

## ПРИМЕНЕНИЕ SSR МАРКЕРОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ *Venturia inaequalis* НА СЕВЕРНОМ КАВКАЗЕ В АГРОФИТОЦЕНОЗАХ РАЗНОГО ТИПА\*

И.И. СУПРУН<sup>1</sup>, А.И. НАСОНОВ<sup>1</sup>, С.В. ТОКМАКОВ<sup>1</sup>, О.Н. БАРСУКОВА<sup>2</sup>,  
Г.В. ЯКУБА<sup>1</sup>

Парша яблони, вызываемая аскомицетом *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter, — одно из самых вредоносных заболеваний этой культуры, приводящее во всем мире к значительным экономическим потерям урожая яблок. Северо-Кавказский регион относится к зоне с климатическими условиями, благоприятными для ее распространения. Исследования генетического разнообразия возбудителя заболевания необходимо для разработки селекционных программ и систем фитосанитарной защиты против патогена. В представляемой работе впервые был изучен SSR-полиморфизм популяций фитопатогена *V. inaequalis*, сформировавшихся в агрофитоценозах, которые различались по структуре и были локализованы в географически удаленных точках на территории Краснодарского края и Республики Адыгея (два промышленных сада и коллекция вида *Malus orientalis*, расположенные в Прикубанской и Предгорной агроэкологических зонах региона). Генетическая гетерогенность популяций растения-хозяина в точках отбора существенно различалась: промышленный сад — моносортные насаждения яблони домашней сортов Гала, Ренет Симиренко, Голден Делишес и Чемпион; видовая коллекция яблони восточной — образцы, отобранные в разных частях ареала ее природной популяции. В работе использовали восемь SSR маркеров, предложенных разными авторами для изучения этого патогена: 1aac4f, Viga7/116, Vitc1/2, Vitca7/P, Vicacg8/42, Viga3/z, Itcla, Vitc2/D. SSR-анализ полученной нами выборки из 36 моноспоровых изолятов по изученным маркерам выявил 4 аллеля на локус для 1aac4f, 6 — для Vitc2/D, 10 — для Viga7/116 и Vicacg8/42, 11 — для Vitca7/P и 12 — для Vitc1/2 и Itcla. По маркеру Viga3/z был обнаружен один аллель. Несмотря на то, что по ряду маркеров распространенность обнаруженных аллелей в трех изученных субпопуляциях *V. inaequalis* варьировала, различия по этому показателю были недостаточными для дифференциации анализируемых субпопуляций. Результаты выполненной UPGMA-кластеризации не отражали взаимосвязи между распределением штаммов и их географическим происхождением, что указывает на слабые межпопуляционные различия. Это может свидетельствовать о свободном потоке генов между изученными популяциями, обусловленном (в силу значительного для естественного переноса спор расстояния) деятельностью человека. Полученные данные позволили сделать вывод о значительном генетическом разнообразии в исследованной выборке моноспоровых изолятов. Было выявлено более высокое генетическое разнообразие популяции *V. inaequalis*, сформировавшейся на растениях *M. orientalis* из коллекции генетических ресурсов, что свидетельствует о влиянии гетерогенности популяции растения-хозяина на генетический полиморфизм патогена. Сравнение различий в полиморфизме по некоторым SSR маркерам, обнаруженным в представленной работе, с результатами зарубежных ученых, исследовавших полиморфизм в европейских популяциях *V. inaequalis*, позволяет, по нашему мнению, предположить, что популяции *V. inaequalis* в изученном нами регионе генетически отличаются от европейских.

**Ключевые слова:** парша яблони, *Venturia inaequalis*, генетическое разнообразие, SSR маркеры, аллельный полиморфизм, Северный Кавказ.

Парша яблони, вызываемая аскомицетом *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter, — одно из самых экономически значимых заболеваний этой плодовой культуры, приводящее во всем мире к значительным потерям ее урожая (1). В зонах с благоприятными условиями для распространения парши (в основном это страны с умеренным климатом, к которым относятся Россия, и в частности Северо-Кавказский регион) в годы эпифитотий парша может поражать до 80-100 % плодов восприимчивых сортов (2). Высокие требования качества, предъявляемые к продукции, требуют строгого контроля над заболеванием. В настоящее время для этого, как правило, применяют фунгициды, число обработок которыми достигает на высоковосприимчивых сортах от 17 до 22 за сезон (2).

В связи с высокой вредоносностью парши большое значение при-

\* Работа выполнялась при поддержке РФФИ (проект № 15-29-02751 офи\_м).

