

УДК 577.21:631.527:634.11

ВИЯВЛЕННЯ АЛЕЛЬНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНА Vf СТІЙКОСТІ ДО ПАРШІ У СОРТІВ ЯБЛУНІ (*MALUS DOMESTICA* BORKH.) З ВИКОРИСТАННЯМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ

Д.О. КИСЕЛЬОВ, Н.В. ТРЯПІЦИНА

Інститут садівництва НААН України
Україна, 03027, Київ-27, вул. Садова, 6
e-mail: kiselevda@ukr.net

Наведено основні результати досліджень з використання молекулярно-генетичних маркерів для оцінки генотипів яблуні за геном стійкості до парші Vf. Проаналізовано алейні варіанти вказаного гена в сорока семи сортів та гібридних форм вітчизняної та зарубіжної селекції.

*Ключові слова: яблуня (*Malus domestica* Borkh.), стійкість до парші, молекулярно-генетичні маркери.*

Вступ. Створення сортів яблуні, імунних та високостійких до найрозповсюдженіших хвороб і шкідників, посідає провідне місце в селекційно-генетичній роботі. Адже введення таких сортів у виробництво відкриває нові можливості щодо раціонального вирішення проблеми інтегрованого захисту рослин на безпестицидній основі, що в кінцевому результаті дозволить отримувати екологічно чисту продукцію та знизити забруднення навколишнього середовища.

Одним із захворювань, яке дуже негативно впливає на продуктивність яблуні, є парша, яка спричиняється грибом *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. Резистентність досліджуваної культури до нього може бути як моно-, так і полігенною ознакою [2]. Вивчення стійкості до парші гібридних сіянців, отриманих від сібсів схрещування двох форм з гібридної родини *M. floribunda* 821 × Ром Бьюті, показало, що розщеплення за ознакою стійкості до парші відбувається у пропорції 1:1. Подальше дослідження нащадків від двох імунних доборів (26829-2-2, 26830-2) з цієї родини від клону *M. floribunda* 821 продемонструвало, що стійкість у них контролюється моногенно та визначається геном Vf, який знаходиться в гетерозиготному стані [3].

На сьогодні гени стійкості до парші виявлено в багатьох видів яблуні. Крім гена Vf у *Malus floribunda* 821, ідентифіковано гени Vb в *Malus baccata* Dolgo, Vbj у *Malus baccata* jackii Dg R 27 T 1, Vm у *Malus micromalus* 245 – 38 та Vr у *Russian seedling* R 12740 – 7A [2, 3].

Методика добору батьківських форм та виявлення бажаних генотипів значно спрощується при наявності в рослині ознаки стійкості за домінантним алелем основного гена. У кожному беккросному схрещуванні таких донорів із спри-

йнятливими сортами за допомогою штучного інфікування в молодому віці (3–4 роки) можна вибрати до 50% стійких сіянців.

Матеріали та методи

Як вихідний матеріал використовували пагони 47 помологічно перевірених сортів яблуні, відібраних у колекційному саду селекційно-технологічного відділу Інституту садівництва НААН України.

ДНК виділяли з молодих свіжих листків із використанням гексадецилтриметил амоніум броміду (ЦТАБ) [1, 6].

При проведенні ПЛР застосували пару праймерів AL-07 [5], що дозволяє виявити кодомінантний тип успадкування гена *Vf*. Ампліфікацію проводили в реакційній суміші (15 мкл), що складалася з 10 mM трис-HCl, 50 mM хлориду калію (KCl), 1,5 mM хлориду магнію ($MgCl_2$), 2 mM кожного з чотирьох дезоксинуклеотидтрифосфатів (dNTP), 0,2 мкМ кожного праймера, 1 од. акт. Taq ДНК полімерази та 100–120 нг геномної ДНК. Умови ПЛР включали перший цикл 94 °C – 2,30 хв, 60 °C – 1 хв, 72 °C – 2 хв і 35 послідовних циклів: 94 °C – 30 сек, 60 °C – 1 хв, 72 °C – 2 хв. Кінцева елонгація 72 °C – 10 хв.

Продукти ампліфікації геномної ДНК досліджуваних сортів яблуні аналізували за допомогою електрофорезу в агарозному 2,0 %-му гелі з додаванням 0,5 мкг/мл бромистого етидію в Трис-ацетатному буфері при напрузі електричного поля 5 В/см протягом 1 години. Опрацьовували результати електрофорезу за допомогою пакета програмного забезпечення TotalLab v2.01.

