

SSR GENOTYPING OF KAZAKHSTANI APPLE VARIETIES: IDENTIFICATION OF ALLELES ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO HIGHLY DESTRUCTIVE PATHOGENS

Omasheva M.Y., Pozharskiy A.S., Maulenbay A.D., Ryabushkina N.A., Galiakparov N.N.

*Institute of Plant Biology and Biotechnology
45, Timiryazev str., 050040, Almaty, Kazakhstan
natrya7@yahoo.com*

ABSTRACT

The Kazakhstan territory belongs to the Middle Asian centre of origin and diversity of apple species. Despite having favourable agro climatic conditions, Kazakhstan represents only 20% of the internal apple market. Modern international requirements for selection and zoning include both phenotypic and genetic characterisation of varieties, which depends on genetic analysis resources. In the present study, molecular-genetic passports for 31 Kazakhstani apple varieties were made for the first time. Samples were collected from five different gardens and analysed using 16 simple sequence repeat (SSR) markers. Established genotypic properties of the varieties (passports) verified information gathered by selectors regarding parentage of the majority of the varieties. The genotyping furthermore allowed for individual discrepancies of samples from certain varieties to be identified. Three samples of the Alexander Aport apple were, for example, genetically identified as hybrids of the Aport variety and an unknown variety. The analysed varieties were tested for the presence of alleles associated with resistance to various aggressive pathogens: apple scab, powdery mildew, and fire blight. Nine markers were used for apple scab, two for fire blight, and five for powdery mildew. The Maksat, Saltanat, and Maximus varieties, which bear the genes of resistance to scab and fire blight, were identified as the most promising varieties for further selection. The Kazakhstani varieties Rashid's Aport, Bes Zhuldyz, Voshod, Zhana Tan, and Maximus were found to harbour valuable genes for long-term storage, which also makes them an appealing choice for selection.

Keywords: *Malus domestica*, apple varieties, genotyping, SSR markers, PCR

УДК 575.22:575:86:577.29

SSR ГЕНОТИПИРОВАНИЕ СОРТОВ ЯБЛОНИ КАЗАХСТАНСКОЙ СЕЛЕКЦИИ И ВЫЯВЛЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К НАИБОЛЕЕ ОПАСНЫМ ПАТОГЕНАМ

Омашева М.Е., Пожарский А.С., Мауленбай А.Д., Рябушкина Н.А., Галиакпаров Н.Н.

*Институт биологии и биотехнологии растений
ул. Тимирязева 45, Алматы, 050040, Казахстан
natrya7@yahoo.com*

АБСТРАКТ

Территория Казахстана входит в Среднеазиатский центр происхождения и разнообразия видов яблони. Несмотря на благоприятные агроклиматические условия, республика лишь на 20% обеспечивает продукцией свой внутренний рынок. Современные международные требования к использованию генетических ресурсов в селекции, районировании включают наряду с фенотипической, генотипическую характеристику сортов. Впервые в Казахстане для 31 сорта яблонь казахстанской селекции на основе образцов, собранных в 2-3-х повторностях в 5 различных садоводческих хозяйствах, с использованием 16 SSR маркеров были созданы молекулярно-генетические паспорта. Определенные в экспериментах генотипические сортовые характеристики (паспорта) подтвердили информацию селекционеров по родословной большинства сортов. Наряду с этим генотипирование позволило выявить отдельные несоответствия образцов заявляемым названиям сортов. Так, три образца «Апорта Александра» были генотипически идентифицированы как гибриды Апорта с неизвестным сортом. Генотипированные сорта были тестированы на наличие аллелей, ассоциированных с устойчивостью к злостным патогенам культуры: парше, мучнистой росе и бактериальному ожогу. Были использованы 9 маркеров устойчивости к парше, 2 маркера – к бактериальному ожогу и 5 маркеров – к мучнистой росе.

Наиболее перспективными для дальнейшего использования в селекции представляются сорта Максат, Салтанат и Максимус, обладающие генами устойчивости к парше и бактериальному ожогу. Сорта Казахской селекции Апорт Рашида, Бес Жулдыз, Восход, Жана тан, Максимус имеют значимые аллели, определяющие лежкость.

Ключевые слова: *Malus domestica*, сорта яблони, генотипирование, SSR маркеры, ПЦР.

ВВЕДЕНИЕ

Яблоня домашняя (*Malus domestica*, сем. *Rosaceae*) включена FAO в список культур, составляющих основу производственной безопасности. Общее мировое производство яблок на 2012 г. составило более 76 млн. метрических т. В настоящее время насчитывается около 7,5 тыс. сортов яблони, при этом мировое производство в основном базируется всего на 15-20 сортах [1]. В мировой селекции основное внимание уделяется созданию высококачественных, высокотехнологичных сортов, устойчивых к патогенам, вредителям и абиотическим стрессовым факторам среды [2]. Разнообразие сортимента служит генетическим базисом для выведения новых высокопродуктивных сортов с повышенной зимостойкостью, устойчивых к болезням и вредителям, скороплодных, регулярно плодоносящих с плодами привлекательного внешнего вида. Признаки устойчивости к вредителям и/или способность «справляться» с неблагоприятными климатическими изменениями могут быть выявлены и в диких сородичах и реинтродуцированы в культурные сорта [3].

На первом месте среди факторов, снижающих урожайность и качество плодовых культур, стоят болезни и вредители. Особо опасными для культуры яблони являются парша (*Venturia inaequalis*), бактериальный ожог (*Erwinia amylovora*) и мучнистая роса (*Podosphaera leucotricha*). Парша яблони – одно из наиболее распространенных грибковых заболеваний плодовых по всему миру. Заражение проявляется на молодых листьях и побегах в виде светлых пятен, затем на пятнах появляется бархатистый оливково-бурый налёт, пятна сливаются, становятся чёрными. Сильно поражённые листья засыхают и опадают. Поражаются также завязи, цветоножки, тёмные пятна образуются на плодах. Плоды приобретают уродливую форму, урожайность значительно снижается. Исследователями был сделан вывод о зарождении заболевания в Центральной Азии в районах произрастания *M. sieversii* с дальнейшим распространением одомашненной яблони по всему миру. Метод борьбы с паршой яблони – обработка фунгицидами лимитирована ограничением на их использование (не больше 10-15 раз в сезон) вследствие высокого токсического воздействия на получаемый продукт и окружающую среду. Целесообразность разработки устойчивых сортов определяется необходимостью снижения использования пестицидов. В настоящее время выявление и использование генетической устойчивости генотипов яблони к патогену является одним из приоритетных подходов к контролю над заболеванием. Получение сортов с пролонгированной устойчивостью с помощью традиционной селекции – процесс длительный, поэтому необходимо вовлечение современных технологий: маркер-опосредованной селекции, цисгенезиса и др. Выявлено, что устойчивость яблони к парше основана на высокоспецифичном процессе распознавания продуктом *R*-гена растения продукта гена авирулентности (*Avr*) патогена [4]. В геноме яблони картировано около 20 *R*-генов устойчивости к *Venturia inaequalis* и для большинства из них продемонстрированы характерные взаимоотношения. Основные *R*-гены разделены на классы и проявляются фенотипически как гиперчувствительный ответ (HR), звездчатый некроз (SN), хлороз с ограниченной споруляцией (Chl). Идентификация генов устойчивости, успешно применяемая в селекционных программах яблони, это выявление наличия доминантного гена, например, *Vf*, найденного в дикой яблоне *Malus floribunda* 821. В яблоне идентифицированы 6 основных генов устойчивости: *Vf*, *Vr*, *Vb*, *Va*, *Vm* и *Vbj*, происходящих от диких видов рода *Malus*. Мутации гена *Avr* патогена, не распознаваемые *R*-генами, определяют появление новой расы патогена. Для яблони известны 8 наиболее распространенных рас *Venturia inaequalis*, за последнее десятилетие было открыто несколько новых рас *Venturia inaequalis*, способных преодолеть устойчивость, опосредованную геном *Vf* [5]. В связи с появлением новых рас патогена перспективным методом представляется пирамидирование нескольких генов устойчивости в одном генотипе. Данный подход может быть реализован благодаря использованию молекулярных маркеров на несколько генов, определяющих устойчивость. К перечисленным генам были созданы сцепленные с ними молекулярные маркеры, такие как SCAR, SSR, RAPD [4].