дается созданию устойчивых сортов. Исследование генетического разнообразия возбудителя заболевания необходимо для разработки как селекционных программ, так и систем защитных мероприятий против патогена. Использование искусственного инфекционного фона для отбора устойчивых форм в гибридном материале позволяет интенсифицировать селекционный процесс. При этом информация о генетическом разнообразии патогена дает возможность формировать наиболее гетерогенный инокулюм, что повышает эффективность оценки на устойчивость (3).

На ранних этапах изучения генетической изменчивости возбудителя использовались морфолого-культуральные характеристики и признаки вирулентности (4-9). Однако наиболее эффективным представляется применение ДНК-маркеров, появление которых открыло новую страницу в изучении генетического разнообразия *V. inaequalis* (10). В начале 1990-х годов маркерный анализ *V. inaequalis* в большинстве случаев основывался на трех методах — RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (random amplification of polymorphic DNA) и анализ ITS-последовательностей (10, 11). По мере развития молекулярно-генетического инструментария появились более информативные ДНК-маркеры, такие как SSR (simple sequence repeats). Они характеризуются высокой специфичностью и чувствительностью, относительной простотой в работе и оценке результатов (10). С их использованием выполнен ряд исследований генетического разнообразия патогена. Так, группой ученых из Франции, Бельгии и Китая в масштабном эксперименте было показано, что *V. inaequalis* возникла в Центральной Азии в центре происхождения *Malus* spp. (12, 13). При этом генетическое разнообразие популяций *V. inaequalis*, найденных на *Malus sieversii* в Центральной Азии, было больше, чем в европейских популяциях на *Malus × domestica* и *Malus sylvestris* (13), и отражало возраст их существования. Зависимость генетического разнообразия *V. inaequalis* от возраста популяции отмечали и другие авторы (14, 15). Во многих популяционных исследованиях этого патогенного гриба была показана высокая степень внутрипопуляционного разнообразия и низкая дифференциация между популяциями (10, 11, 16, 17). Существование огромных панмиктических популяций патогена при достаточно скромном потенциале естественного распространения (15-60 м) (18), объясняется интенсивным потоком генов, обусловленным деятельностью человека (перемещение зараженного посадочного материала и плодов) (10, 13).

Очевидно, что расширение географических границ, в пределах которых изучается генетический полиморфизм, будет способствовать уточнению представлений о закономерностях, характеризующих внутри- и межпопуляционные генетические взаимосвязи у *V. inaequalis*. Кроме того, анализ генетического разнообразия патогена в природных и антропогенных экосистемах Северо-Кавказского региона как части ареала вида *M. orientalis*, даст возможность оценить микроэволюционные процессы взаимодействия патогена и растения-хозяина. На территории России такого рода исследования до настоящего времени не проводились.

Используя SSR маркеры, мы впервые провели SSR-генотипирование в географически удаленных популяциях *V. inaequalis* на Северном Кавказе и выявили полиморфизм по ряду маркеров, которые использовались при анализе генетической структуры популяций этого патогена в других регионах. Сопоставление полученных нами результатов с данными литературы позволяет нам предположить, что северокавказская популяция этого патогена может генетически отличаться от европейской.

В задачу работы входил анализ генетического разнообразия изоля-

тов *Venturia inaequalis*, отобранных в разных по структуре и локализации агрофитоценозах, с использованием SSR маркеров.

**Методика.** Местами сбора образцов *Venturia inaequalis* (апрель-май 2015 года) были три географические точки в двух агроэкологических зонах Северо-Кавказского региона — Прикубанской (№ 1, г. Краснодар, пос. Водники, ЗАО «ОПХ «Центральное», 2-е отделение) и Предгорной, расположенной в Республике Адыгея (№ 2, Майкопский р-н, пос. Подгорный, Майкопская опытная станция ВИР, коллекция генетических ресурсов яблони; № 3, станица Абадзехская, Крестьянское хозяйство «Мускат»). Выделение моноспоровых изолятов возбудителя из аскоспоровой стадии в чистую культуру осуществляли в стерильных условиях по оригинальной методике (19), используя листовую опад с псевдотециями согласно описанным протоколам (20). Подготовку агаризованных сред проводили согласно стандартным микробиологическим приемам (21, 22). В точках № 2 и № 3 изоляты получали с разных деревьев одного вида или сорта (соответственно *M. orientalis* и Чемпион), в точке № 1 — с разных сортов яблони (Гала, Ренет Симиренко и Голден Делишес).

ДНК экстрагировали согласно рекомендациям (23).

