

УДК 634.11:575:632.4

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ ЯБЛОНИ К МУЧНИСТОЙ РОСЕ PL1 И PL2 И ПАРШЕ Vf И Vm У СОРТОВ ЯБЛОНИ ИЗ КОЛЛЕКЦИЙ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ КРЫМСКОГО ПОЛУОСТРОВА\***

**Супрун И.И.**, канд. биол. наук, **Токмаков С.В.**, канд. биол. наук  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства»  
(Краснодар)

**Рисованная В.И.**, канд. биол. наук, **Володин В.А.**  
Национальный институт винограда и вина «Магарач» (Ялта)

**Щербатко В.Д.**, канд. с.-х. наук  
Крымская помологическая станция Никитского ботанического сада (Севастополь)

**Реферат.** Представлены результаты молекулярно-генетической идентификации генов устойчивости яблони к парше *Vf* и *Vm* и мучнистой росе *Pl1* и *Pl2* у сортов яблони из коллекций генетических ресурсов Крыма. Выявлен доминантный аллель гена *Vf* у сортов современной селекции Амулет и Фаворит. Отсутствие искомым генов устойчивости у аборигенных сортов, для которых фенотипически установлена устойчивость к данным патогенам, может свидетельствовать о наличии новых генетических детерминант устойчивости.

**Ключевые слова:** яблоня, устойчивость к парше и мучнистой росе, аборигенный генофонд, ДНК-маркерный анализ

**Summary.** The results of molecular-genetic identification of *Vf* and *Vm* genes of apple resistant to scab and *Pl1* and *Pl2* genes resistant to powdery mildew of apple varieties from the collections of genetic resources of the Crimea is presented. Dominant allele of the *Vf* gene was identified in the varieties of modern breeding: Amulet and Favorite. The absence of the desired resistance genes in native varieties, for which resistance to these pathogens was phenotypically confirmed, may indicate the presence of new genetic determinants of resistance.

**Key words:** apple, scab and powdery mildew resistance, indigenous genetic resources, DNA-markers analysis

**Введение.** Парша и мучнистая роса относятся к одним из наиболее вредоносных заболеваний яблони. Возбудителями данных болезней являются грибные патогены *Venturia inaequalis* (Ске.) и *Podosphaera leucotricha* Salm., соответственно. Для предотвращения развития заболеваний широко используются химические средства защиты растений, существенно снижающие экологичность плодового хозяйства и биологическую безопасность продукции. Наиболее оптимальный путь решения данной проблемы – создание устойчивых сортов. На современном этапе развития селекционных технологий при создании устойчивых сортов может быть эффективно использован метод ДНК-маркирования, позволяющий идентифицировать наличие генов устойчивости без оценки гибридных растений на инфекционном фоне. Особая ценность данного метода заключается в том, что он позволяет выявлять в анализируемом образце одновременное присутствие нескольких генов устойчивости как к одному, так и к разным заболеваниям.

У яблони на настоящий момент идентифицировано и картировано около 15 генов устойчивости к парше [1, 2] и 7 генов устойчивости к мучнистой росе [3].

\* Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО и при поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края гранта РФФИ № 14-34-50931 мол\_нр.

Для большинства из известных генов устойчивости яблони к парше и мучнистой росе имеются ДНК-маркеры, локализованные на различных позициях от гена и позволяющие вести их идентификацию с различным уровнем достоверности, зависящим от дистанции ДНК-маркер – ген.

Для гена широкого спектра устойчивости к парше *Vf*, локализованного на хромосоме 1, на сегодняшний день созданы наиболее «надежные» ДНК-маркеры, основанные на последовательности, входящей непосредственно в структуру гена [4].

Для гена устойчивости к парше *Vm*, локализованного на хромосоме 17, также идентифицирован ДНК-маркер, сонаследуемый с ним и перспективный к использованию для маркер-вспомогательного отбора [5].

