фенотипических признаков.

Использован метод определения в растительных образцах (в коре побегов, листьях, почках) массовой концентрации пролина (индикатора, характеризующего устойчивость растения к стрессовым температурам) и модифицированная методика для растительных объектов комплексного определения веществ с антиокислительной активностью – аскорбиновой и фенолкарбоновых (хлорогеновой и кофейной) кислот, с применением методов капиллярного электрофореза на приборе Капель 103 Р.

По данным предварительной оценки устойчивости разнохромосомных генотипов яблони в период наиболее активного воздействия абиотических стрессоров летнего периода лабораторными методами исследования, выявлено, что содержание пролина в растительных образцах варьировало от 12 мг/кг (форма 12/3-21-23) до 80,180 и 83,057 мг/кг (форма 12/3-21-27 и сорт Марго соответственно); содержание аскорбиновой кислоты – от 17,735 мг/кг (форма 12/2-21-32) до 459,538 мг/кг (форма 12/3-21-27); хлорогеновой кислоты – от 1098,221 мг/кг (форма 12/3-21-23) до 21441,387 мг/кг (форма 12/3-21-27) (рис. 4-6).

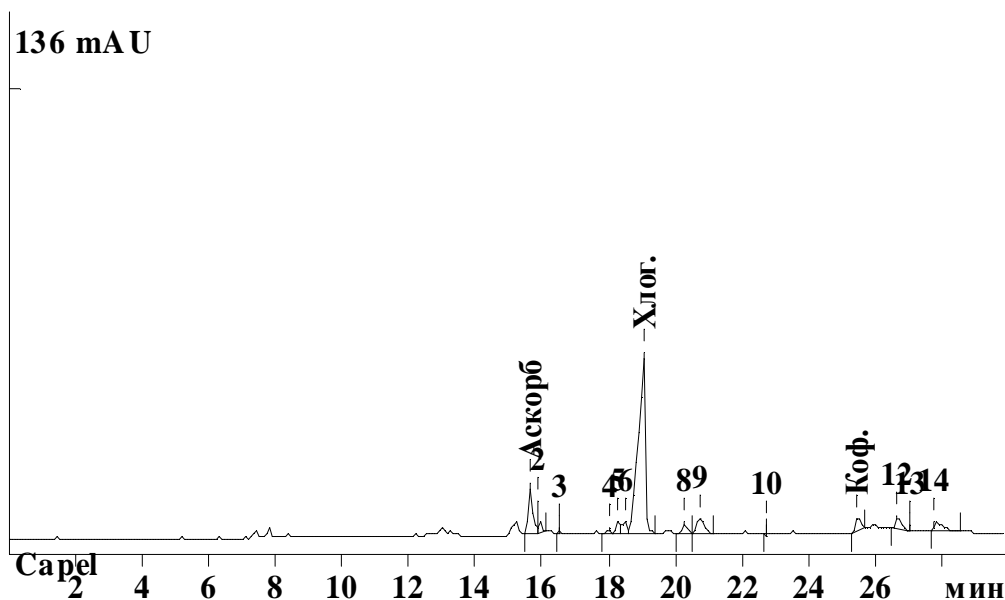


Рис. 4. Электрофореграмма содержания аскорбиновой и фенолкарбоновых кислот (мг/кг) в вегетативных побегах формы яблони 12/3-21-23 (август, 2013 г.)