При оценки генетического разнообразия использовали микросателлитные ДНК-маркеры 1aac4f (10) и Viga7/116, Vitc1/2, Vitcca7/P, Vicacg8/42, Viga3/z, Itcla, Vitc2/D (24). Смесь для PCR-амплификации (25 мкл) содержала 50-70 мкг ДНК, 0,05 мМ dNTPs, 0,3 мкМ каждого праймера; 2,5 мкл 10× реакционного буфера, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 ед. Taq ДНК-полимеразы. PCR проводили в амплификаторе Mastercycler gradient («Eppendorf», Германия) по следующей схеме: 5 мин при 95 °С (начальная денатурация); 10 с при 95 °С (денатурация), 30 с при 60 °С (отжиг праймеров), 30 с при 72 °С (элонгация) (30 циклов); 3 мин при 72 °С. Размеры амплифицированных фрагментов SSR маркеров определяли на автоматическом генетическом анализаторе ABI prism 3130 («Applied Biosystems», США). Полученные данные обрабатывали в программе GeneMapper 4.1 входящей в программное обеспечение анализатора ABI prism 3130.

Кластерный анализ выполняли методом UPGMA с использованием пакета программ PAST (25). Частоты аллелей рассчитывали в программе GenAlEx 6.5 (26), показатель PIC (Polymorphism Information Content) — в программе Polymorphism Information Content Calculator (доступна по ссылке <http://w3.georgikon.hu/pic/english/kezi.aspx>) (27).

**Результаты.** При обследовании было выделено 36 моноспоровых изолятов (в пункте № 1 — 20, № 2 — 9 и № 3 — 7). В изученной выборке при SSR-генотипировании семь из восьми использованных SSR маркеров оказались полиморфными: по ним было обнаружено от 4 до 12 аллелей на локус (табл. 1). Маркер Viga3/z, по которому идентифицировали один аллель (99 п.н.), исключили из статистической обработки данных как мономорфный.

**1. Полиморфизм SSR маркеров в изученной выборке изолятов *Venturia inaequalis* из разных агроэкологических зон (n = 36, Северо-Кавказский регион, 2015 год)**

Показатель	SSR маркер						
	1aac4f	Viga7/116	Vitc1/2	Vitcca7/P	Vicacg8/42	Itcla	Vitc2/D
Число аллелей на локус	4	10	12	11	10	12	6
Диапазон длин фрагментов, п.н.	107-120	138-180	181-220	168-215	203-230	116-167	213-246
PIC	0,153	0,733	0,733	0,870	0,655	0,854	0,710

Примечание. PIC — polymorphism information content.

По маркерам 1aac4f и Vitc2/D отмечали наименьший аллельный

полиморфизм. Сравнивая данные о степени SSR полиморфизма, полученные нами и зарубежными авторами, можно отметить как ряд соответствий, так и противоположные результаты для ряда регионов. Так, в Великобритании при использовании четырех SSR маркеров для сравнения генетического разнообразия и структуры популяций *V. inaequalis* в регионах Ворчестершир и Ист Моллинг в выборке из 102 моноспоровых изолятов наибольший полиморфизм (29 аллелей на локус) выявили по SSR маркеру Vitc2/D, тогда как по маркерам Vitca7/P и Vitc1/2 показатель был значительно ниже — соответственно 19 и 9 аллелей на локус (14). В нашем исследовании (см. табл. 1) маркеры Vitca7/P и Vitc1/2 можно отнести к наиболее полиморфным. В то же время показатели полиморфизма SSR маркеров Iaac4f и Itcla, выявленного I. Tenzer с соавт. (10) и нами, напротив, соответствуют друг другу. Эти исследователи оценивали генетическое разнообразие в 11 популяциях *V. inaequalis* из пяти стран Европы — Франции, Германии, Италии, Нидерландов и Швейцарии. Согласно их сообщению, маркер Itcla, как и в нашей работе, имел один из наиболее высоких показателей аллельного полиморфизма (26 аллелей на локус), при этом по маркеру Iaac4f показатель был одним из наиболее низких (4 аллеля на локус). Группа исследователей, разработавших 21 SSR маркер для *V. inaequalis* и оценивших их полиморфизм в выборке, включающей 44 моноспоровых изолята из шести стран Европы, для Viga7/116, Vitc1/2, Vitca7/P и Vicacg8/42 идентифицировали соответственно 8, 18, 9 и 11 аллелей на локус при среднем показателе 9 аллелей на локус в выборке из 21 маркера (24). По этим маркерам в нашем исследовании также был выявлен высокий полиморфизм. В то же время по маркеру Vitc2/D сообщается о наибольшем числе аллелей (24 на локус) (24), тогда как в изученных нами популяциях он оказался одним из наименее полиморфных (6 аллелей на локус).