Необходимо отметить, что для генов устойчивости яблони к парше в настоящее время принято новое номенклатурное обозначение – *Rvi*. В соответствии с этим гены *Vf* и *Vm* имеют название *Rvi6* и *Rvi5* [2]. Данные гены, наряду с геном *Va*, относятся к наиболее часто используемым в селекционных программах. К генам устойчивости яблони к мучнистой росе *Pl1* и *Pl2*, картированным на хромосомах 12 и 11 соответственно, также идентифицированы ДНК-маркеры, которые в настоящее время используются в программах по маркерной селекции на устойчивость к мучнистой росе [6-8].

Одним из важных направлений в использовании ДНК-маркеров к генам устойчивости к патогенам, наряду с использованием для отбора селекционных форм, несущих целевые гены, является также выполнение скрининга коллекций генетических ресурсов для изучения природы устойчивости и выявления доноров искомым генов.

В задачи нашего исследования входило выполнение идентификации генов устойчивости яблони к мучнистой росе *Pl1* и *Pl2* и парше *Vf* и *Vm* у сортов яблони из коллекций генетических ресурсов Крымского полуострова.

**Объекты и методы исследований.** Материалом для исследования послужили 23 сорта яблони из коллекции генетических ресурсов Никитского Ботанического сада (г. Ялта):

- современные сорта селекции Крымской опытной станции садоводства – Фаворит, Киммерия, Чемпион иммунитетный, Белоснежка, Балаклавское, Румянка крымская, Крымское зимнее; селекции Института плодоводства Украинской Академии аграрных наук – Амулет; Казахского НИИ плодоводства и виноградарства – Синап алма-атинский;
- аборигенные Крымские сорта: Салгирское, Челеби, Синап судакский, Ласпи, Долкран, Синап белый, Кара Синап, Кандиль Синап, Демир Алма, Гульпембе, Татарское зимнее, Ялтинское пресное.

Сорта мировой селекции: Макфри, Либерти, Флорина. Для экстракции ДНК использовали метод ЦТАБ в модификации S.O. Rogers & A.J. Bendich [2]. Для идентификации генов устойчивости к парше *Vf* и *Vm* использовали известные на сегодняшний день ДНК маркеры к ним: *VfC1* (ген *Vf*) – SCAR ДНК-маркер, созданный на основе полиморфизма нуклеотидных последовательностей аллелей гена [4] и *Hi07h02* (ген *Vm*) – SSR-локус, ко-сегрегирующий с геном [5]. Для идентификации генов устойчивости к мучнистой росе *Pl1* и *Pl2* использовали ДНК-маркеры AT20-450 и OPU02 SCAR, соответственно [6-8].

Постановку ПЦР проводили по следующей программе: начальная денатурация 3 мин при 95 °С, далее 35 циклов: 10 секунд при 94 °С денатурация, 45 секунд при отжиге праймеров при N °С, 45 секунд при 72 °С – элонгация; завершающий цикл элонгации – 5 минут при 72 °С; N= 60 °С для ДНК-маркера *VfC1* (ген *Vf*); 58 °С для SSR-маркера *Hi07h02* (ген *Vm*); 62 °С для маркеров AT20-450 (*Pl1*) и OPU02 SCAR (*Pl2*). Для маркеров AT20-450 и OPU02 SCAR было увеличено количество циклов реакции до 40.

При этом использовали следующие концентрации компонентов реакционной смеси: 0,05 мМ дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 0,3 мкМ каждого праймера, 2,5 мкл ПЦР-буфера и 1 ед. Taq ДНК-полимеразы (ООО «СибЭнзим»), 50 нг ДНК. ПЦР проводили в общем объеме 25 мкл. Анализ полиморфизма амплифицированных фрагментов SSR-маркера гена *Vt* проводили с использованием фрагментного анализа на автоматическом генетическом анализаторе ABI prism 3130. Результаты обрабатывали в программе GeneMapper 4.1.

Электрофорез продуктов амплификации маркеров VfC1, AT20-450 и OPU02 SCAR вели в 1,5% агарозном геле при напряжении 10V/см в течение 40 минут. Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в УФ-спектре.

