

УДК 577.21:631.527:634.11:634.13

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ В СЕЛЕКЦИИ ЯБЛОНИ И ГРУШИ

Д.А. КИСЕЛЕВ, Е.Н. УДОВИЧЕНКО

*Институт садоводства Украинской академии аграрных наук
03027 Киев, ул. Садовая, 6*

Разработка стратегии отбора гибридных сеянцев с помощью молекулярных маркеров — одно из приоритетных направлений селекции в плодоводстве. Для идентификации маркеров, связанных с моно- и мультигенными признаками яблони (*Malus × domestica* Borkh.) и груши (*Pyrus comunnis* L.) используются многочисленные типы анализов ДНК.

Ключевые слова: *Malus × domestica* Borkh., яблоня, *Pyrus comunnis* L., груша, QTL, MAS.

Яблоня является основной плодовой культурой в умеренном климатическом поясе Северного полушария. В мировом производстве плодов она занимает четвертое место после бананов, цитрусов и винограда. Сегодня известны тысячи сортов этой культуры, которые отличаются рядом ценных признаков. Однако многие из них в той или иной степени восприимчивы к болезням и вредителям, что значительно уменьшает потенциальную урожайность и качество продукции, поэтому необходимо вывести иммунные сорта. Одно из главных заданий этой работы — отбор сеянцев, перспективным методом которого является использование молекулярных маркеров.

Основная сложность в селекции яблони и груши состоит в высоком уровне их гетерозиготности по многим хозяйственно-ценным признакам, что приводит к расщеплению в потомстве, которое чаще всего невозможно предсказать [22, 32, 33]. Продолжительный ювенильный период значительно удлиняет процесс отбора гибридных сеянцев и, соответственно, саму селекцию [5—7, 12]. Маркирование позитивных признаков с помощью молекулярных маркеров позволяет сократить время, необходимое для выведения сорта, упростить отбор сеянцев, который можно выполнять уже в первый год после посева семян и на любой стадии развития растения [8, 9, 27].

Маркеры моногенных признаков. Большинство идентифицированных маркированных генов кодирует моногенную форму резистентности (вертикальная устойчивость) к основным фитопатогенам и вредителям [8, 13, 15, 18]. Выявлено много молекулярных маркеров, идентифицирующих ген устойчивости к парше Vf, полученный от *Malus floribunda* L. (табл. 1) [10, 15]. Этот ген кодирует устойчивость к пяти расам патогена. Аллели гена Vf — Vfa 1, Vfa 2, Vfa 3, Vfa 4 не имеют интронов и кодируют белки, богатые лейцином, которые находятся в трансмембранной области. В молодых листьях экспрессируются все перечисленные

ТАБЛИЦА 1. Основные молекулярные маркеры гена устойчивости яблони к парше *Vf* [18]

Номер	Тип маркера	Название маркера	Расстояние, сМ
1	RAPD	OPM18	10,6
2	RAPD	OPU01	19,7
3	RAPD	OPD20	19
4	RAPD	OPA15	—
5	CAPS	OPM18	1,9
6	SCAR	OPU01	4
7	RAPD	OPH01	10
8	RAPD	OPR16	13/14
9	RAPD	OPAM19	0,9
10	RAPD	OPAL07	0,9
11	RAPD	OPC09	8,8
12	RAPD	OPAB19	13,4
13	RAPD	OPC08	15,5
14	RAPD	OPK16	4,3
15	RAPD	OPAR4	3,6
16	RAPD	OPAG12	9,9
17	RFLP	MC112a	7,7
18	RFLP	Pb610A	7,8
19	RFLP	Mc110A	8
20	RAPD	OPAG05	8
21	RAPD	S5	1,3
22	RAPD	B505	7,8
23	RAPD	B398	10,8
24	RAPD	K16	15,9
25	SCAR	OPAM19	0,9
26	SCAR	OPAL07	0,9
27	AFLP	EA2G11-1	0
28	AFLP	EA12MG16-1	0
29	AFLP	EA11MG4-1	0
30	AFLP	ET2MC8-1	0
31	AFLP	ET3MG10-1	0
32	AFLP	ET8MG1-1	0
33	AFLP	ET8MG7-1	0
34	AFLP	EA9MC15-1	0,2
35	AFLP	EA4MG1-1	0,2
36	AFLP	EA16MG2-1	0,2
37	AFLP	ET4MC14-1	0,2
38	AFLP	ET8MG16-1	0,2
39	AFLP	ET3MG10-2	0,2
40	AFLP	ET10MG8-1	0,2
41	AFLP	ET9MC3-1	0,4
42	AFLP	EA5MC3-1	1,1
43	AFLP	EA8MC13-1	1,5
44	AFLP	EA13MC16-	2,2

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

выше аллели, а в зрелых — лишь Vfа 4 [19]. Клонирование генов как биотехнологический подход использован для выявления и картирования локусов гена Vf, особенно одного из них, названного HcrVf2, который используется для создания резистентных к парше трансгенных сортов яблони [3, 4].