Результати та обговорення

В роботі проаналізовано 47 сортів яблуні вітчизняної та зарубіжної селекції, в тому числі контрастних за ознакою стійкості до парші. Використання вищезгада-

ної пари праймерів дає можливість ідентифікувати 3 алельних стани гена *Vf* [4, 5, 7, 8], який локалізовано в першій хромосомі. Зокрема, гетерозиготний стан гена визначається за наявності в спектрах ампліфікації 3-х фрагментів з молекулярною масою 725, 700 і 525 пн. Якщо сорт за вказаним геном є рецесивною або домінантною гомозиготою, ампліфікується по одному фрагменту з молекулярною масою 725 та 525 пн відповідно.

Як видно з електрофореграми (рис. 1), зразки 1 та 8 (сорт Едера та Фіалка) є гетерозиготними за геном *Vf*, зразок 3 (сорт Інтерпрайз) – домінантною гомозиготою, всі інші – рецесивними гомозиготами.

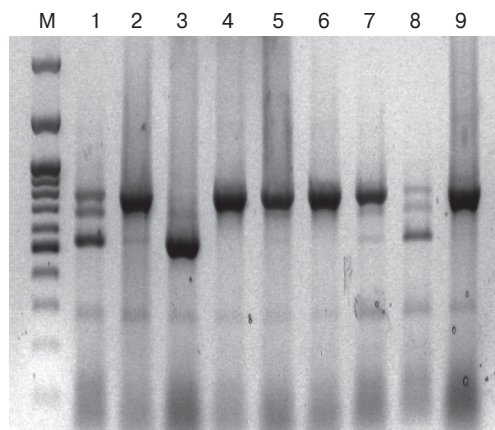


Рис. 1. Спектр ампліфікації геномної ДНК сортів яблуні з парою праймерів AL-07: М – маркер молекулярних мас Сібензім 100bp + 1.5kb+3.0 kb; 1 – Едера; 2 – Пінк Лейді; 3 – Інтерпрайз; 4 – Катерина; 5 – Ред Чіф; 6 – Фуджі; 7 – Джоноалд де Коста; 8 – Фіалка; 9 – Рубінове Дуки

Для перевірки відтворюваності результатів полімеразну ланцюгову реакцію проводили тричі. Це дозволило, наприклад, уточнити генотип сорту Джоноалд де Коста, в якого в першому ампліфікаційному спектрі було виявлено мінорні продукти, характерні для гетерозиготи (зразок 7 на рис. 1). На рис. 2 наведено електрофореграму повторів ампліфікації (зразок 10),

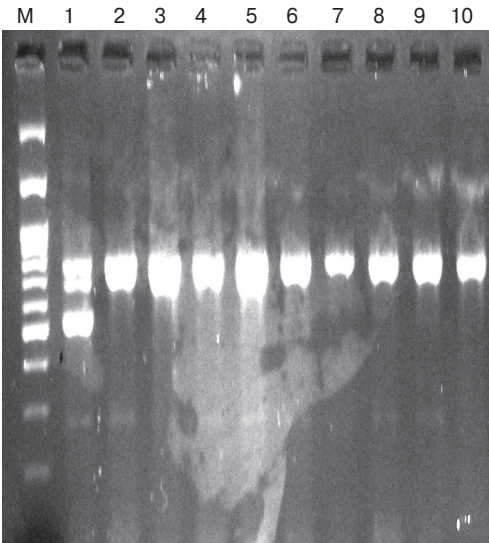


Рис. 2. Спектр ампліфікації геномної ДНК сортів яблуні з парою праймерів AL-07: М – маркер молекулярних мас Сібензім 100 bp + 1.5 kb + 3.0 kb; 1 – Скіфське золото; 2 – Аскольда; 3 – Мавка; 4 – Теремок; 5 – Гала; 6 – Рум’яний Альпініст; 7 – Джонка; 8 – Рубін; 9 – Вертикаль; 10 – Джонаголд де Коста; 11 – Рубін Стар; 12 – Джонагоред; 13 – Ерліквін; 14 – Кінгджонаголд

які підтвердили що Джонаголд де Коста є рецесивною гетерозиготою за геном стійкості до парші Vf. Поява мінорних продуктів

у першому електрофоретичному спектрі може бути наслідком контамінації.