Бактериальный ожог – опасное инфекционное заболевание, преимущественно поражающее яблоню (*Malus domestica*) и грушу (*Pyrus communis*). Общая картина поражения включает усыхание и скручивание листьев, плодоножек, некротические мокнувшие язвы на коре, выделение экссудата на больных побегах, увядание и гибель соцветий, при этом усохшие цветы и листья не опадают. Ввиду отсутствия эффективного метода контроля заболевания бактериальный ожог приносит значительный экономический урон по всему миру. Внедрение устойчивых генотипов осложнено полигенной природой резистентности и сложной системой иммунного ответа. На сегодняшний день идентифицировано 27 перспективных количественных признаков (QTL), сцепленных с резистентностью к различным штаммам *Erwinia amylovora*. При этом показано, что три из них в группах сцепления LG3, LG12, LG7 имеют

стабильный эффект и могут быть использованы в маркер-опосредованной селекции [6]. QTL, сцепленный с основным геном в группе сцепления LG3, найден в резистентном *Malus robusta* 5, при этом фенотипическая вариабельность объясняет 80% устойчивости [7]. Два QTL (LG12, LG7) с фенотипической вариабельностью от 37 до 57% найдены в культурных сортах Эверест и Фиеста. Вышеописанные маркеры были идентифицированы при использовании трех различных штаммов *Erwinia amylovora* [6].

В зависимости от климата в регионе культивирования яблони экономический ущерб, причиняемый мучнистой росой, может быть сравним с таковым парши. Грибок может поражать ветки, листья, цветки и плоды. Большинство сортов яблони в определенной мере подвержены заражению мучнистой росой. В регионах, благоприятных для развития болезни, обработку фунгицидами проводят до 15 раз в год. Таким образом, работы по внедрению продолжительной устойчивости к мучнистой росе в сорта яблони являются приоритетными в селекционных программах. В азиатских видах *Malus spp.* с маленькими плодами было выявлено несколько основных генов устойчивости к мучнистой росе. Селекционеры сконцентрировали свое внимание на внедрение генов устойчивости *Pl-1* из *Malus robusta* и *Pl-2* из *M. zumi* в стандартные селекционные линии. Другими источниками устойчивости являются *Pl-w* из сорта White Angel, *Pl-d* из D-12 и *Pl-m* из MIS. Гены *Pl-m* и *Pl-2* картированы в группе сцепления LG11, *Pl-d* – LG12, а *Pl-w* к LG8 [8]. Для всех перспективных генов устойчивости разработаны сцепленные с ними маркеры (SCAR, SSR). Так, в селекционной практике применяются маркеры к генам: *Pl-1*, *Pl-2*, *Pl-w*, *Pl-d* [9].

Одним из важных качеств яблок является «лежкость», то есть способность плода сохраняться длительное время, не теряя при этом коммерчески значимых качеств. «Лежкость» плода напрямую зависит от содержания этилена, при этом чем его меньше, тем дольше может храниться плод. Биосинтетический путь этилена контролируется двумя большими группами генов: 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат синтаза (ACS) и 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат оксидаза (ACO). Для характеристики сортов яблони на способность длительного хранения повсеместно используются два маркера Md-ACS1 и Md-ACO1 [10]. В последнее время также коммерчески привлекательным свойством стали цвет мякоти и кожицы плода; все более привлекательны сорта яблонь, обладающие необычной розово-красной мякотью. К сожалению, большинство известных сортов с красной мякотью имеют неприятный терпкий вкус. Происходят такие сорта от яблони Недзвецкого (*Malus sieversii f. niedzwekyana*), известной своей антоциановой окраской не только плодов, но и древесины, соцветий. Генетически объясняют существование 2-х типов яблок с красной мякотью: первый тип, при котором яблоня имеет красную не только мякоть плода, но и остальные части растения; второй тип, когда красной является только мякоть. Красная мякоть обусловлена повышенным синтезом цианидин-3-галактозида (антоцианин), чей синтез регулируется MYB транскрипционными факторами: MdMYB10 или MdMYB110a. Повышенная экспрессия промотора MdMYB110a отвечает за второй тип красной мякоти, более привлекательный для селекции, но значительно реже встречающийся среди сортов мировой коллекции [11].

Южные и юго-восточные регионы Казахстана имеют наиболее благоприятные климатические условия для выращивания плодовых культур. К 1970 г. общая площадь садов превышала 107 тыс. га, однако в кризисные 90-е годы площади сократились более чем втрое [12]. По данным FAO [13] на 2013 г. площади, занятые под культурой яблони в Казахстане, занимающем лишь 50-е место среди стран экспортеров яблок, составляли около 30 тыс. га с урожаем примерно 150 тыс. т./га. Внутренний рынок обеспечен продукцией лишь на 20%; на душу населения приходится лишь 9 кг/год. Начиная с 2007 г. правительство Казахстана выделяет субсидии, направленные на расширение площадей под культуры, совершенствование технологий выращивания, на восстановление культуры Апорта, увеличение производства и обеспечение населения плодовой продукцией. Согласно Мастер-плану «Плодоовощеводство» [14], планируется довести производство плодовой продукции к 2020 году до 800,0 тыс. тонн. В настоящее время на основании сортоизучения, обследования насаждений в хозяйствах республики, рекомендован довольно обширный сортимент плодовых, в Государственный реестр к использованию в Казахстане включено 66 сортов яблони [15, 16].

Гермоплазма, популяции, сорта, используемые в селекционном процессе, должны иметь целый ряд ожидаемых характеристик, включая аллельное разнообразие, гетерозиготность и индивидуальные генотипические особенности. Использование исходного материала с неподтвержденной генетической идентичностью чрезвычайно проблематично с точки зрения получения ожидаемых результатов. В данной работе для сортов яблони казахстанской селекции представлены результаты молекулярно-генетической паспортизации с помощью 16 микросателлитных маркеров. Для характеристики 31 сорта на признаки интереса использованы: 9 маркеров устойчивости к парше, 2 маркера, сцепленные с устойчивостью к бактериальному ожогу, 5 маркеров резистентности к мучнистой росе, а также 2 маркера на «лежкость» плодов и 1 маркер окраски мякоти плодов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для последующего молекулярно-генетического анализа листья 31 сорта яблони отечественной селекции были собраны в частных хозяйствах, а также взяты из коллекции КазНИИ плодководства и

виноградарства (КазНИИПиВ). Все сорта районированы в Казахстане. Большинство собранных образцов имели более 2-х повторностей и более 2-х мест сбора, некоторые, например, листья сорта «Восход» были собраны в четырех крестьянских хозяйствах. Только некоторые сорта были представлены в одной повторности ввиду редкой встречаемости. В качестве референсных были взяты 8 представителей яблони (Delicious, Fiesta, M9, Michelin, *Malus floribunda* 821, *Malus robusta* 5, Prima, Worcester Pearmain) в Институте селекционных исследований плодовых (Breeding Research on Fruit Crops, Julius Kühn-Institut, Дрезден, Германия). Краткая характеристика исходного материала приведена в [таблице 1](#).

ВСТАВИТЬ ТАБЛИЦУ 1

Выделение геномной ДНК и SSR генотипирование

Геномную ДНК из замороженных листьев яблони выделяли по методу, описанному ранее [17]. Качество выделенной геномной ДНК определяли путем электрофореза в 1,2% агарозном геле в 1X TAE буфере (40 mM Трис, 20 mM уксусная кислота, 1 mM ЭДТА). Концентрацию ДНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA).

Для определения генетического разнообразия и создания паспорта сортов яблони домашней были использованы 16 микросателлитных маркеров, повсеместно используемых в исследованиях по генотипированию яблони [18, 19]. Определение молекулярно-генетического разнообразия с помощью 10 микросателлитных маркеров: CH01h10, CH01h01, CH04c07, Hi02c07, CH01f03b, CH02d08, CH02c11, CH04e05, CH01f02, CH02c09, так называемая «CH» группа, проводили в коллаборации с Институтом селекционных исследований плодовых (Breeding Research on Fruit Crops, Julius Kühn-Institut, Дрезден, Германия). Полученные данные были объединены с 6-ю маркерами, так называемой группой «GD»: GD12, GD96, GD142, GD147, GD162, GD100. Таким образом, были охвачены 14 групп сцепления, т.е. 14 хромосом из 17 возможных гаплоидного набора хромосом яблони. Для маркеров группы «GD» условия проведения ПЦР были описаны ранее [20]. Для маркеров «CH» группы проводили мультиплекс ПЦР, разделив 10 маркеров на 3 группы. Реакция амплификации была проведена с использованием набора «Type-it Microsatellite PCR Kit», следуя инструкциям производителя (QIAGEN, Германия). Капиллярный электрофорез проводили на секвенаторе «Beckman Coulter GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System» (Beckman Coulter, США). Анализ полученных аллелей проведен с использованием программного обеспечения «GenomeLab™ GeXP».