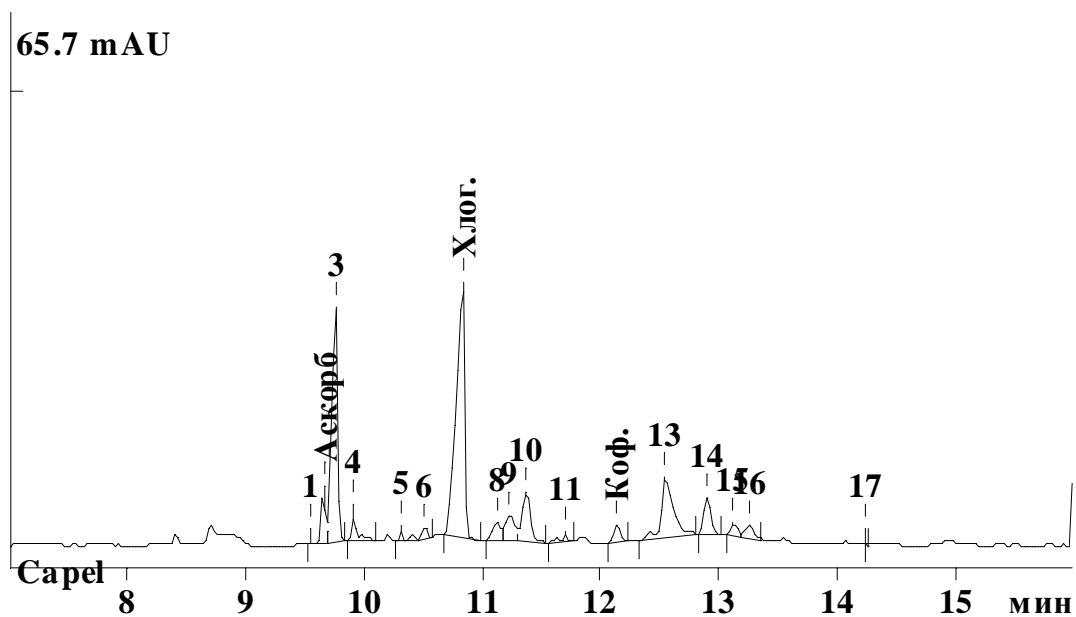


Рис. 5. Электрофореграмма содержания аскорбиновой и фенолкарбоновых кислот (мг/кг) в вегетативных побегах формы яблони 12/3-21-27 (август, 2013 г.)

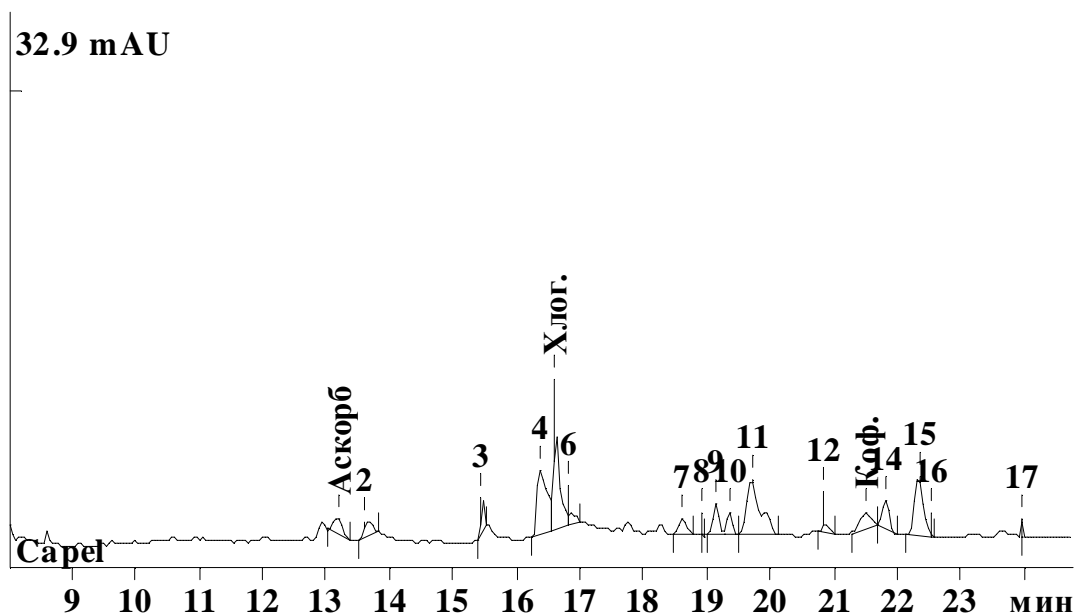


Рис. 6. Электрофореграмма содержания аскорбиновой и фенолкарбоновых кислот (мг/кг) в вегетативных побегах формы яблони 12/2-21-32 (август, 2013 г.)

По предварительным данным выделена форма 12/3-21-27 с наиболее высоким содержанием в вегетативных побегах искомым компонентов антиоксидантной системы (рис. 7). В дальнейшем в ходе выполнения исследований планируется установить степень воздействия условий среды на содержание некоторых компонентов антиоксидантной системы растений яблони с целью использования их как диагностических показателей относительной устойчивости генотипов к температурному стрессу.



Рис. 7. Иммунная к парше форма яблони 12/3-21-27

По результатам полевых и лабораторных (молекулярно-генетических) исследований выделены перспективные сорта и формы яблони различных сроков созревания, сочетающие в генотипе устойчивость к абио- и биотическим стрессорам среды на достаточно высоком уровне:

- в группе раннелетнего срока созревания – Рассвет;
- летнего и позднелетнего срока созревания – Союз, Фортуна, 12/3-21-6, 12/3-21-9;
- осеннего срока созревания – 12/3-21-28, 12/3-21-32;
- зимнего срока созревания – Ника, Орфей, Марго, 12/1-20-3, 12/1-21-43, 12/1-21-60 и др. (табл. 2).