**Обсуждение результатов.** При проведении амплификации с ДНК-маркером гена устойчивости яблони к мучнистой росе *P11* выявляется два типа ПЦР-продуктов: 450 и 500 пар нуклеотидов (п.н.). Фрагмент 450 п. н. специфичен для доминантного аллеля, 500 п. н. – для рецессивного.

В ходе выполнения ПЦР-идентификации данных генов по ДНК-маркеру AT20-450 (*P11*) у всех изученных генотипов был идентифицирован только фрагмент размером 500 пар нуклеотидов (рис. 1-А), свидетельствующий о наличии рецессивного аллеля. Ни у одного образца из изученной выборки не было идентифицировано фрагмента размером 450 п. н., специфичного для доминантного аллеля.

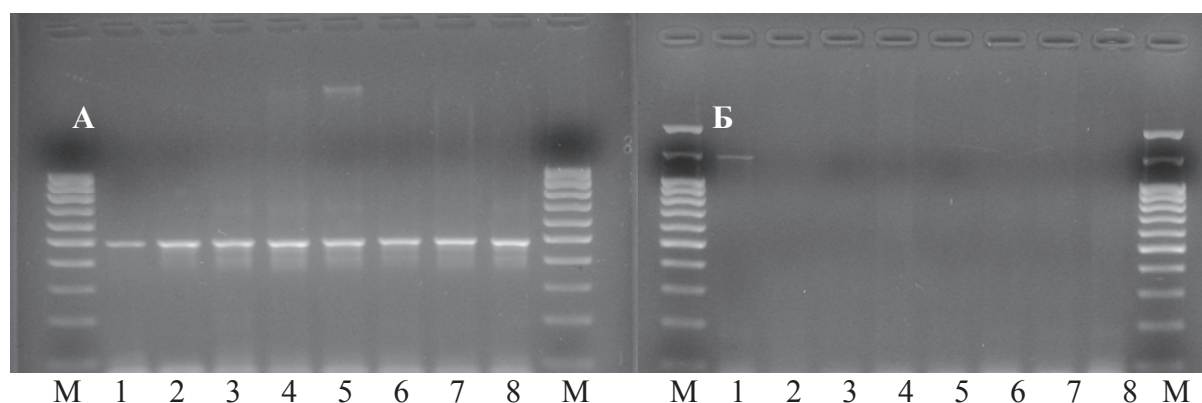


Рис. 1. Результаты электрофоретического анализа продуктов амплификации ДНК-маркеров AT20-450 (А) и OPU02 SCAR(Б), косегрегирующих с генами устойчивости яблони к мучнистой росе *P11* и *P12*

М – маркер молекулярной массы ДНК («шаг» маркера 100 п. н.)

1 – 8 сорта яблони: 1 – Фаворит, 2 – Киммерия, 3 – Чемпион, 4 – Балаклавское, 5 – Белоснежка, 6 – Салгирское, 7 – Ласпи, 8 – Румянка крымская

При проведении ПЦР-анализа по маркеру гена *P12* OPU02 SCAR у сорта Фаворит был выявлен продукт размером около 1500 п. н. (рис. 1Б). Однако, для доминантного аллеля гена *P12* специфичен фрагмент размером 1700 п. н. В то же время по литературным данным известно, что маркер OPU02 SCAR, дает амплификацию фрагмента размером 2000 п. н при наличии гена устойчивости к мучнистой росе *Plmis*.

Наличие сайтов отжига для маркера OPU02 SCAR в геноме сорта Фаворит может свидетельствовать о присутствии у этого сорта неизвестных аллелей данных генов или нового гена устойчивости. В пользу этого также свидетельствуют данные об устойчивости сорта Фаворит к мучнистой росе выше среднего уровня. У всех остальных сортов из изученной выборки продуктов амплификации выявлено не было, что свидетельствует о наличии рецессивного аллеля у них.