У табл. 1 наведено порівняльні дані між результатами молекулярно-генетичного скринінгу сортів яблуні на визначення генотипу за геном Vf та рівнем стійкості сортів до парші, взяті з їх офіційних описів.

В результаті скринінгу виявлено 38 сортів та гібридних форм, рецесивних за геном Vf, 8 гетерозиготних, серед яких 3 – зарубіжної селекції, а саме: Арбат, Флоріна, Грінслівз і 5 – селекції Інституту садівництва НААН України – 9-52, 22-46, 16-15-112, Фіалка та Скіфське золото. Домінантною гомозиготою виявився лише один сорт – Інтерпрайз, також зарубіжний.

Результати молекулярно-генетичного скринінгу повністю відповідають даним багаторічних спостережень співробітників Інституту садівництва НААН України та його дослідних станцій. Було уточнено аallelний стан сорту Інтерпрайз та гібридних форм вітчизняної селекції, через відсутність даних про аallelний стан цих форм за геном Vf.

Молекулярні методи детекції генів стійкості можуть бути використані при розроб-

Таблиця 1. Визначення рівня стійкості сортів яблуні до парші за даними їх офіційних описів та результатами молекулярно-генетичного аналізу

№	Назва сорту	Країна-оригіатор	Рівень стійкості до парші	Генотип за геном Vf
1	Арбат (КВ-43)	Росія	імунний	VfVf
2	Вертикаль	Україна	середній	vfVf
3	16-100-182 (Руслан)	Україна	вищий за середній	vfVf
4	Фламенко	Велика Британія	середній	vfVf
5	Трайдент	Велика Британія	середній	vfVf
6	Болеро	Велика Британія	середній	vfVf
7	Фієста	Велика Британія	сприйнятливий	vfVf
8	Голден Делішес	США	середній	vfVf
9	Ямба	Німеччина	вищий за середній	vfVf
10	Рубінове Дуки	Україна	сприйнятливий	vfVf
11	Антей	Білорусь	середній	vfVf
12	16-101-176 (Едем)	Україна	середній	vfVf
13	Танцівниця	Україна	середній	vfVf
14	16-100-142	Україна	середній	vfVf

№	Назва сорту	Країна-оригіатор	Рівень стійкості до парші	Генотип за геном vf
15	Айдаред	Америка	середній	vfvf
16	Макінтош Важек	Канада	сприйнятливий	vfvf
17	16-100-155	Україна	середній	vfvf
18	Грінслівз	Велика Британія	імунний	Vfvf
19	Флоріна	Франція	імунний	Vfvf
20	9-52	Україна	імунний	Vfvf
21	22-46	Україна	імунний	Vfvf
22	Спарта	Україна	вищий за середній	vfvf
23	Гренні Сміт	Австралія	середній	vfvf
24	16-15-112	Україна	імунний	Vfvf
25	16-15-113	Україна	середній	vfvf
26	16-15-122	Україна	середній	vfvf
27	Ася	Україна	середній	vfvf
28	Едера	Україна	імунний	Vfvf
29	Пінк Лейді	Австралія	сприйнятливий	vfvf
30	Інтерпрайз	США	імунний	VfVf
31	Катерина	Україна	середній	vfvf
32	Ред Чіф	США	середній	vfvf
33	Фуджі	Японія	сприйнятливий	vfvf
34	Джонаголд де Коста	Бельгія	середній	vfvf
35	Фіалка	Україна	імунний	Vfvf
36	Скіфське золото	Україна	імунний	Vfvf
37	Аскольда	Україна	вищий за середній	vfvf
38	Мавка	Україна	вищий за середній	vfvf
39	Теремок	Україна	середній	vfvf
40	Гала	Нова Зеландія	сприйнятливий	vfvf
41	Рум'яний Альпініст	Молдавія та Україна	середній	vfvf
42	Джоніка	Німеччина та Голландія	середній	vfvf
43	Рубін	Чехія	вищий за середній	vfvf
44	Рубін Стар	Німеччина	вищий за середній	vfvf
45	Джонагоред	Бельгія	вищий за середній	vfvf
46	Ерліквін	Німеччина	вищий за середній	vfvf
47	Кінг Джонаголд	Бельгія	вищий за середній	vfvf

ці та впровадженні селекційно-генетичних програм. Їхнє використання може значно скоротити час, необхідний для оцінки генотипу та збільшити достовірність добору сіянців за конкретними генами. Отримані результати будуть враховані при розробці селекційно-генетичної програми Інституту садівництва НААН України, а також при мо-

лекулярно-генетичній паспортизації сортів яблуні.

