

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы Дәулет Нұржан на тему «Скрининг перспективных сортов яблони на устойчивость к *Erwinia amylovora* (возбудитель бактериального ожога) с использованием молекулярных маркеров», представленной на соискание степени доктора философии (PhD) по образовательной программе 8D08104 – Защита и карантин растений

Актуальность темы исследования.

Плоды являются важной и неотъемлемой частью качественного, рационального питания, обеспечивают здоровье и долголетие человека. В Казахстане, как и во многих странах мира, самой важной из плодовых культур является яблоня. Она является лидером в увеличении производства фруктов.

По данным Агентства Республики Казахстан по статистике за 2022 год из 47,18 тыс. га садов, охваченных семечковыми и косточковыми плодовыми культурами, 35,73 тыс. га занимают яблоневые сады, что составляет 76% площади (<https://stat.gov.kz/official/industry/14/statistic/7>). В государственный реестр селекционных достижений, разрешенных к использованию в Республике Казахстан, на 2023 год включены 73 сорта яблони разных сроков созревания, из них 29%-сорта местной селекции, созданных в Казахском НИИ плодоводства и виноградарства и у 38% сортов оригинаторы не зарегистрированы.

Одним из наиболее опасных заболеваний плодовых культур является бактериальный ожог и для Казахстана он является карантинным объектом. Болезнь вызывается бактерией *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al и, согласно литературным источникам, поражает более 180 видов плодовых и древесно-кустарниковых видов семейства розоцветных. Бактериальный ожог в основном поражает яблоню (*Malus domestica*) и грушу (*Pyrus communis*). Болезнью поражаются все органы яблони: цветки, распускающиеся почки, плоды, листья, побеги, ветви различных порядков, кора штамба.

Первое проявление бактериального ожога в Казахстане отмечено в 2008 году, а к 2010 году он стало наносить существенный урон яблоневым и грушевым садам республики. По степени вредоносности бактериальный ожог не имеет равных среди известных болезней плодовых культур. Болезнь вызывает большие потери урожая и гибель деревьев.

В сложившейся ситуации во избежание дальнейшего распространения бактериального ожога на территории Казахстана очень важно выращивать устойчивые к бактериальному ожогу сорта плодовых деревьев. Однако проблема в том, что на сегодня данные об устойчивости отечественных сортов яблони к бактериальному ожогу крайне отрывочны, что не позволяет рекомендовать подходящий сортимент для промышленных и частных садов в регионах с повышенным риском их заражения ожогом. Отдельную проблему в настоящее время представляет поиск устойчивых к болезни подвоев плодовых культур.

В настоящее время особой проблемой является поиск сортов устойчивых к болезням плодовых культур. В мировой селекции основное внимание уделяется производству высококачественных патогеноустойчивых сортов и подвоев плодовых культур. Устойчивость сортов плодовых культур к болезням является важным показателем, определяющим их ценность. Выбор сортов, устойчивых к самым вредоносным заболеваниям растений, всегда остается одной из главных задач. Поэтому оптимальные методы оценки генетически обусловленной устойчивости к патогенам всегда будут востребованы. В связи с необходимостью усиления селекционного процесса всегда будут востребованы оптимальные методы оценки генетически обусловленной устойчивости.

Успехи в развитии генетико-селекционных исследований обусловлены наличием информативных генетических маркеров. До сих пор в селекционных программах по пловодству в Казахстане в качестве генетических маркеров используются в основном морфологические (фенотипические) признаки. Однако количество интродуцированных маркеров этого типа ограничено. Кроме того, морфологические признаки могут иметь сложный характер наследования и часто зависят от условий внешней среды. Это указывает на необходимость оценить молекулярно-генетическое разнообразие возделываемых и перспективных сортов и подвоев яблони, а также искать новые ресурсы гермоплазмы. В связи с этим требуется определение генетически устойчивых сортов и подвоев яблони к возбудителю бактериального ожога с использованием ДНК-маркерного анализа и разработка рекомендаций по совершенствованию селекционного процесса и повышению продуктивности насаждений. Это позволит перевести казахстанское пловодство на современный уровень.

Несмотря на многочисленные исследования, проведенные в разных странах, ряд вопросов устойчивости сортов плодовых культур к бактериальному ожогу изучен недостаточно. Повышенная устойчивость к болезням - одно из важнейших требований современного сорта сельскохозяйственных растений, в том числе плодовых. Поэтому оптимальные методы оценки генетически обусловленной устойчивости к патогенам всегда будут востребованы.