Таблица 2 – Устойчивость сортов и форм яблони к основным абио- и биотическим стрессорам южного региона плодводства

Сорт, форма	Степень устойчивости к стрессорам			
	биотическим		абиотическим	
	к мучнистой росе	к парше	морозам	засухе
Раннелетний срок созревания				
Рассвет*	****	*****	***	****
Фея	****	****	****	****
44-27-28-в	****	***	**	****
Новелла (к)	**	**	**	****
Летний и позднелетний срок созревания				
Союз*	****	*****	***	****
Фортуна*	****	*****	****	****
Родничок	****	****	***	****
Амулет*	****	*****	**	***
Золотое летнее	****	****	***	**
12/3-21-6*	****	*****	****	****
12/3-21-9*	****	*****	****	***
Прима (к)	**	*****	**	****
Осенний срок созревания				
Талисман*	****	*****	**	***
Кармен*	****	*****	**	****
Палитра	****	***	*	***
Василиса*	**	*****	****	****
12/3-21-28*	****	*****	****	****
12/3-21-32*	****	*****	****	****
Гала (к)	**	**	*	**
Зимний срок созревания				
Талида	****	****	****	****
Ника*	****	*****	****	****
Орфей*	****	*****	****	***
Марго*	****	*****	****	**
12/1-20-3*	****	*****	****	****
12/1-21-43*	****	*****	****	****
12/1-21-60*	****	*****	****	****
12/2-20-23*	****	*****	***	****
12/3-21-18*	****	*****	****	****
Голден Делишес (к)	**	**	**	**

Примечание: степень устойчивости: ***** – иммунитет, **** – высокая, *** – выше средней, ** – средняя, * – низкая

Ника* – наличие гена Vf (иммунитета к парше) у сорта подтверждено молекулярно-генетическим методом ДНК-маркирования.

Необходимо отметить, что выделенные в процессе проведенных исследований сорта и формы яблони зимнего срока созревания – Ника, Орфей, Марго, 12/1-21-60, 12/3-21-18 (полученные из гибридных семей с участием сортов Голден Делишес тетраплоидный и Голден Делишес) обладают высоким качеством плодов и превосходят исходные формы по устойчивости к абиотическим и биотическим стрессовым факторам среды южного региона Российской Федерации. Поэтому выделенные генотипы перспективны в селекции на совмещение показателей высокой адаптивности и качества плодов яблони.

Выводы. Таким образом, в ходе исследований выделены высококачественные генотипы яблони разного срока созревания, устойчивые к абио- и биотическим стрессорам среды, а также выявлены закономерности наследования значимых признаков яблони (определяющих поиск новых доноров ценных признаков, правильный и обоснованный подбор родительских пар), повышающие эффективность селекционного процесса, выход сортов с заданными признаками и свойствами.

Использование для идентификации генетической детерминанты значимых признаков методов молекулярного ДНК-маркирования позволит в дальнейшем более эффективно вести поиск и выделение комплексных доноров ценных признаков.

Литература

1. Захарченко, В.А. Экономические и организационные основы управления фитосанитарным состоянием агроценозов: методические рекомендации / В.А. Захарченко. – М.: Изд-во Россельхозакадемии, 1994. – 38 с.
2. Седов, Е.Н. Селекция груши / Е.Н. Седов, Е.А. Долматов. – Орел: Изд-во ВНИИСПК., 1997. – 256 с.

3. Савельев, Н.И. Генетические основы селекции яблони / Н.И. Савельев. – Мичуринск: Изд-во ВНИИГиСПР им. Мичурина, 1998. – 304 с.
4. Савельев, Н.И. Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и селекции плодовых растений им. И.В. Мичурина (История становления от И.В. Мичурина до наших дней) / Н.И.Савельев. – Воронеж: Кварта, 2005.– 128 с.
5. Программа Северо-Кавказского центра по селекции плодовых, ягодных, цветочно-декоративных культур и винограда на период до 2030 года.– Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2013. – 202 с.
6. Современные методологические аспекты организации селекционного процесса в садоводстве и виноградарстве // Егоров Е.А., Еремин Г.В., Ульяновская Е.В., Луговской А.П. [и др.] – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2012. – 569 с.
7. Программа и методика селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур. – Орел, 1995. – 503 с.
8. Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур. – Орел, 1999. – 606 с.
9. Бунцевич, Л.Л. Фитосанитарная ситуация и сортовая политика в питомниководстве Краснодарского края / Л.Л. Бунцевич, М.А. Костюк, Е.Н.Палецкая, М.А. Макаркина // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 2013. – №20 (2).– С. 47-55.– Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/archive/20/>
10. Ульяновская, Е.В. Ускоренное создание иммунных к парше сортов яблони с использованием молекулярно-генетических методов исследования / Е.В. Ульяновская, И.И. Супрун, Е.Н. Седов [и др.]. – Краснодар, 2011. – 55 с.
- 11.Брыкалов, А.В. Современные методы выделения и исследования биологически активных веществ и микроорганизмов / А.В. Брыкалов, Ю.Ф. Якуба, Н.Ю. Пилипенко [и др.]. – Краснодар: КубГАУ, 2013. – 115 с.
- 12.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.
- 13.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.