Значительные отличия полиморфизма по некоторым SSR-маркерам, выявленного нами в северо-кавказских субпопуляциях *V. inaequalis*, от описанного зарубежными авторами для европейской популяции этого патогена, по нашему мнению, могут указывать на генетические различия между северокавказской и европейской популяциями *V. inaequalis* вследствие их географической удаленности.

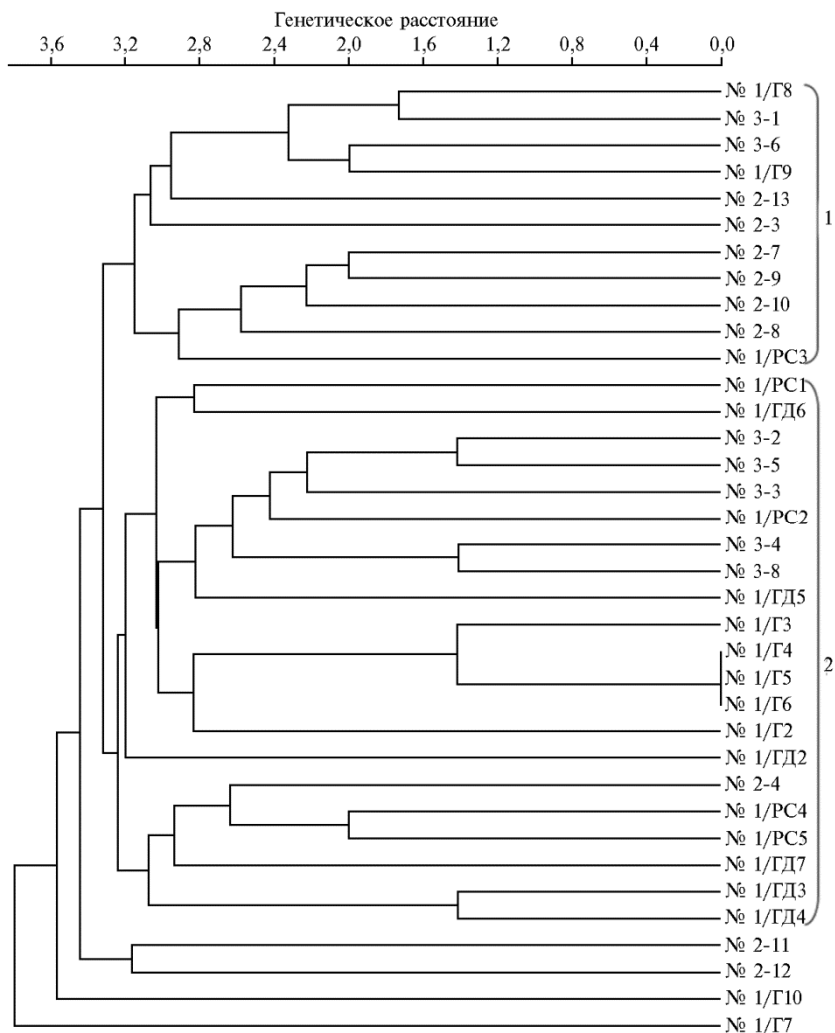
Для оценки различий между тремя субпопуляциями выполнили сравнение частот встречаемости аллелей SSR маркеров в выборках моноизолятов (табл. 2).

## 2. Частота встречаемости выявленных аллелей по результатам SSR-генотипирования изолятов *Venturia inaequalis* в трех субпопуляциях патогена из разных агроэкологических зон (Северо-Кавказский регион, 2015 год)

SSR маркер	№ 1 (n = 20)	№ 2 (n = 9)	№ 3 (n = 7)
Iaac4f	107 (0,950); 120 (0,050)	107 (0,778); 109 (0,111); 112 (0,111)	107 (1,000)
Viga7/116	143 (0,025); 164 (0,175); 166 (0,050); 168 (0,350); 170 (0,125); 172 (0,075); 174 (0,125); 180 (0,075)	138 (0,111); 141 (0,111); 164 (0,444); 168 (0,333)	143 (0,143); 164 (0,286); 168 (0,571)
Vitc1/2	183 (0,175); 187 (0,025); 190 (0,100); 192 (0,200); 193 (0,050); 195 (0,300); 213 (0,050); 215 (0,100)	181 (0,111); 190 (0,222); 192 (0,222); 210 (0,333); 220 (0,111)	190 (0,286); 192 (0,286); 194 (0,429)
Vitca7/P	0 (0,050); 168 (0,125); 194 (0,175); 196 (0,050); 200 (0,075); 202 (0,250); 204 (0,050); 210 (0,125); 215 (0,100)	170 (0,111); 196 (0,222); 198 (0,222); 200 (0,111); 202 (0,111); 204 (0,111); 215 (0,111)	194 (0,286); 198 (0,429); 200 (0,143); 202 (0,143)
Vicacg8/42	205 (0,025); 210 (0,575); 212 (0,050); 216 (0,100); 218 (0,050); 222 (0,100); 224 (0,050); 228 (0,050)	203 (0,222); 205 (0,333); 210 (0,222); 216 (0,111); 230 (0,111)	210 (0,857); 216 (0,143)