Статистическая обработка данных SSR генотипирования

Размеры продуктов ПЦР, полученные с помощью фрагментного анализа, принято называть аллелями. Образец с одной аллелью считается гомозиготным, с двумя – гетерозиготным. Размеры аллелей были конвертированы и занесены в MS Excel. Полученная таким образом база данных была обработана с помощью программы TANDEM v.1.07 [21], а именно: для каждого маркера от полученного размера был отнят фактор конверсии. Данный фактор индивидуальный для каждого маркера был получен сравнением с абсолютным размером контрольного образца, для маркеров группы «GD» им послужил сорт Голден Делишес, размеры аллелей которого были взяты из базы Genome Database for Rosaceae [22]. На основании данных генотипирования получена UPGMA-дендрограмма с использованием языка программирования R. Пакет "rorrr" был использован для расчета матрицы расстояния по коэффициенту Нея, пакет "ape" был использован для настройки внешнего вида дендрограммы [23].

Молекулярно-генетический анализ образцов на наличие маркеров устойчивости к парше, бактериальному ожогу и мучнистой росе

Для идентификации генов устойчивости к *Venturia inaequalis* (возбудитель парши яблони) в исследованных сортах использовали SCAR маркеры, описанные в ряде публикаций: VfC1/VfC2 (ген *Vfa4*) [24], OPB18 (ген *Vr*), OPL19 (гены *Vh2+Vh8*) [25], AL07 и AM19 (ген *Vf*) [26], T06, K08 и Z13 (ген *Vbj*) [27], OPB12 (ген *Vm*) [28]. Выявление устойчивых к бактериальному ожогу генотипов осуществляли с помощью двух SCAR маркеров: AE10-375 и GE-8019, повсеместно используемых в исследованиях по резистентности яблони к бактериальному ожогу [29]. Определение устойчивости к мучнистой росе (возбудитель – *Podosphaera leucotricha* (Ell. and Ev.) Salm) проводили с помощью SCAR маркеров OPU02, OPAU17/B16a, OPAU17/B16b (ген *Pl-2/Pl-m*), OPAC20 (ген *Pl-m*), OPN18 (ген *Pl-m/Pl-a*) [30]. Температурный режим и состав реакционной смеси для каждого из маркеров устанавливали согласно

методике, описанной в соответствующей литературе. Продукты ПЦР анализировали в 1,5% агарозном геле.

Генотипирование по маркерам, связанным с биосинтезом этилена в плодах и цветом мякоти плода

ПЦР проводили с использованием праймеров к маркерам Md-ACS1 и Md-ACO1 [10]. Продукты ПЦР анализировали в 2% агарозном геле. Определение R1 и R6 аллелей промотера MdMYB10, ответственного за цвет мякоти плода, было проведено в Институте селекционных исследований плодовых (Breeding Research on Fruit Crops, Julius Kühn-Institut, Дрезден, Германия), согласно ранее описанной методике [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

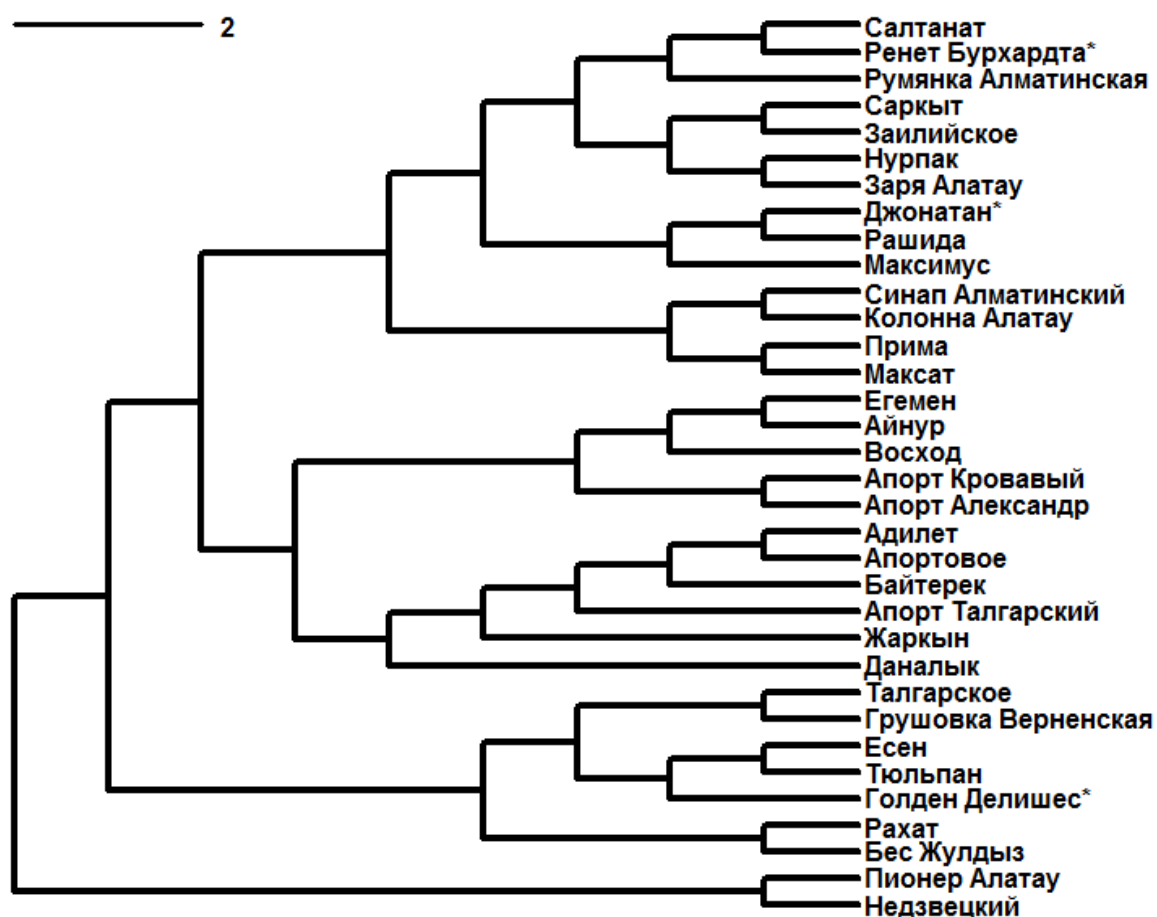
Первоочередной задачей данного исследования являлось создание молекулярно-генетических паспортов для сортов. Для казахстанских сортов подобная паспортизация проведена впервые. Использование вышеперечисленных микросателлитов групп «GD» и «CH» позволило получить для каждого из исследуемых сортов воспроизводимые специфичные полиморфные микросателлитные профили. В таблице 2 представлен пример генетического паспорта сорта Заря Алатау, в котором указаны: название, синонимы, происхождение, размеры микросателлитных повторов для 16 маркеров, а также информация о наличии аллелей, сцепленных с устойчивостью к парше, бактериальному ожогу и мучнистой росе. Также указаны аллели «лежкости» и цвета мякоти плода. Такой подход значительно облегчит не только селекционный процесс, но и позволит патентовать новые сорта. Результаты будут использованы для создания соответствующей базы данных, для подтверждения сортовой принадлежности.

Таблица 2. Генетический паспорт на примере сорта «Заря Алатау»

Table 2. Genetic passport on «Zarya Alatau» variety as an example

	Сорт	«Заря Алатау»		
	Оригинатор	КазНИИПиВ		
	Внесен в Госреестр	1974		
	Происхождение	получен из семян сорта Ренет Орлеанский от свободного опыления		
Описание сорта (агрохарактеристики) 1. Срок созревания – зимний. 2. Плоды средней величины – 120 г, ширококонические, ровные, без ребер. Основная окраска плода в фазу потребительской зрелости желтая или зеленовато-желтая, с небольшим румянцем на солнечной стороне. Мякоть плотная, сочная, мелкозернистая, нежная. 3. Вкус кисло-сладкий. Дегустационная оценка 5,0 балла. 4. Вступает в плодоношение на клоновом подвое на 4-5 год. 5. Средняя урожайность – 77,7 ц/га, максимальная – 120,3 ц/га.	Микросателлит	Размер аллеля (в п.н.)	Наличие аллелей качественных признаков	
	CH01h10	96/100	Md-ACS1	<i>Md-ACS1-1(489 п.н.)</i>
	CH01h01	117/129	Md-ACO1	<i>Md-ACO1-1(525 п.н.)</i>
	CH04c07	96/106		<i>Md-ACO1-2 (587 п.н.)</i>
	Hi02c07	114/151	MdMYB10	<i>127 п.н. / 131 п.н.</i>
	CH01f03b	136/168	Гены Vh2+Vh8 (уст-ть к парше)	<i>OPL19 (433 п.н.)</i>
	CH02d08	228/254		
	CH02c11	215/237		
	CH04e05	173/200		
	CH01f02	178/182	Ген Vbj (уст-ть к парше)	<i>K08 (743 п.н.)</i>
	CH02c09	244/254		
	GD12	146/150		
	GD96	172/172		
	GD142	134/140		
	GD147	133/147		
	GD162	218/236		
GD100	219/219			