В ходе выполнения ПЦР-идентификации данных генов по ДНК-маркеру VFC1 (ген *Vf*) у сортов-стандартов Флорина, Либерти и Макфри, для которых наличие данного гена устойчивости известно из литературных источников, а также в соответствии с их происхождением, был выявлен фрагмент амплификации размером около 286 п. н., что соответствует доминантному аллелю. Наряду с сортами-стандартами, данный ген был идентифицирован у двух сортов – Амулет и Фаворит. На рис. 2 представлены результаты электрофоретического разделения фрагментов амплификации с ДНК-маркером гена *Vf*. Видно, что у образцов №1 (сорт Фаворит) и №11 (сорт Макфри) амплифицируется фрагмент размером около 286 п. н., отсутствующий у остальных представленных сортов. Это свидетельствует о наличии у них доминантного аллеля.

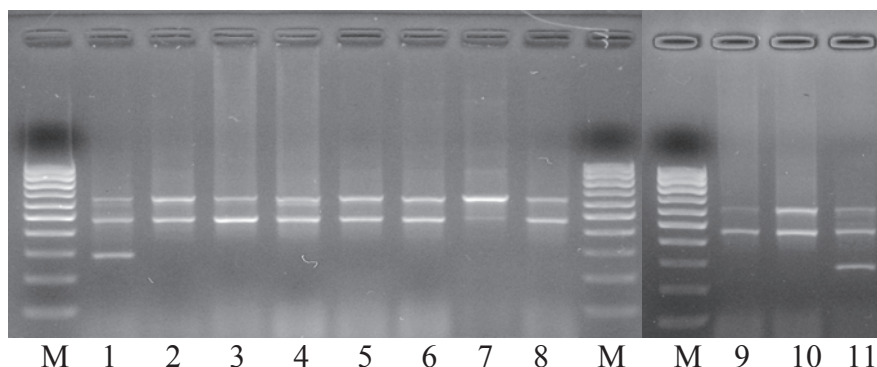


Рис. 2. Результаты электрофоретического анализа продуктов амплификации ДНК-маркера VFC1 – ген устойчивости яблони парше *Vf*

М – маркер молекулярной массы ДНК («шаг» маркера 100 п. н.)

1 – 11 сорта яблони: 1 – Фаворит, 2 – Киммерия, 3 – Чемпион, 4 – Балаклавское, 5 – Белоснежка, 6 – Салгирское, 7 – Ласпи, 8 – Румянка крымская, 9 – Джестер, 10 – Крымское зимнее, 11 – Макфри

Для сортов Амулет и Фаворит данные о наличии гена *Vf* согласуются с многолетними данными о высокой степени их устойчивости к парше, а также с их происхождением: сорт Амулет был получен в родительской паре Рубин x Присцилла. Сорт Присцилла несет доминантный аллель искомого гена. Сорт Фаворит был получен из гибридной комбинации Трайидент/Редфри, где сорт Редфри также несет доминантный аллель гена *Vf*. Таким образом, ДНК-маркерный анализ подтвердил наличие доминантного аллеля гена *Vf* у данных сортов.

При выполнении фрагментного анализа на автоматическом генетическом ABI prism 3130 по SSR маркеру гена *Vm* – Hi07h02 у изученных сортов были выявлены аллели со следующим размером фрагментов: 245, 247, 249, 255, 258, 262 и 266. Аллель SSR-маркера Hi07h02 с размером 227 пар нуклеотидов, который специфичен для доминантного аллеля гена *Vm*, не был выявлен ни у одного сорта.

**Выводы.** В результате исследований было выявлено наличие доминантного аллеля гена устойчивости яблони к парше у сортов Амулет и Фаворит. Это согласуется с происхождением сортов, а также с многолетними данными об их устойчивости к данному патогену. При изучении аллельного полиморфизма SSR-локуса Hi07h02, аллеля размером 227 п. н., косегрегирующего с доминантным аллелем, данного гена не было выявлено ни у одного из изученных сортов. Молекулярно-генетический анализ с использованием ДНК-маркеров генов устойчивости яблони к мучнистой росе *PI1* и *PI2* не выявил наличия доминантных аллелей данных генов ни у одного из изученных сортов. При этом у яблони

Фаворит был идентифицирован фрагмент размером 1500 п. н., что свидетельствует о наличии сайтов отжига для праймеров, фланкирующих маркерный участок гена *Pl2* и может свидетельствовать о наличии нового аллеля данного гена. Для подтверждения данной гипотезы необходима оценка гибридного потомства данного сорта на устойчивость к мучнистой росе на инфекционном фоне с одновременным анализом наследования амплифицированного фрагмента размером 1500 п. н. у гибридов.