Itc1a	116 (0,050); 120 (0,175);	133 (0,222); 137 (0,111);	120 (0,429); 133 (0,286);
	129 (0,050); 131 (0,200);	139 (0,111); 143 (0,333);	135 (0,286)
	135 (0,150); 141 (0,375)	145 (0,111); 167 (0,111)	
Vite2/D	213 (0,200); 232 (0,200);	232 (0,667); 234 (0,111);	234 (0,286); 236 (0,714)
	234 (0,400); 236 (0,150);	236 (0,111); 246 (0,111)	
	244 (0,050)		

Примечание. Пункты сбора образцов: № 1 — г. Краснодар, пос. Водники, ЗАО ОПХ «Центральное, 2-е отделение (Прикубанская агроэкологическая зона); № 2 — Майкопский район, пос. Подгорный, коллекция генетических ресурсов яблони, Майкопская опытная станция ВИР, № 3 — станция Абадзехская, Крестьянское хозяйство «Мускат» (Республике Адыгея, Предгорная агроэкологическая зона). Для выявленных аллелей приведены размеры (п.н.), частота встречаемости указана в скобках.



UPGMA-дендрограмма, характеризующая степень генетического сходства между моноспоровыми изолятами *Venturia inaequalis* из разных агроэкологических зон: № 1 — г. Краснодар, пос. Водники, ЗАО ОПХ «Центральное, 2-е отделение (Прикубанская агроэкологическая зона); № 2 — Майкопский район, пос. Подгорный, коллекция генетических ресурсов яблони, Майкопская опытная станция ВИР, № 3 — станция Абадзехская, Крестьянское хозяйство «Мускат» (Республике Адыгея, Предгорная агроэкологическая зона) (Северо-Кавказский регион, 2015 год).

Наибольшее число аллелей, выявленное в субпопуляции № 1 из Прикубанской агроклиматической зоны, обусловлено наибольшим размером выборки — 20 моноспоровых изолятов. Следует отметить наличие аллелей с максимальным значением этого показателя одновременно в двух

или трех субпопуляций (аллель 107 п.н. по маркеру 1aac4f, аллель 168 п.н. по маркеру Viga7/116 и аллель 210 п.н. по маркеру Vicacg8/42). Этот факт может свидетельствовать о невысоких межпопуляционных различиях, несмотря на то, что в каждой из выборок выявлялись уникальные аллели, которые в большинстве случаев встречались с невысокой частотой. Представляет интерес группа моноспоровых изолятов, отобранных в коллекции образцов вида *Malus orientalis* на Майкопской опытной станции ВИР. В этой группе, включающей 9 изолятов, по ряду SSR маркеров число аллелей было сопоставимо или превышало таковое в популяции № 1, представленной в нашем исследовании 20 изолятами (SSR маркеры 1aac4f, Itcla и Vite2/D). Это можно рассматривать как свидетельство более высокого генетического разнообразия популяции *V. inaequalis*, сформировавшейся на растениях *M. orientalis* из коллекции генетических ресурсов, в которой сохраняется широкий перечень видовых образцов рода *Malus*, а также сортов яблони домашней (точка отбора № 2). Отметим, что полученные нами результаты согласуются с данными О.Н. Барсуковой (5), сравнившей разнообразие патогена в этой коллекции и в регионе на основании морфолого-культуральных и вирулентных признаков. Автор делает вывод, что разнообразие патогена на диких видах-хозяевах в естественных условиях произрастания и в коллекционных насаждениях выше, чем в популяциях, сформировавшихся на окультуренном виде (5).