Основываясь на том, что большинство сортов собраны в нескольких повторностях из различных локаций и имеются данные по их родословной, подтверждена сортовая принадлежность значительной части образцов (таблица 1). Наряду с этим, использование молекулярных маркеров позволило выявить генотипическую идентичность образцов, представленных хозяйствами как сорта Адилет и Апортовое; также один из образцов сорта Нурпак (Заря Алатау × Апорт) оказался генотипически идентичен образцу Заря Алатау. Три образца Апорта Александра (Апорт Алматинский) по молекулярным маркерам были идентифицированы как гибриды Апорта с неизвестным сортом, единственным соответствующим названию оказался образец из частного сада с. Тургень, который в дальнейшем и использовался для сравнительного генетического анализа и установления родословной сортов, происходящих от Апорта (рисунок 1). Апорт Кровавый и Апорт Талгарский, которые по родословной являются сорто-клонами Апорта Александра, были подтверждены как его гибриды. Единственным «правильным Апортом» оказался образец Апорт Рашида, одним родителем которого подтвержден Апорт Александр и сорт зарубежной селекции Джонатан. По информации селекционеров, сорт Тюльпан имеет происхождение от Апорта Александра, но все три повторности собранных образцов не имели с ним совпадений. Также были выявлены несоответствия сортов из различных крестьянских хозяйств, но по родословной все же удалось выявить «правильные» образцы. Для точного установления родства между сортами использовали родителей зарубежной селекции, таких как Голден Делишес, Джонатан, Ренет Бурхардта, Прима. Так, представленные на дендрограмме (рисунок 1) результаты соответствуют информации о происхождении сортов в таблице 1. Сорта, одним из родителей которых является Апорт Александра: Байтерек, Адилет, Апортовое, Айнур, Жаркын, Апорт Талгарский, Апорт Кровавый, образовали общий кластер. Сорта, расположившиеся возле родителей: Салтанат, полученный отбором семян Ренет Бурхардта, Максат, происходящий от сорта Прима, Апорт Рашида от сорта Джонатан (рисунок 1).



* сорта зарубежной селекции, являющиеся родителями казахстанским сортам. Шкала показывает два уровня вложенности ветвей дендрограммы.

Рис. 1. UPGMA дендрограмма генетического сходства сортов яблони казахстанской селекции с помощью 16 SSR маркеров

Fig. 1. Genetic similarity UPGMA dendrogram of apple varieties from Kazakhstani breeding program based on 16 SSRs

Сорта казахстанской селекции проверяли на наличие аллелей, сцепленных с генами устойчивости к парше (таблица 3). Одними из первых открытых генов устойчивости к поражению *Venturia inaequalis* является большой кластер генов *Vf*. STS-маркер *VfC* имеет три продукта амплификации, размерами 646 (*Vfa1*), 484 (*Vfa2*) и 286 (*Vfa4*) п.н. Большое количество исследований показало, что непосредственно геном *Vf*, ответственный за устойчивость к заболеванию паршой, является ген *Vfa4*, отличающийся от других наличием делеции на одном из участков [24]. Фрагменты генов *Vfa1*, *Vfa2* были выявлены у всех исследованных образцов. Наличие фрагмента гена *Vfa4* идентифицировано только у сорта Тюльпан, возможно имеющий в своей родословной иммунные сорта. Кодоминантный маркер AL07, сцепленный с геном *Vf*, имеет два продукта амплификации: 466 п.н. (*A*) и 724 п.н. (*a*), устойчивый и восприимчивый к парше аллель, соответственно. Контрольные сорта Прима и Флорина гетерозиготны (*Aa*) по данному маркеру, в свою очередь как *M.floribunda* (источник гена *Vf*) имеет лишь одну аллель – 466 п.н. Доминантный маркер AM19, также сцеплен с геном *Vf*, имеет устойчивый аллель размером 526 п.н. (контрольные сорта также Прима и Флорина). В сортах казахстанской селекции только два сорта Максат и Тюльпан имели положительный результат на наличие аллелей устойчивости для маркеров AL07 и AM19. Сорт Максат, устойчивость к парше которого подтверждается и полевыми наблюдениями, получен путем отбора семян сорта Прима зарубежной селекции. Предполагаемое на основании картирования генетическое расстояние от маркеров AL07 и AM19 до гена *Vf* составляет 0.9 сМ [26]. Маркер OPL19, изначально идентифицированный для гена *Vh2* на сегрегирующей популяции Royal Gala×TSR34T15 (*M.sieversii*), также сцеплен с геном *Vh8* от Royal Gala×W193B. Аллель устойчивости к парше размером 433 п.н. определен у 19 сортов из 31 (таблица 3). Маркер OPB18, сцепленный с геном *Vr*, имеет два фрагмента амплификации 628 п.н. и 799 п.н., при этом ранее было показано, что продукт в 799 п.н. преимущественно амплифицируется у устойчивых форм яблони Сиверса [25]. Среди исследованных образцов только два сорта: Грушовка Верненская и Тюльпан имели устойчивый аллель маркера OPB18. Три SCAR маркера T06, K08 и Z13, сконструированные при анализе скрещивания между Голден Делишес и A722-7 (AxGD), характеризуют устойчивость к парше, найденную у дикого вида *M.baccata jackii*. Ген, сцепленный с устойчивостью, получил название *Vbj* [27]. Маркеры K08 и Z13 имеют продукты амплификации 743 п.н. и 773 п.н., соответственно ответственные за устойчивость. 12 исследованных образцов имеют продукт амплификации 743 п.н. маркера K08 и 10 сортов положительны на наличие продукта 773 п.н. Ни один из сортов не имел положительного результата для маркера T06 (410 п.н.). Отсутствие устойчивого аллеля во всех образцах показано также для маркера OPB12, сцепленного с геном *Vm*, где положительным продуктом амплификации считается 687 п.н.

ВСТАВИТЬ ТАБЛИЦУ 3

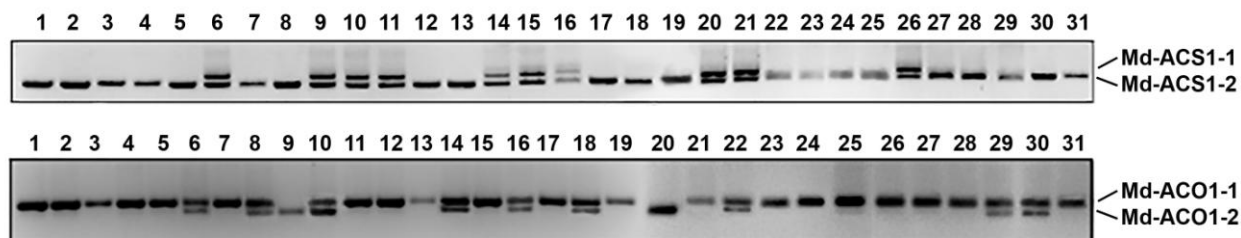
Таким образом, было продемонстрировано, что некоторые протестированные образцы несут более 2-х маркеров устойчивости к парше, к ним относятся: Апорт Талгарский, Восход, Румянка Алматинская, Максат, Салтанат, Саркыт, Тюльпан. Из них полевою устойчивостью, по характеристике селекционеров, имеют Восход, Румянка Алматинская, Максат, Салтанат, Саркыт (таблица 1). Наличие генов устойчивости у образца Апорт Талгарский может быть объяснено либо сортовым несоответствием, либо гибридным происхождением образца. Сорт Тюльпан, по данным полевых наблюдений, сильно подвержен грибковыми заболеваниями, но, тем не менее, несет в себе некоторые гены устойчивости. Одним из возможных объяснений может быть как полигенная природа устойчивости к парше, так и ошибки при маркировке дерева. Также использование молекулярных маркеров не подтвердило полевой устойчивости некоторых сортов: Даналык, Есен, Максимус. Возможно, в их случае устойчивость контролируется другими не выявленными на данный момент генами.