Недавно идентифицированы и маркированы другие полигенные источники устойчивости к возбудителям парши, а именно гены Va, Vb, Vbj, Vm, Vr (табл. 2) [15, 18].

ТАБЛИЦА 2. Молекулярные маркеры моногенных признаков яблони

Признак	Ген	Название маркера	Расстояние, сМ
Устойчивость к парше	Vf	OPB12	6—8
Устойчивость к мучнистой росе	P11	OPAT20	4
		OPD2	5
	P12	OPAT20	4
		OPN18	—
		OPAJ4	—
Устойчивость к яблонево́й тле	Sd1	MC029b	2,2
		MC064a	1,5
		2B12a	1,5
		OPC08	14,7
		OPT09	18,9
		2B12SCAR	1,5
		E6/M6R2	1,5
		E6/M6R1	1,5
		E6/M8R1	—
		Устойчивость к кроваво́й тле	Er1
GS327 SCAR	11,5		
GS327 SCAR	26,1		
Er3	OPO05 SCAR		25
	OPO05 SCAR		0,8
	OPO05 SCAR		2,5
Колоновидный габитус растения	Co	OA11-1025	8
		B347Z-890	11,5
		OA11z-570	26,1
		B318y-440	25
		S34y810	0,8
		OA11-1005	2,5
Цвет плода	Rf	BC226	1,7
Содержание кислот в плоде	Ma	OPT16-1000	0
Синтез сорбитолдегидрогеназы	MdSDH5	AY849315	0
	MdSDH6	AY849316	0,6

Определены различные гены устойчивости (P11, P12, Plw, Pld) и к другой основной болезни яблони — мучнистой росе (*Podosphaera leucotricha*). Ранняя оценка восприимчивости гибридных семян к указанному заболеванию — очень трудный процесс, поэтому для успешной селекции необходимы надежные маркеры перечисленных генов. Для генов P11, P12, Plw, Pld они еще тестируются, так как иногда корреляция между молекулярными и фенотипическими спектрами данных оказывается низкой (см. табл. 2) [23, 25, 34].

Для семечковых культур, особенно для груши, очень вредна патогенная бактерия *Erwinia amylovora*, вызывающая бактериальный ожог плодовых деревьев. Охарактеризованы четыре гена устойчивости к этой бактерии: PR-1a, PR-2, PR-5, PR-8, а также два дополнительных PR-1-подобных гена. Гены PR-1a, PR-1b и PR-1c не принимают участия в реакции молодых побегов яблони на инфекцию, т.е. не образуют точечных некрозов [7, 8, 18, 26].

Генетическая устойчивость к двум биотипам серой яблочной тли (*Dysaphis devecta*), обусловленная геном Sd1, была точно маркирована и нанесена на генетическую карту в 12-й группе сцепления [21, 22]. Начато исследование ближайших маркеров к этому гену на генетической карте [25]. Разработаны маркеры устойчивости к кровавой тле (*Eriosoma lanigerum*) (см. табл. 2) [23], но их эффективность и надежность еще следует проверить.

Выявлены маркеры генов Co, Ma и Rf, отвечающих за колоновидный габитус растения, содержание кислот в плоде, красную или желтую окраску его кожицы [2, 5, 12, 14] (см. табл. 2).

Маркированы аллели гена MdSDH, а именно MdSDH5 и MdSDH6, отвечающие за синтез сорбитолдегидрогеназы — ключевого фермента метаболизма сорбитола. С ним связаны интенсивность роста и качество плодов яблони [1].

Идентифицированы гены AFL 1 и AFL 2, индуцирующие образование генеративных почек. Они экспрессируются в апикальных меристемах. Используя в отборе маркеры этого признака, можно выводить сорта с коротким ювенильным периодом [11, 23, 24].