Висновки

Використана пара сайт-специфічних праймерів AL-07 дозволила отримати 3 молекулярно-генетичні маркери, які характеризуються ко-домінантним типом успадкування і дозволяють ідентифікувати

в яблуні різні алельні варіанти гена *Vf*. Виявлено сорти та гібридні форми яблуні, які є носіями бажаного генотипу за геном стійкості до парші. Досліджений нами метод дозволив уточнити рівень стійкості до парші за геном *Vf* декількох сортів, які були за описом віднесені до інших категорій. Можна рекомендувати використовувати сорт Інтерпрайз як універсальний донор гена *Vf*.

Перелік літератури

1. *Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях / Научно-методическое руководство / Под. ред. Сиволапа Ю.М. – Киев: Аграрна наука. – 1998. – 156 с.*
2. *Программа и методика селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур / Под общ. ред. акад. РАСХН Седова Е.Н. – Орел: Изд-во ВНИИСПК. – 1995. – 502 с.*
3. *Crosby J. A., Janick J., Pecknold P. C. et al. Breeding apples for scab resistance: 1945–1990 / Pecknold Fruit Varieties Journal. – 1992. – Vol. 46, № 3. – P. 145–166.*
4. *Tartarini S., Gennari F., Pratesi D. et al. Characterization and genetic mapping of a major scab resistance gene from the old Italian apple cultivar 'Durello di Forlì' / Acta Horticulturae. – 2004. – Vol. 663. – P. 129–133.*
5. *Tartarini S., Gianfranceschi L., Sansavini S. et al. Development of reliable PCR markers for the selection of the *Vf* gene conferring scab resistance in apple / Plant Breeding. -1999. – Vol. 118. – P. 183–186.*
6. *Edwards K., Jonstone C., Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis // Nucl. Acids Res. – 1991. – Vol. 19, № 6. – P. 1349.*
7. *Durel C. E., van de Weg. W. E., Venisse J. S. et al. Localization of major gene for apple scab resistance on the European genetic map of the Prima × Fiesta cross // OILB/WPRS Bull. – 2000. – Vol. 23. – P. 245–248.*
8. *Urbanovich O., Kazlovskaya Z. Identification of scab resistance genes in apple trees by molecular markers // Scientific works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture. – 2008. – Vol. 27, № 2. – P.347–357.*

Представлено О.М. Тищенко
Надійшла 7.09.2010

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ К ПАРШЕ *Vf* У СОРТОВ ЯБЛОНИ (*MALUS DOMESTICA* BORKH.) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

Д.А. Киселёв, Н.В. Тряпицина

Институт садоводства НААН Украины
Украина, 03027, Киев-27, ул. Садовая, 5
e-mail: kiselevda@ukr.net

Приведены основные результаты исследований по использованию молекулярно-генетических маркеров для оценки генотипов яблони по гену устойчивости к парше *Vf*. Проанализирован аллельный состав по гену устойчивости к парше *Vf* у сорока семи сортов и гибридных форм отечественной и зарубежной селекции.

Ключевые слова: яблоня (*Malus domestica* Borkh.), устойчивость к парше, молекулярно-генетические маркеры.

IDENTIFICATION OF THE *Vf* GENE SCAB RESISTANCE ALLELIC VARIANTS AT APPLE (*MALUS DOMESTICA* BORKH.) CULTIVARS USING MOLECULAR MARKERS

D.O. Kiselev, N.V. Tryapitsyna

Institute of Horticulture National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine
Ukraine, 03027, Kyiv-27, Sadova str., 6
e-mail: kiselevda@ukr.net

Main results of apple genotype assessing for scab resistance gene *Vf* using molecular-genetic markers have been presented. Allelic variants of the *Vf* gene in forty-seven cultivars and hybrid forms of the Ukrainian and foreign breeding were analyzed.

Key words: apple (*Malus domestica* Borkh.), scab resistance, molecular markers.