Одним из наиболее опасных инфекционных заболеваний яблони является бактериальный ожог. Сорта казахстанской селекции были проверены с помощью двух SCAR маркеров резистентности: AE10-375 и GE-8019, с фенотипической вариабельностью от 37 до 57% [29]. Наличие положительного результата по маркеру AE10 показали образцы сортов: Грушовка Верненская, Есен, Жаркын, Жана тан, Максат, Салтанат, Синап Алматинский, Тюльпан. В свою очередь по маркеру GE-8019 образцы сортов: Айнур, Апорт Талгарский, Румянка Алматинская, Талгарское (таблица 3). Только 2 сорта из исследованных показали положительный результат для обоих маркеров: Колонна Алатау и Максимус, по полевым наблюдениям (таблица 1), обладают средней устойчивостью к поражению бактериальным ожогом. Ввиду отсутствия точной информации по полевой устойчивости ряда сортов яблонь сложно определить корреляцию с генетическим скринингом на резистентность. Так, сорт Рахат по описанию средне устойчив, но не выявлены аллели устойчивости по двум использованным маркерам.

На основе пяти маркеров ни один тестированный сорт казахстанской селекции не показал положительный результат на наличие аллелей устойчивости к мучнистой росе. Тем не менее, по

результатам полевых наблюдений 18 из 31 сорта в разной степени устойчивы к поражению *Podosphaera leucotricha* (таблица 1). Возможно, в данном случае, устойчивость контролируется другими генами, не сцепленными с использованными пятью маркерами [30].

Характеристику 31 сорта казахстанской селекции на длительность хранения плодов проверяли с помощью двух универсальных маркеров Md-ACS1 и Md-ACO1. На рисунке 2 представлен результат электрофореза для 31 сорта яблони.



* нумерация сортов соответствует таблице 1

Рис. 2. Результаты электрофореза продуктов ПЦР маркеров Md-ACS1 и Md-ACO1, сцепленных с генами «лежкости» плода

Fig. 2. PCR electrophoresis of Md-ACS1 and Md-ACO1 markers linked to fruit storability

Известны две аллельные формы Md-ACS1: Md-ACS1-1 и Md-ACS1-2. Три аллельные комбинации ACS1-1/1, 1-1/2, 1-2/2 подтверждают высокий, средний и низкий уровень этилена соответственно. Так в исследованных образцах 20 сортов из 31 имеют генотип ACS1-1/1, характерный для высокого уровня этилена, 11 сортов с генотипом ACS1-1/2 со средним уровнем этилена (таблица 3). Вторым использованным маркером Md-ACO1 также играет роль в биосинтезе этилена, но меньшую по сравнению с Md-ACS1. Наибольший интерес представляют сорта и формы яблони, несущие аллель Md-ACO1-1, характерный для сниженного уровня синтеза этилена, особенно в сочетании с генотипом ACS1-2/2. Так, эталонным сортом с генотипом Md-ACO1-1/ ACS1-2/2 считается Фуджи, с максимальным сроком хранения 8 месяцев при температуре 0-4°C [10]. В сортах отечественной селекции сочетание аллелей, ответственных за наиболее низкий уровень синтеза этилена в плодах, не выявлено. Поэтому целесообразным является проведение селекционной работы по созданию сортов яблони, сочетающих в своем генотипе аллели Md-ACO1-1 и Md-ACS1-2 и способных сохранять свои товарные качества продолжительный период времени. Результаты проведенного анализа позволили идентифицировать носители данных аллельных форм генов, которые возможно использовать в скрещиваниях при создании сортов с длительным сроком хранения. 6 сортов казахстанской селекции обладают генотипом Md-ACO1-1/ ACS1-1/2, к ним относятся сорта: Апорт Рашида, Бес Жулдыз, Восход, Жана тан, Максимус. Необходимо привлечение данных генотипов в качестве родительских форм при скрещивании.

С помощью точного определения размера аллеля R6 повторяющегося сегмента MdMYB10 промотора, установлено, что только 2 сорта из 31 обладают первым типом красной мякоти плода: Недзвецкий и Пионер Алатау (таблица 3) с размерами аллелей 131/235 и 127/235, соответственно. Остальные сорта показали наличие аллеля R1 (размеры варьируют в районе 131 п.н., не более 150 п.н.), характерного для белой либо кремовой мякоти.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Точное установление сортовой принадлежности должно быть первостепенной задачей любого селекционного процесса. С помощью современных молекулярно-генетических подходов данная задача значительно упрощается. Представление данных о сорте в виде генетического паспорта с указанием морфологических особенностей способствует дальнейшим исследованиям, таким как маркер-опосредованная селекция. Использование молекулярных маркеров может способствовать ускорению селекционного процесса, так как отслеживание пирамидирования генов традиционными методами отбора затруднено. Определение нескольких генов резистентности требует огромного количества времени и затрат, в том числе на поддержание культуры различных рас патогена. Использование генотипов анализированных сортов казахстанской селекции позволит планировать скрещивания с использованием различных доноров генов устойчивости. К примеру, возможно включение в селекционную программу сортов Максат, Салтанат и др. Кроме того, необходимо вести работу с генотипами, имеющими полигенную структуру устойчивости, что позволит вывести селекцию на устойчивость к грибковым заболеваниям на новый уровень. Необходимо привлечение в качестве

родительских форм сортов Апорт Рашида, Бес Жулдыз, Восход, Жана тан, Максимус, как доноров аллелей, сцепленных с длительным сроком хранения плода.

Благодарность

Авторы выражают огромную благодарность Институту селекционных исследований плодовых (Breeding Research on Fruit Crops, Julius Kühn-Institut, Дрезден, Германия), в лице директора профессора Магды-Виолы Ханке за предоставленную возможность проведения молекулярно-генетических исследований и обсуждение полученных результатов. Также благодарим КазНИИПиВ, КХ «Суздалева О.В.», КХ «Фридрихгарден», ИП «Айдарбаев» и КХ «RDragon» за предоставленный для генетического анализа растительный материал.

Финансирование

Работа выполнена в рамках гранта 1105/ГФ4 в рамках подпрограммы 101 «Грантовое финансирование научных исследований», по приоритету «Науки о жизни», финансируемой Государственным учреждением «Комитет науки Министерства образования и науки Республики Казахстан».

ЛИТЕРАТУРА

1. Gross B.L., Henk A.D., Richards C.M., Fazio G., Volk G.M. Genetic diversity in *Malus ×domestica* (*Rosaceae*) through time in response to domestication // *Am. J. Bot.* – 2014. – Vol. 101, №10. – P. 1770-1779.
2. Gross B.L., Kellogg E.A., Miller A.J. Speaking Of Food: Connecting Basic And Applied Plant Science // *Am. J. Bot.* – 2014. – Vol. 101, №10. – P. 1597-1600.
3. Gross M. Plant science called up to provide food security // *Curr. Biol.* – 2014. – Vol. 24, №23. – P. 1105-1108.
4. Bus V.G. M., Rikkerink E.H.A., Caffier V., Durel C.-E., Plummer K.M. Revision of the nomenclature of the differential host-pathogen interactions of *Venturia inaequalis* and *Malus* // *Annual Review of Phytopathology.* – 2011. – Vol. 49. – P. 391-413.
5. Benaouf G., Parisi L. Genetics of host-pathogen relationships between *Venturia inaequalis* races 6 and 7 and *Malus* species // *Phytopathology.* – 2000. – Vol. 90. – P. 236-242.
6. Khan M.A., Zhao Y., Korban S.S. Molecular mechanisms of pathogenesis and resistance to the bacterial pathogen *Erwinia amylovora*, causal agent of fire blight disease in *Rosaceae* (report) // *Plant Molecular Biology Reporter.* – 2012. – Vol. 30, №2. – P. 247(14).
7. Peil A., Garsia-Libreros T., Richter K. et al. Strong evidence for a fire blight resistance gene of *Malus robusta* located on linkage group 3 // *Plant Breed.* – 2007. – Vol. 126. – P. 470-475.
8. James C.M., Clarke J.B., Evans K.M. Identification of molecular markers linked to the mildew resistance gene Pl-d in apple // *Theoretical and Applied Genetics.* – 2004. – Vol. 110. – P. 175-181.
9. Bus V.G.M., Bassett H.C.M., Bowatte D. et al. Genome mapping of an apple scab, a powdery mildew and woolly apple aphid resistance gene from open-pollinated mildew immune selection // *Tree genetics and Genomes.* – 2010. – Vol. 6. – P. 477-487.
10. Costa F., Stella S., de Weg Van W.E. et al. Role of the genes Md-ACO1 and Md-ACS1 in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh) // *Euphytica.* – 2005. – Vol. 141. – P. 181-190.
11. Würdig J., Flachowsky H., Höfer M. et al. Phenotypic and genetic analysis of the German *Malus* Germplasm Collection in terms of type 1 and type 2 red-fleshed apples // *Gene.* – 2014. – Vol. 544, №2. – P. 198-207.
12. Маденов Э.Д. Плодоводство и виноградарство // Доклады Национальной академии наук республики Казахстан. – 2011. – №3. – С. 74-87.
13. Faostat: Food and agriculture organization of the United Nations, statistic division // URL: <http://faostat3.fao.org/download/q/qc/e>.
14. Мастер-план «Плодоовощеводство». – Астана, 2013. – 27 с.
15. Нурмуратулы Т., Маденов Э.Д., Нуртазина Н.Ю., Карычева Л.А. и др. Генофонд местных и стародавних сортов яблони, груши, абрикоса и винограда на юге и юго-востоке Казахстана. – Алматы, 2012. – 120 с.
16. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию в Республике Казахстан. – Астана, 2011. – 104 с.
17. Aubakirova K., Omasheva M., Ryabushkina N. et. al. Evaluation of five protocols for DNA extraction from leaves of *Malus sieversii*, *Vitis vinifera*, and *Armeniaca vulgaris* // *Genet. Mol. Res.* – 2014. – Vol. 13, №1. – P. 1278-1287.