Для оценки степени генетического сходства моноспоровых изолятов в изучаемой выборке мы выполнили кластерный анализ (рис.). По результатам кластеризации можно выделить два основных кластера и четыре образца (№№ 2-11, 2-12, 1/Г10, 1/Г7), отнесенных в три отдельные ветви. Очевидно, что распределение изолятов по кластерам не соответствует их географическому происхождению. Кроме того, в кластере 1 распределение образцов не зависело от сорта, с которого был выделен патоген. Несмотря на то, что в кластере 2 сформировалась группа образцов (№№ 1/Г3, 1/Г4, 1/Г5, 1/Г6, 1/Г2), полученных с сорта Гала в садовых насаждениях ЗАО «ОПХ «Центральное», три других образца с этого сорта вошли в другие кластеры. Образцы №№ 1/Г4, 1/Г5 и 1/Г6, вероятно, представляют собой клоны, так как объединялись на минимальном генетическом расстоянии (вследствие идентичного аллельного набора по изученным SSR маркерам). Группы моноспоровых изолятов, выделенных на сортах Голден Делишес (№ 1/ГД) и Ренет Симиренко (№ 1/РС), тоже не сформировали отдельных кластеров.

Таким образом, высокие показатели генетического разнообразия в исследованной выборке моноспоровых изолятов *V. inaequalis* при небольших межпопуляционных различиях могут свидетельствовать о свободном потоке генов между изученными популяциями, обусловленном (в силу значительного для естественного переноса спор расстояния) деятельностью человека, что согласуется с данными литературы (10, 11, 15). SSR маркеры выявили генетические различия между популяциями патогена, сформированными в разных по структуре агрофитоценозах: в гетерогенных коллекционных насаждениях (точка отбора № 2) аллельный полиморфизм SSR локусов *V. inaequalis* был выше, чем в моносортных посадках промышленных садов (вероятно, вследствие значительно более высокого разнообразия растения-хозяина). Известно, что высокая степень генетического разнообразия в популяции фитопатогена препятствует доминированию единичных ультравирулентных и агрессивных биотипов, что снижает вероятность возникновения эпифитотий (28). Этот факт доказывает обоснованность подхода, основанного на использовании насаждений со смешанным сортовым составом.

Следует отметить различия в результатах оценки полиморфизма некоторых SSR маркеров в нашем исследовании северокавказской популяции и в работах, в которых изучались европейские популяции *V. inaequalis*. Нельзя исключить, что причина этого — значительные генетические дистанции между популяциями *V. inaequalis* в указанных регионах, что может свидетельствовать об ограниченности потока генов из Европы на Северный Кавказ и независимом формировании популяции патогена в северокавказском регионе. Возможно, одним из факторов, обусловивших такое формирование, стало то, что Северный Кавказ расположен в границах ареала вида *M. orientalis* — растения-хозяина для *V. inaequalis*.

Итак, полученные результаты позволяют сделать вывод о значительном генетическом разнообразии в исследованной выборке моноспоровых изолятов *Venturia inaequalis*. Кластеризация изолятов не отражала их географического происхождения, что указывает на слабые межпопуляционные различия. В то же время кластеризация была связана с типом насаждений (моносортные сады или гетерогенные коллекционные посадки), но и не всегда зависела от сорта, на котором они были выделены. Полиморфизм, наблюдаемый нами по некоторым из использованных SSR маркеров, соответствовал описанному в литературе для европейских популяций патогена, но по ряду других имелись расхождения, которые, по нашему мнению, могут быть связаны с особенностями формирования северокавказской популяции патогена.

<sup>1</sup>ФГБНУ Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, 350901 Россия, г. Краснодар, ул. 40-летия Победы, 39, e-mail: kubansad@kubannet.ru, supruni@mail.ru ☒;

<sup>2</sup>Филиал Майкопская опытная станция ФГБНУ ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, 385746 Россия, Республика Адыгея, Майкопский р-н, пос. Подгорный, e-mail: barsukova\_37@mail.ru

Поступила в редакцию 9 августа 2016 года

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2018, V. 53, № 1, pp. 170-178

## APPLICATION OF SSR MARKERS FOR STUDY OF GENETIC DIVERSITY OF *Venturia inaequalis* IN THE DIFFERENT TYPES OF ORCHARDS IN THE NORTH CAUCASIAN REGION

I.I. Suprun<sup>1</sup>, A.I. Nasonov<sup>1</sup>, S.V. Tokmakov<sup>1</sup>, O.N. Barsukova<sup>2</sup>, G.V. Yakuba<sup>1</sup>

<sup>1</sup>North Caucasian Federal Research Center of Horticulture, Viticulture, Wine-making, Federal Agency for Scientific Organizations, 39, ul. 40-letiya Pobedy, Krasnodar, 350901 Russia, e-mail kubansad@kubannet.ru, supruni@mail.ru (☒ corresponding author);