В настоящее время приоритетной задачей является создание сортов плодовых культур с генетической устойчивостью к самым вредным заболеваниям, в частности бактериальному ожогу. Выращивание таких сортов позволит снизить пестицидную нагрузку, энергозатраты, улучшить экологическую обстановку и получить экологически безопасные продукты на основе органического производства.

Решение изучаемой проблемы актуально не только в Казахстане, но и в ряде стран мира. Полученные результаты позволят идентифицировать гены, кодирующие устойчивость сортов и подвоев яблони к возбудителю бактериального ожога с использованием современных молекулярно-генетических методов на основе ДНК-маркеров для интенсификации селекционного процесса плодовых культур.

Цель диссертационного исследования.

Обеспечение устойчивого производства плодов на основе выявления генетически устойчивых сортов и подвоев яблони к вредоносной болезни - бактериальному ожогу с применением молекулярных маркеров и разработка рекомендаций для селекционных работ.

Задачи исследования.

1. Скрининг отечественных и зарубежных сортов и подвоев яблони к бактериальному ожогу в основной промышленной зоне садоводства (юг и юго-восток Казахстана).

2. Выявление возбудителя бактериального ожога микробиологическими и молекулярно-биологическими методами у отечественных и зарубежных сортов яблони.

3. Определение генетически устойчивых сортов яблони к возбудителю бактериального ожога с использованием молекулярных маркеров.

4. Оценка генетической устойчивости подвоев яблони к возбудителю бактериального ожога (*Erwinia amylovora*) с использованием молекулярных маркеров.

Методы исследования.

Для своевременного выявления бактериального ожога проводились регулярные обследования насаждений яблони юга и юго-востока Казахстана во время вегетационного периода по методикам выявления и идентификации возбудителя ожога плодовых деревьев

SNP генотипирование

Тотальная ДНК была выделена с помощью силикагельной мембраны и повторно суспендирована в буфере TE (10 mM Трис; 0,1 mM ЭДТА). Концентрация ДНК определялась с помощью наноспектрофотометра и нормирована на 20 нг/мкл. Количественные локусы признаков (QTLs) для устойчивости к бактериальному ожогу, вызванному *Erwinia amylovora*, были идентифицированы с помощью 10 молекулярных маркеров: FBE-1_Y320, FBE-2_Y192, FBE-2_Y495, FBE-2_Y551, FB-MR5-NZsnEH034548_K35, FB-MR5-NZsnEH034548_R240, FB-MR5-NZsnEH034548_R249, FB-MR5-rp16k15_M106, RLP1a, RLP1b в генах FBE, MR5 и RLP1 (Chagné et al.). Все 10 маркеров были истинными SNPs, ранее успешно оцененными с помощью технологий прямого секвенирования (Jansch et al., Gardiner et al.). Все 10 пар праймеров и зондов Taqman® были разработаны с помощью инструмента Custom Taqman® Assay Design Tool (Chagné et al.).

Экстракты ДНК (по 20 нг) смешивали с равным объемом TaqMan® OpenArray® Genotyping Master Mix согласно инструкции и амплифицировали с помощью системы QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific).

Результаты анализировались с помощью программного обеспечения Quantstudio® Design and Analysis и Taqman® Genotyper (Thermo Fisher Scientific). Поскольку анализы были разработаны заново, каждый результат генотипирования проверялся вручную путем просмотра трассировки в реальном времени и конечной точки флуоресценции. Любые изменения,

внесенные вручную, сохранялись с помощью программы Taqman® Genotyper software и экспортировались в виде матрицы генотипов для каждого отдельного образца.

Амплификация SCAR-маркеров

В настоящей работе были использованы два маркера, связанные с устойчивостью к бактериальному ожогу, AE10-375 и GE-8019 (Khan et al., 2007). Для каждого образца ДНК амплифицировали 60 нг ДНК в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 1× Taq буфер (750 мкМ Трис HCl, pH 8,8, 200 мкМ (NH₄)₂SO₄, 0,1% от 20), 2,5 мкМ MgCl₂, 0,2 мкМ dNTP, по 0,2 мкМ каждого из соответствующих праймеры и 1 единица полимеразы Taq (Thermo Scientific, США). Результаты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле в буфере TAE.

Основные положения, выносимые на защиту (доказанные научные гипотезы и другие выводы, являющиеся новыми знаниями).