18. Hokanson S.C. et al. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus × domestica* Borkh. core subset collection // *Theor. Appl. Genet.* – 1998. – №94. – P. 671-683.
19. Liebhard R., Gianfranceschi L., Koller B. et al. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.) // *Molecular Breeding.* – 2002. – Vol. 10, №4. – P. 217-241.
20. Омашева М.Е., Чекалин С.В., Рябушкина Н.А., Галиакпаров Н.Н. Оценка молекулярно-генетического разнообразия популяций *Malus sieversii* Джунгарского Алатау и Тарбагатай // *Биотехнология. Теория и практика.* – 2015. – №1. – С. 26-34.
21. Matschiner M., Salzburger W. TANDEM: integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows // *Bioinformatics.* – 2009. – Vol. 25, №15. – P. 1982-1983.
22. Genome database for Rosaceae // URL: <https://www.rosaceae.org/>.
23. R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. – Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
24. Afunian M.R. et al. Linkage of *Vfa4* in *Malus x domestica* and *Malus floribunda* with *Vf* resistance to the apple scab pathogen *Venturia inaequalis* // *Plant Pathology.* – 2004. – Vol. 53. – P. 461-467.
25. Bus V.G.M., Laurens F.N.D., and van de Weg W.E. et al. The *Vh8* locus of a new gene-for-gene interaction between *Venturia inaequalis* and the wild apple *Malus sieversii* is closely linked to the *Vh2* locus in *Malus pumila* R12740-7A // *New Phytol.* – 2005. – Vol. 166, №3. – P. 1035-1049.
26. Tartarini S., Gianfranceschi L., Sansavini S., Gessler C. 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.
27. Gyax M., Gianfranceschi L., Liebhard R., Kellerhals M., Gessler C., Patocchi A. Molecular markers linked to the apple scab resistance gene *Vbj* derived from *Malus baccata jacksonii* // *Theor Appl Genet.* – 2004. – Vol. 109, №8. – P. 1702-1709.
28. Cheng F.S., Weeden N.F., Brown S.K. et al. Development of a DNA marker for *Vm*, a gene conferring resistance to apple scab // *Genome.* – 1998. – Vol. 41. – P. 208-214.
29. Khan M.A., Durel C.-E., Duffy B. et al. Development of molecular markers linked to the ‘Fiesta’ linkage group 7 major QTL for fire blight resistance and their application for marker-assisted selection // *Genome.* – 2007. – Vol. 50. – P. 568-577.
30. Gardiner S., Murdoch J., Meech S. et al. Candidate resistance genes from an EST database prove a rich source of markers for major genes conferring resistance to important apple pests and diseases // *Acta Hortic.* – 2003. – Vol. 622. – P. 141-151.

REFERENCES

1. Gross B.L., Henk A.D., Richards C.M., Fazio G., Volk G.M. Genetic diversity in *Malus × domestica* (Rosaceae) through time in response to domestication. *Am. J. Bot.*, 2014, vol. 101, no. 10, pp. 1770-1779. doi: 10.3732/ajb.1400297.
2. Gross B.L., Kellogg E.A., Miller A.J. Speaking Of Food: Connecting Basic And Applied Plant Science. *Am. J. Bot.*, 2014, vol. 101, no. 10, pp. 1597-1600. doi: 10.3732/ajb.1400409.
3. Gross M. Plant science called up to provide food security. *Curr. Biol.*, 2014, vol. 24, no. 23, pp. 1105-1108. PMID: 25606585.
4. Bus V.G.M., Rikkerink E.H.A., Caffier V., Durel C.-E., Plummer K.M. Revision of the nomenclature of the differential host-pathogen interactions of *Venturia inaequalis* and *Malus*. *Annual Review of Phytopathology*, 2011, vol. 49, pp. 391-413. doi: 10.1146/annurev-phyto-072910-095339.
5. Benaouf G., Parisi L. Genetics of host-pathogen relationships between *Venturia inaequalis* races 6 and 7 and *Malus* species. *Phytopathology*, 2000, vol. 90, pp. 236-242. doi: 10.1094/PHYTO.2000.90.3.236.
6. Khan M.A., Zhao Y., Korban S.S. Molecular mechanisms of pathogenesis and resistance to the bacterial pathogen *Erwinia amylovora*, causal agent of fire blight disease in *Rosaceae* (Report). *Plant Molecular Biology Reporter*, 2012, vol. 30, no. 2, pp. 247(14). PMID: 282941912.
7. Peil A., Garsia-Libreros T., Richter K. et al. Strong evidence for a fire blight resistance gene of *Malus robusta* located on linkage group 3. *Plant Breed*, 2007, vol. 126, pp. 470-475. doi: 10.1111/j.1439-0523.2007.01408.x.
8. James C.M., Clarke J.B., Evans K.M. Identification of molecular markers linked to the mildew resistance gene *Pl-d* in apple. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, vol. 110, pp. 175-181. PMID: 15551035.
9. Bus V.G.M., Bassett H.C.M., Bowatte D. et al. Genome mapping of an apple scab, a powdery mildew and woolly apple aphid resistance gene from open-pollinated mildew immune selection. *Tree genetics and Genomes*, 2010, vol. 6, pp. 477-487. doi: 10.1007/s11295-009-0265-2.
10. Costa F., Stella S., de Weg Van W.E. et al. Role of the genes *Md-ACO1* and *Md-ACS1* in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh). *Euphytica*, 2005, vol. 141, pp. 181-190. doi: 10.1007/s10681-005-6805-4.