<sup>2</sup>Maikop Experiment Breeding Station, Branch of Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, Federal Agency for Scientific Organizations, pos. Podgornii, Maikop Region, Republic of Adygeya, 385746 Russia, e-mail barsukova\_37@mail.ru

ORCID:

Suprun I.I. orcid.org/0000-0003-0355-8395

Barsukova O.N. orcid.org/0000-0003-1694-7146

Nasonov A.I. orcid.org/0000-0002-4927-2192

Yakuba G.V. orcid.org/0000-0001-7735-960X

Tokmakov S.V. orcid.org/0000-0002-2092-7757

The authors declare no conflict of interests

Supported by Russian Foundation for Basic Research (project № 15-29-02751 ofi\_m)

Received August 9, 2016

doi: 10.15389/agrobiol.2018.1.170eng

### Abstract

Apple scab caused by ascomycete fungus *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter is one of the most harmful diseases of apple trees, which leads to significant economic losses in apple production in the world. North Caucasus is a region with climatic conditions favorable for *V. inaequalis*. Therefore, the creation of resistant varieties is an important target for apple breeding. Study of the

genetic diversity of the pathogen is an integral part of both science-based apple breeding programs and systems of protection against the pathogen. This paper is the first report on SSR analysis of genetic diversity of *V. inaequalis* strains collected in apple orchards that differ in structure and are located geographically remotely in the Krasnodar Territory and the Republic of Adygea. To study the genetic polymorphism of the phytopathogen populations, two industrial gardens and a collection of *Malus orientalis* were surveyed in the Kuban and Caucasus foothill agro-ecological zones of the region. The genetic heterogeneity of the host plant populations at the sampling sites varied significantly, since the industrial orchards were single-cultivar plantations of the apple varieties Gala, Renet Simirenko, Golden Delicious, and Champion while in the collection garden the accessions originated from different parts of the *M. orientalis* natural area. Eight SSR markers used were Iaac4f, Viga7/116, Vitc1/2, Vitcca7/P, Vicacg8/42, Viga3/z, Itcla, Vitc2/D. The number of alleles per locus revealed in SSR analysis of 36 monospore isolates of *V. inaequalis* was 4 for Iaac4f, 6 for Vitc2/D, 10 for Viga7/116 and Vicacg8/42, 11 for Vitcca7/P, and 12 for Vitc1/2 and Itcla. Upon the whole, there were 4 (Iaac4f) to 12 alleles (Vitic1/2, Itcla) for polymorphic markers, and only one allele was detected for marker Viga3/z. Despite the fact that some markers showed various distributions of identified alleles in all subpopulations, these differences were not sufficient to differentiate the subpopulations. UPGMA-analysis showed no relationship between clusterization and the geographical origin of the isolates, indicating low inter-population differences. This can indicate a free gene flow between the populations due to human activity as they are too distant from each other to allow natural transfer of spores. The obtained results suggest significant genetic diversity in the investigated set of monospore isolates. Genetic diversity was higher in the *V. inaequalis* population from the *M. orientalis* collection, indicating the effect of plant population heterogeneity on genetic polymorphism of the pathogen. In our opinion, the differences in polymorphism for some SSR markers, when compared our data and the results reported by other researchers' for European populations of *V. inaequalis*, could be due to genetic differences in populations of *V. inaequalis* from North Caucasus region and the European populations.

Keywords: apple scab, *Venturia inaequalis*, genetic diversity, SSR-markers, allele polymorphism, North Caucasus.