Отсутствие генов устойчивости к парше и мучнистой росе у аборигенных сортов яблони Крыма, для ряда которых известна высокая степень устойчивости к данным патогенам, может свидетельствовать как о наличии других известных генов устойчивости, так и о наличии новых генетических детерминант устойчивости (гены, локусы количественных признаков - QTL). В пользу этого свидетельствует тот факт, что основная часть генов устойчивости яблони к парше и мучнистой росе идентифицирована у дикорастущих видов или сортов, представляющих европейский генофонд. В связи с этим перспективным представляется выполнение углубленного изучения в данном направлении.

Данное исследование может включать следующие этапы:

- идентификация известных на сегодняшний день генов устойчивости к парше и мучнистой росе, наиболее распространенных в мировом генофонде яблони;
- выполнение фитопатологической оценки сортов на устойчивость к целевым патогенам;
- при подтверждении высокой степени устойчивости аборигенных сортов Крымского полуострова и при отсутствии известных генов устойчивости у них (этап 1) возможно выполнение исследования по картированию новых генов/QTLов, определяющих устойчивость к парше и мучнистой росе.

#### Литература

1. Gessler, C. *Venturia inaequalis* resistance in apple / C. Gessler, A. Patocchi, S. Sansavini et al. // Crit Rev. Plant Sci. – 2006. – № 25. – P. 473-503.
2. Jha, G. K. Thakur, and P. Thakur The *Venturia* apple pathosystem: Pathogenicity Mechanisms and Plant Defense Responses / G. Jha, K. Thakur, and P. Thakur // Journal of Biomedicine and Biotechnology. – 2009. – doi:10.1155/2009/680160.
3. Урбанович, О.Ю. Распространение генов устойчивости к мучнистой росе в коллекции сортов и видов яблони, выращиваемых в Беларуси / О.Ю. Урбанович, З.А. Козловская, Н.А. Карпель // Молекулярная и прикладная генетика. – 2010. – № 11. – С. 20-25.
4. Afunian, M.R., Goodwin P.H., Hunter D.M. Linkage *Vfa4* in *Malus x domestica* and *Malus floribunda* with *Vf* resistance to the apple scab pathogen *Venturia inaequalis* / M.R. Afunian, P.H. Goodwin, D. M Hunter // Plant Pathology. – 2004. – № 53. – P. 461-467.
5. Patocchi, A., Walser M., Tartarini S., Broggin G.A.L., et al. Identification by genome scanning approach (GSA) of a microsatellite tightly associated with the apple scab resistance gene *Vm* / A. Patocchi, M. Walser, S. Tartarini, et al. // Genome № 48. – 2005. – P. 630-636.
6. Dunemann, F. Mapping of the apple powdery mildew resistance gene *Pll* and its genetic association with an NBS-LRR candidate resistance gene / F. Dunemann, A. Peil, A. Urbanietz et al. // Plant Breeding. – 2007. – Vol. 126. – P. 476-481.
7. Markussen, T. Identification of PCR-based markers linked to the powdery-mildew-resistance gene *Pll* from *Malus robusta* in cultivated apple / T. Markussen, J. Kruger, H. Schmidt et al. // Plant Breeding. – 1995. – Vol. 114. – P. 530-534.
8. Gardiner, S. Candidate resistance genes from an EST database prove a rich source of markers for major genes conferring resistance to important apple pests and diseases / S. Gardiner, J. Murdoch, S. Meech et al. // Acta Hort. – 2003. – Vol. 622. – P. 141-151.
9. Rogers, S. O. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues / S. O. Rogers, A. J. Bendich // Plant Molecular Biology. – 1985. – №5. – P. 69-76.