11. Würdig J., Flachowsky H., Höfer M. et al. Phenotypic and genetic analysis of the German *Malus* Germplasm Collection in terms of type 1 and type 2 red-fleshed apples. *Gene*, 2014, vol. 544, no. 2, pp. 198-207. doi: 10.1016/j.gene.2014.04.045.
12. Madenov Je.D. Plodovodstvo i vinogradarstvo [Pomiculture and viticulture] // Doklady Nacional'noj akademii nauk respubliki Kazahstan - Proceedings of the Kazakh National Academy of Science, 2011, no 3, pp. 74-87.
13. Faostat: Food and agriculture organization of the United Nations, statistic division // URL: <http://faostat3.fao.org/download/q/qc/e>.
14. Master-plan «Plodoovshhevodstvo» [Master-plan «Pomiculture and olericulture»]. Astana, 2013, 27 p.
15. Nurmuratuly T., Madenov Je.D., Nurtazina N.Ju. et al. Genofond mestnyh i starodavnyh sortov jabloni, grushi, abrikosa i vinograda na juge i jugo-vostoke Kazahstana [The genofond of local and traditional apple, pear, apricot and grapevine cultivars on the South-East Kazakhstan]. Almaty, 2012, 120 p.
16. Gosudarstvennyj reestr selekcionnyh dostizhenij, dopushhennyh k ispol'zovaniju v Respublike Kazahstan [The state registry of selection results approved for using in Republic of Kazakhstan]. Astana, 2011, 104 p.
17. Aubakirova K., Omasheva M., Ryabushkina N. et al. Evaluation of five protocols for DNA extraction from leaves of *Malus sieversii*, *Vitis vinifera*, and *Armeniaca vulgaris*. *Genet. Mol. Res*, 2014, vol.13, no. 1, pp. 1278-1287. PMID: 24634185.
18. Hokanson S.C. et al. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus × domestica* Borkh. core subset collection. *Theor. Appl. Genet*, 1998, no. 94, pp. 671-683. doi: 10.1007/s001220050943.
19. Liebhard R., Gianfranceschi L., Koller B. et al. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Molecular Breeding*, 2002, vol. 10, no. 4, pp. 217-241. doi: 10.1023/A:1020525906332.
20. Omasheva M.E., Chekalin S.V., Rjabushkina N.A., Galiakparov N.N. Ocenka molekulyarno-geneticheskogo raznoobrazija populjacij *Malus sieversii* Dzhungarskogo Alatau i Tarbagataja [Evaluation of the molecular genetic diversity of *Malus sieversii* populations in the Dzungarian Alatau and Tarbagatai mountains]. *Biotehnologija. Teorija i praktika - Biotechnology Theory and Practice*, 2015, no. 1, pp. P. 26-34. doi: 10.11134/btp.1.2015.3
21. Matschiner M., Salzburger W. TANDEM: integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows. *Bioinformatics*, 2009, vol. 25, no. 15, pp. 1982-1983.
22. Genome database for Rosaceae // URL: <https://www.rosaceae.org/>.
23. R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
24. Afunian M.R. et al. Linkage of *Vfa4* in *Malus x domestica* and *Malus floribunda* with *Vf* resistance to the apple scab pathogen *Venturia inaequalis*. *Plant Pathology*, 2004, vol. 53, pp. 461-467. doi: 10.1111/j.1365-3059.2004.01047.x.
25. Bus V.G.M., Laurens F.N.D., and van de Weg W.E. et al. The *Vh8* locus of a new gene-for-gene interaction between *Venturia inaequalis* and the wild apple *Malus sieversii* is closely linked to the *Vh2* locus in *Malus pumila* R12740-7A. *New Phytol*, 2005, vol. 166, no. 3, pp. 1035-1049. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01395.x.
26. Tartarini S., Gianfranceschi L., Sansavini S., Gessler C. Development of reliable PCR markers for the selection of the *Vf* gene conferring scab resistance in apple. *Plant Breeding*, 1999, vol. 118, pp. 183-186. PMID: 11269357.
27. Gyax M., Gianfranceschi L., Liebhard R. et al. Molecular markers linked to the apple scab resistance gene *Vbj* derived from *Malus baccata* jackii. *Theor Appl Genet*, 2004, vol. 109, no. 8, pp. 1702-1709. doi: 10.1007/s00122-004-1803-9.
28. Cheng F.S., Weeden N.F., Brown S.K. et al. Development of a DNA marker for *Vm*, a gene conferring resistance to apple scab // *Genome*, 1998, vol. 41, pp. 208-214. doi: 10.1139/g98-020.
29. Khan M.A., Durel C.-E., Duffy B. et al. Development of molecular markers linked to the 'Fiesta' linkage group 7 major QTL for fire blight resistance and their application for marker-assisted selection. *Genome*, 2007, vol. 50, p. 568-577. doi: 10.1139/G07-033.
30. Gardiner S., Murdoch J., Meech S. et al. Candidate resistance genes from an EST database prove a rich source of markers for major genes conferring resistance to important apple pests and diseases. *Acta Horti*, 2003, vol. 622, pp. 141-151. doi: 10.17660/actahort.2003.622.12.

ҚАЗАҚСТАН СЕЛЕКЦИЯСЫНЫҢ АЛМА СОРТТАРЫН SSR ӘДІСІМЕН ГЕНОТИПТЕУ ЖӘНЕ АСА ҚАУІПТІ ПАТОГЕНДЕРГЕ ТӨЗІМДІЛІГІМЕН БАЙЛАНЫСТЫ АЛЛЕЛЬДЕРДІ АНЫҚТАУ

Омашева М.Е., Пожарский А.С., Мәуленбай А.Д., Рябушкина Н.А.,
Галиакпаров Н.Н.

*Өсімдіктердің биологиясы және биотехнологиясы институты
Тимирязев көшесі, 45 үй, Алматы қ., 050040, Қазақстан Республикасы
natrya7@yahoo.com*

ТҮЙІН

Қазақстан аумағындағы алма түрлерінің алуан түрлілігінің шығу тегі Орта Азияның орталығына жатады. Қолайлы агроклиматтық жағдайларға қарамастан, республика өзінің ішкі нарығын тек 20% өніммен ғана қамтамасыз етеді. Генетикалық ресурстарды селекцияда пайдалану мен аудандастыру туралы халықаралық заманауи талаптар сорттардың фенотиптік сипаттамасымен қатар, генотиптік сипаттамасын қамтиды. Бұл зерттеуде Қазақстанда алғаш рет қазақстандық селекцияның 31 алма сорттары үшін 5 түрлі бау-бақша шаруашылықтарынан 2-3 қайталауда жиналған үлгілер негізінде 16 SSR маркерді пайдалана отырып, молекулалық-генетикалық паспорттар жасалды. Тәжірибеде анықталған сорттың генотиптік сипаттамалары (паспорттар) селекционерлердің көптеген сорттар туралы шежірелік ақпараттарын растады. Сонымен қатар жекелеген үлгілердің мәлімделген атауларында сәйкессіздіктер анықталды. Мысалы, «Апорт Александрдің» үш нұсқасы генотип жағынан Апорт пен белгісіз сорттың будандары екендігі анықталды. Генотиптелген сорттар алма қотыры, ақ ұнтақ, бактериялық күйік секілді зиянды патогендердің қауымдасқан аллельдерінің төзімділігіне тексерілді. Алма қотырына – 9 маркер, бактериялық күйікке – 2 маркер және ақ ұнтаққа – 5 маркер қолданылды. Ақ ұнтақ пен алма қотырына төзімділік гендері бар Мақсат, Салтанат және Максимус сорттары одан арғы селекцияда қолдануға ең перспективті екендігі анықталды. Қазақстандық селекцияның Апорт Рашида, Бес Жұлдыз, Восход, Жаңа таң, Максимус сорттары ұзақ мерзімге сақталу қабілеттігі үшін селекциялық жұмыстарға маңызды болып табылады.

Негізгі сөздер: *Malus domestica*, алма сорттары, генотиптеу, SSR маркерлері, ПТР.

Таблица 1. Характеристика сортов яблони Казахстанской селекции

Table 1. Characteristics of Kazakhstani apple varieties

№ п/п	Название	Происхождение	Краткая характеристика	Место сбора образца
1	Адilet	получен с участием Алматинского апорта (создан в КазНИИПиВ)	Летнего срока созревания. Мякоть белая, сочная, хорошего кисло-сладкого вкуса, с ароматом. Плоды хранятся 1 месяц. Информация об устойчивости отсутствует	[1]
2	Айнур	Алматинский апорт × Голден Делишес (создан в КазНИИПиВ)	Зимний сорт. Урожайный. Мякоть кремовая, сочная, сладкая, очень хорошего десертного вкуса, с ароматом Апорта. Хранится до мая. Зимостойкий, не поражается паршой	[3]; [5]
3	Апортовое	получен с участием апорта (создан в КазНИИПиВ)	Летнего срока созревания. Мякоть белая, сочная, хорошего кисло-сладкого вкуса. Плоды хранятся в течение месяца. Хорошая полевая устойчивость к мучнистой росе, слабая к парше	[1]
4	Апорт Алматинский (Апорт Александр)	плановая видовая селекция, в том числе скрещивание с яблоней Сиверса	Зимний сорт. Мякоть белая, с желтоватым оттенком, кисло-сладкая, ароматная, средней плотности. Плоды хранятся до февраля-марта. Сильно поражается паршой и бактериальным ожогом	[2]; [3]; [4]
5	Апорт кровавый (Апорт кроваво-красный)	Клон сорта Апорт	Зимний сорт. Мякоть белая, зернистая, сочная, средней плотности. Плоды хранятся до февраля-марта. Сильно поражается паршой и бактериальным ожогом	[1]; [2]
6	Апорт Рашида	Апорт × Джонатан (создан в ботаническом саду АН Киргизской ССР)	Зимний сорт. Мякоть умеренно сочная и мелкозернистая кисло-сладкого вкуса. Созревает к концу августа. Хранится в течение трех месяцев. Информация об устойчивости отсутствует	[2]; [5]
7	Апорт Талгарский	Клон сорта Апорт	Зимний сорт. Мякоть белая, зернистая, сочная, средней плотности. Плоды хранятся до февраля-марта. Сильно поражается паршой и бактериальным ожогом	[2]
8	Байтерек	Голден Делишес × смесь пыльцы Заилийское и Апорт	Информация отсутствует	[3]
9	Бес Жұлдыз	народная селекция	Информация отсутствует	[6]
10	Восход	Фантазия × Синап Алматинский (создан в КазНИИПиВ)	Зимний сорт. Мякоть белая, плотная, сочная, зернистая. Плоды хранятся до апреля-мая. Среднеустойчив к парше, поражается бактериальным ожогом	[1]; [2]; [3]; [4]
11	Грушовка Верненская	народная селекция	Старинный летний сорт. Мякоть белая, сочная, кисло-сладкая, плоды хранятся до апреля-мая. Устойчив к мучнистой росе	[2]
12	Даналық	Фантазия × Синап Алматинский (создан в КазНИИПиВ)	Сорт зимнего срока созревания. Мякоть кремовая, плотная, зернистая, кисло-сладкий, с сильным ароматом. Плоды хранятся до апреля. Устойчив к парше и мучнистой росе	[3]
13	Егемен	получен путем посева семян от свободного опыления сорта Голден Делишес (создан в КазНИИПиВ)	Зимний сорт. Мякоть белая, плотная, сочная, кисло-сладкая. Плоды созревают в сентябре, хранятся до мая. Неустойчив к парше	[1]; [3]
14	Есен	Голден Делишес × Заилийское × Апорт (создан в КазНИИПиВ)	Зимний сорт. Плодоносит обильно и ежегодно. Мякоть кремоватая, средней плотности, колющаяся, мелкозернистая, очень сочная. Устойчив к болезням и весенним заморозкам	[3]
15	Жарқын	получен с участием Алматинского апорта	Сорт зимнего срока созревания. Высокая регулярная урожайность. Мякоть зеленоватая, средней плотности, колющаяся, мелкозернистая, кисло-сладкого вкуса. Зимостойкий, устойчив к условиям произрастания и болезням	[3]
16	Жаңа тан	Информация отсутствует	Информация отсутствует	[6]