## REFERENCES

1. MacHardy W.E. *Apple scab: biology, epidemiology, and management*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 1996.
2. Nasonov A. I., Suprun I.I. *Mikologiya i fitopatologiya*, 2015, 49(5): 275-285 (in Russ.).
3. Sedov E.N., Zhdanov V.V., Serova Z.M., Makarkina M.A. Apple breeding for scab resistance as a development of N.I. Vavilov's and I.V. Michurin's ideas. *Agricultural Biology*, 2013, 1: 42-52 (in Russ.).
4. Fedorova R.N. *Parsha yabloni* [Scab of apple trees]. Leningrad, 1977 (in Russ.).
5. Barsukova O.N. *Mikologiya i fitopatologiya*, 1985, 19(6): 499-502 (in Russ.).
6. Barsukova O.N. *Mikologiya i fitopatologiya*, 1983, 17(5): 395-403 (in Russ.).
7. Dorozhkin N.A., Bondar' L.V., Konovalova N.A. *Mikologiya i fitopatologiya*, 1979, 13(5): 401-404 (in Russ.).
8. Tsikaridze O.N., Turtsevadze Z.R., Lezhava I.L., Mikaberidze M.S. *Soobshcheniya AN GSSR*, 1983, 3(1): 101-104 (in Russ.).
9. Zhdanov V.V., Sedov E.N. *Selektsiya yabloni na ustoichivost' k parshe* [Breeding apple trees for resistance to scab]. Tula, 1991 (in Russ.).
10. Tenzer I., Degli-Ivanissevich S., Morgante M., Gessler C. Identification of microsatellite markers and their application to population genetics of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, 1999, 89(9): 748-753.
11. Tenzer I., Gessler C. Subdivision and genetic structure of four populations of *Venturia inaequalis* in Switzerland. *Eur. J. Plant Pathol.*, 1997, 103(6): 565-571.
12. Gladieux P., Zhang X.G., Afoufa-Bastien D., Sanhueza R. V., Sbaghi M., Le Cam B. On the origin and spread of the scab disease of apple: out of Sentral Asia. *PLoS ONE*, 2008, 3(1): 1455 (doi: 10.1371/journal.pone.0001455).
13. Gladieux P., Zhang X.G., Roldan-Ruiz I.R., Caffier V., Leroy T., Devaux M., Glabeke S.V., Coart E., Cam B.L. Evolution of the population structure of *Venturia inaequalis*, the apple scab fungus, associated with the domestication of its host. *Mol. Ecol.*, 2010, 19(4): 658-674 (doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04498.x).
14. Xu X.-M., Yang J.-R., Thakur V., Roberts A.L., Barbara D.J. Population variation of apple scab (*Venturia inaequalis*) isolates from Asia and Europe. *Plant Dis.*, 2008, 92: 247-252 (doi: 10.1094/PDIS-92-2-0247).
15. Xu X., Yang J., Thakur V., Roberts A., Barbara D.J. Population variation of apple scab (*Venturia inaequalis*) within mixed orchards in the UK. *Eur. J. Plant Pathol.*, 2013, 135(1): 97-104 (doi: 10.1007/s10658-012-0068-4).



16. Khajuria Y.P., Kaul S., Dhar M.K. Molecular characterization of *Venturia inaequalis* causing apple scab in Kashmir. *Open Access Scientific Reports*, 2012, 1: 339 (doi: 10.4172/scientificreports.339).
17. Padder B.A., Sofi T.A., Ahmad M., Shah M.-Ul-D., Hamid A., Saleem S., Ahanger F.A. Virulence and molecular diversity of *Venturia inaequalis* in commercial apple growing regions in Kashmir. *J. Phytopathol.*, 2013, 161: 271-279 (doi: 10.1111/jph.12061).
18. Leroy T., Lemaire C., Dunemann F., Le Cam B. The genetic structure of a *Venturia inaequalis* population in a heterogeneous host population composed of different *Malus* species. *BMC Evol. Biol.*, 2013, 13(1): 64 (doi: 10.1186/1471-2148-13-64).
19. Nasonov A.I., Yakuba G.V., Suprun I.I. *Mikologiya i fitopatologiya*, 2016, 50(2): 131-132 (in Russ.).
20. Smol'yakova V.M., Yakuba G.V. *Diagnostika, uchet i prognoz parshi yabloni na Severnom Kavkaze. Nauchno-metodicheskie rekomendatsii* [Apple scab detection, records and forecasting in the North Caucasus. Scientific and methodical recommendations]. Krasnodar, 2003 (in Russ.).
21. Tepper E.Z., Shi'nikova V.K., Pereverzeva G.I. *Praktikum po mikrobiologii* [Workshop on microbiology]. Moscow, 1979 (in Russ.).
22. Bilai V.I. *Metody eksperimental'noi mikologii* [Methods of experimental mycology]. Kiev, 1982 (in Russ.).
23. Cenis J.L. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Res.*, 1992, 20: 2380.
24. Guérin F., Franck P., Loiseau A., Devaux M., Le Cam B. Isolation of 21 new polymorphic microsatellite loci in the phytopathogenic fungus *Venturia inaequalis*. *Mol. Ecol. Notes*, 2004, 4(2): 268-270 (doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00637.x).
25. Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 2001, 4(1): 9.
26. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research — an update. *Bioinformatics*, 2012, 28(19): 2537-2539 (doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x).
27. Nagy S., Poczai P., Cernák I., Gorji AM., Hegedűs G., Tallér J. PIC calc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochem. Genet.*, 2012, 50: 670-672 (doi: 10.1080/09712119.2015.1124328).
28. D'yakov Yu.T. *Populyatsionnaya biologiya fitopatogennykh gribov* [Population biology of phytopathogenic fungi]. Moscow, 1998 (in Russ.).