- В результате мониторинговых обследований насаждений яблонь на юге и юго-востоке Казахстана выявлено распространение и развитие бактериального ожога на изученных сортах и подвоях яблони.
- В ходе научного исследования с использованием микробиологических и молекулярно-биологических методов был выявлен возбудитель бактериального ожога у отечественных и зарубежных сортов яблони.
- На защиту выносятся основные идеи по устойчивости к бактериальному ожогу с учетом генетического происхождения и климатических условий сортов и подвоев яблони с новыми и инновационными элементами.
- Определена целесообразность внедрения в практическое садоводство устойчивых к бактериальному ожогу сортов и подвоев яблони, что позволит усовершенствовать селекционный процесс и повысить урожайность плодов.

Описание основных результатов исследования.

В результате исследования выявлен возбудитель бактериального ожога на обследованных сортах яблони основной промышленной зоны садоводства, установлены распространенность и развитие болезни. Отмечена определенная зональная очаговость в проявлении болезни. В результате микрокопирования под световым микроскопом подтверждено, что бактериальные колонии, полученные из чистой культуры по морфологии похожи на *E. amylovora*. Проверка патогенности бактерий методом Уайта на незрелых плодах яблони показала наличие патогена *E. amylovora*- возбудителя бактериального ожога.

В результате молекулярной идентификации возбудителя бактериального ожога методом ПЦР на основе геномной ДНК на сортах яблони были идентифицированы фитопатогенные бактерии *Erwinia amylovora*.

Результаты генотипирования 59 сортов яблони по 10 SNP-маркерам показали, что 10 из 10 маркеров были полиморфными и успешно отличали фенотипы, восприимчивые к бактериальному ожогу.

Среди изученных 59 сортов яблони с использованием SCAR-маркеров AE-375 и GE-8019 сорта яблони Самурет, Хани Крисп, Пинова и Ред Топаз были признаны устойчивыми к бактериальному ожогу и могут быть

использованы в качестве источников устойчивости в селекционных программах.

Оценка генетической устойчивости зарубежных и местных подвоев к бактериальному ожогу показала, что подвой яблони Женева 41, Женева 16 и 62-396 оказались устойчивыми к бактериальному ожогу среди других 11 подвоев, выращиваемых в условиях южного региона Казахстана.

Выделены и рекомендованы для возделывания лучшие сорта и подвой яблони, имеющие высокий показатель устойчивости к бактериальному ожогу. Разработаны рекомендации для совершенствования селекционного процесса и повышения продуктивности насаждений.

Обоснование новизны и важности полученных результатов.

Впервые в Казахстане были выявлены генетически устойчивые перспективные сорта яблони к возбудителю бактериального ожога с использованием наиболее эффективных SNP-маркеров. Впервые в основных плодовых регионах Казахстана в результате молекулярно-генетической идентификации выделены устойчивые к возбудителю бактериального ожога перспективные подвой яблони.

По результатам анализа на основе полученных данных разработаны рекомендации по применению устойчивых к бактериальному ожогу сортов и подвоев яблони для совершенствования селекционного процесса и производства высококачественных плодов.

Соответствие направлениям развития науки или государственным программам.

Диссертационная работа выполнена в НАО "Казахский национальный аграрный исследовательский университет" по бюджетной программе 217" развитие науки", подпрограмме 102" грантовое финансирование научных исследований", АР 09259636 "Изучение генетической устойчивости перспективных сортов и подвоев яблони к опасному заболеванию- бактериальному ожогу с использованием SNP – маркеров".

Описание вклада докторанта в подготовку каждой публикации.

Всего по итоговым данным научно-исследовательской работы докторанта опубликовано 8 научных трудов, из них в научных журналах, рекомендованных комитетом по контролю в сфере образования и науки МОН РК – 2 статьи; в материалах международных научно-практических конференций- 2 статьи; 2 статьи в журналах, включенных в базу данных Scopus с показателем 74 и 79 процентиль и входящих в квартиль Q1 в базах Web of Science и Scopus; опубликованы рекомендации производству и получен патент на полезную модель «Набор синтетических олигонуклеотидов для определения SNP-маркеров, связанных с устойчивостью к бактериальному ожогу на участке яблони " №7973 от 21.04.2023 г.

Объем и структура диссертации.

Общий объем диссертации составляет 110 страниц, состоит из введения, основной части, разделенной на 3 главы, заключения, предложения производству и приложения. Содержит 13 таблицы и 19 рисунков. Список использованной литературы - 247, из них в зарубежных изданиях 232.