17	Заилийское (Апорт Заилийский)	Ренет Бурхардта × Апорт Александр (создан в КазНИИПиВ)	Зимний сорт. Мякоть нежная и сочная, вкусовые качества высокие. Плоды созревают в конце сентября, хранятся до мая. При колебании влажности почвы во время созревания у плодов иногда появляется «налив», такие плоды хранятся плохо. Информация об устойчивости отсутствует	[1]; [2]; [3]
18	Заря Алатау	получен из семян сорта Ренет Орлеанский от свободного опыления	Зимний сорт. Мякоть плотная, сочная, ароматная. Информация о сроках хранения и устойчивости отсутствует	[1]; [2]; [3]
19	Колонна Алатау (колонновидная яблоня)	создан в Казахстане	Зимний сорт. Мякоть белая, плотная, мелкозернистая. Информация о сроках хранения отсутствует. Среднеустойчив к бактериальному ожогу	[1]
20	Максимус	(создан в КазНИИПиВ)	Зимний сорт. Мякоть светло-желтая. Плоды созревают в начале сентября, хранятся до января. Имеет иммунитет к парше и мучнистой росе. Среднеустойчив к бактериальному ожогу	[1]
21	Максат	получен путем отбора семян сорта Прима от свободного опыления (создан в КазНИИПиВ)	Осенне-зимний сорт. Мякоть кремовая, средней плотности. Плоды созревают в августе-начале сентября, хранятся 3-4 месяца. Сорт имеет иммунитет к парше и мучнистой росе. Устойчив к бактериальному ожогу	[1]; [3]
22	Недзвецкий	клон яблони Недзвецкого	Декоративный сорт. Плоды с красноватой мякотью. Информация о сроках хранения отсутствует. Устойчивость к парше листьев средняя, у плодов – выше средней.	[1]
23	Нурпак	Апорт × Заря Алатау	Зимний сорт. Мякоть белая, средней плотности, кисло-сладкого вкуса. Плоды созревают в середине сентября, хранятся до февраля. Сорт среднеустойчив к парше и мучнистой росе, устойчив к бактериальному ожогу	[1]
24	Пионер Алатау	создан в Казахстане с участием яблони Недзвецкого	Осенний сорт. Окраска мякоти ярко-красная от кожицы до сердцевинки. Плоды созревают в конце августа, могут храниться 40-50 дней. Информация об устойчивости отсутствует	[1]
25	Рахат	получен с участием апорта (создан в КазНИИПиВ)	Осенне-зимний сорт. Мякоть плотная, сочная. Плоды созревают в конце августа, хранятся 2-3 месяца. Среднеустойчив к бактериальному ожогу	[1]
26	Румянка Алматинская	получен с участием апорта (создан в КазНИИПиВ)	Зимний сорт. Плоды крупные, красиво окрашенные, хорошего вкуса, улучшающегося в процессе хранения, сохраняются до мая. К парше и мучнистой росе среднеустойчив	[2]; [3]
27	Салтанат	создан методом отбора семян Ренет Бурхардта от свободного опыления	Зимний сорт. Мякоть кремовая, средней плотности, мелкозернистая, сочная, кисловато-сладкая. Плоды созревают в начале сентября, хранятся до мая. Паршой и мучнистой росой не поражается	[2]
28	Саркыт	получен с участием апорта (создан в КазНИИПиВ)	Информация отсутствует	[3]
29	Синап Алматинский	получен с участием апорта (создан в КазНИИПиВ)	Зимний сорт. Мякоть плодов зеленовато-кремовой окраски, очень сочная. Созревает в сентябре, хранится до мая. К парше сравнительно устойчив	[2]
30	Талгарское	получен с участием апорта (создан в КазНИИПиВ)	Сорт яблони позднезимнего срока созревания. Мякоть белая, плотная, очень сочная, прекрасного вкуса. Отличается высокой лежкостью плодов, сохраняются 9-10 месяцев. Сорт высокоустойчив к грибковым заболеваниям	[4]
31	Тюльпан	получен с участием апорта (создан в КазНИИПиВ)	Осеннего срока созревания. Мякоть кремовая, мелкозернистая, сочная. Плоды созревают в августе, хранятся до февраля. Неустойчив к парше и мучнистой росе	[1]

[1] - КХ «Суздалева О.В.», г. Алматы, ул. Байзакова, 183, www.rose.kz

[2] - КХ «Фридрихгарден», г. Есик

[3] - КазНИИПиВ, г. Алматы, пр. Гагарина, 238-а

[4] - ИП «Айдарбаев»

[5] - «RDragon», г. Есик, ул. Спортивная, 30; <http://rdragan.kz/>

[6] - пос. Жемісті, ЮКО

Таблица 3. Результаты идентификации аллелей, ассоциированных с устойчивостью к парше, бактериальному ожогу, «лежкостью» плодов и окраской мякоти

Table 3. Results on identification of alleles associated with resistance to apple scab, fire blight, fruit storability and flesh color

Сорт	Устойчивость к парше							Устойчивость к бактериальному ожогу		«Лежкость» плодов				Окраска мякоти
	Vfa4		Vf		Vr	Vh2+Vh8		Vbj		Md-ACS1		Md-ACO1		
	VfC (286 п.н.)	AL07 (466 п.н.)	AM19 (526 п.н.)	OPB18 (799 п.н.)	OPL19 (433 п.н.)	K08 (743 п.н.)	Z13 (773 п.н.)	AE10 (375 п.н.)	GE-8019 (397 п.н.)	Md-ACS1-1 (489 п.н.)	Md-ACS1-2 (655 п.н.)	Md-ACO1-1 (525 п.н.)	Md-ACO1-2 (587 п.н.)	
Адилет (Апортовое)	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	129/131
Айнур	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	128/131
Апортовое (Адилет)	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	129/131
Апорт Алматинский	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	127/131
Апорт кровавый	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	131
Апорт Рашида	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	131
Апорт Талгарский	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	131
Байтерек	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	129/131
Бес Жұлдыз	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	131
Восход	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	127/131
Грушовка Верненская	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	131
Даналық	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	129/131
Егемен	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	131
Есен	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	128/131
Жаркын	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	127/129
Жаңа тан	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	127/131
Заилийское	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	127/131
Заря Алатау	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	127/131
Колонна Алатау	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	131
Максимус	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	127/131
Максат	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	131
Недзвецкий	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	131/235
Нурпак	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	127/131
Пионер Алатау	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	127/235
Рахат	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	131
Румянка Алматинская	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	131
Салтанат	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	127/131
Саркыт	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	131
Синап Алматинский	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	131
Талгарское	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	131
Тюльпан	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	131

* (1 – наличие аллеля; 0 – его отсутствие), для каждого маркера показан размер устойчивого аллеля