Выявлен основной аллерген яблок, кодирующийся серией аллелей гена Mal d1. Локализация этих аллелей такова: Mal d1.01 — 13-я группа сцепления, Mal d1.02 — 1.06B — 1.06C — 16-я группа сцепления, Mal d1.05 — 6-я группа сцепления. Каждый из аллелей этого гена кодирует разное содержание аллергена. Наивысший уровень синтеза аллергена кодирует Mal d1.05 — 6 — приблизительно 65 % общего содержания. Используя кодоминантные маркеры к этим генам, можно проводить направленный отбор на гипоаллергенность, т.е. на наличие рецессивной гомозиготы по гену Mal d1.05 [16, 29].

Для японской груши известны только два примера связи молекулярных и фенотипических маркеров — это гены устойчивости к парше и черной кольцевой пятнистости [31].

Молекулярно-генетические карты и маркеры QTL. В настоящее время известно как минимум 5 молекулярно-генетических карт, построенных для яблони. Более ранние из них базируются на RAPD- или RFLP-маркерах, что ограничивает их применение и усложняет воспроизводимость [33, 34].

В 2002 г. была разработана детальная молекулярно-генетическая карта, базирующаяся на более чем 100 маркерах SSR, ее можно исполь-

зывать как вспомогательную для любого гибридного сеянца или клона яблони [21]. Аналогичные карты составлены и для груши. Недавно продемонстрировано, что генетические SSR-карты, подготовленные для яблони, могут эффективно применяться также для европейской и азиатской груши [34].

Идентификация маркеров QTL у плодовых культур — очень трудное задание, поскольку оба родителя чрезвычайно гетерозиготны и анализ сегрегации маркируемого признака требует большой выборки для повышения точности. Первым примером такого маркера, нанесенного на генетическую карту яблони, является признак твердости плода, второй — идентифицирован для оценки структуры его мякоти [2, 23].

Различные маркеры QTL, связанные с мультигенными источниками устойчивости к парше (TN 10-8), найдены относительно разных инокулятов (разных рас возбудителя) [9, 23]. Такие мультигенные источники устойчивости к заболеваниям очень актуальны для создания сортов, иммунных ко всем известным расам определенного микроорганизма, наиболее вредоносного в зоне районирования.

С использованием SSR-маркера CN02c02b на генетическую карту груши нанесены 2 маркера QTL устойчивости к бактериальному ее ожогу в 11-й группе сцепления [6].

Идентифицированы 3 маркера QTL содержания витамина С, локализованные в 6-, 10- и 11-й группах сцепления. Вклад каждого из них — до 31 % общего содержания витамина в мякоти плода [32].

Функциональные маркеры. RAPD, RFLP, SSR, AFLP маркеры генетически связаны только с одним признаком и не объясняют никаких функциональных отношений. Раньше много внимания уделялось идентификации различий в определенных последовательностях ДНК. Эти дифференциальные маркеры, связанные с генетической функцией и фенотипом, называются функциональными [22, 25].

Пригодность многих нуклеотидных последовательностей ДНК из баз данных к использованию в качестве молекулярных маркеров увеличила их доступность для ПЦР. К настоящему времени в базы данных занесены примерно 1400 нуклеотидных последовательностей яблони и груши. Построение генетических карт на основе маркеров QTL позволит идентифицировать признаки, кодирующиеся полигенно. Приведем несколько примеров использования таких маркеров.

Гаметофитная самонесовместимость яблони наследуется моногенно и обусловлена тем, что основной гликопротеин и РНКазы блокируют прорастание пыльцевых трубок при самоопылении. Спроектированы праймеры для S-РНКазы, которые позволяют идентифицировать аналогичные фрагменты S-РНКазы яблони и груши. Их можно использовать для нанесения данного гена на генетическую карту (17-я группа сцепления у яблони), определения аллельного состава разных сортов и гибридов яблони, груши [21, 25].

Данная методика используется и для идентификации генов АЦЦ-синтетазы и оксидазы в плодах разных сортов яблони и груши. Различия в исследуемых аллелях связаны с количеством этилена, который вырабатывается растением. Соответствие между группами генов можно исследовать с помощью гетерологических праймеров. Некоторые типы резистентности маркированы и нанесены на карту в местах сцепления с другими признаками [25, 28].

Селекция с помощью маркеров. В MAS (marker-assisted-selection) маркеры используются для идентификации признаков и облегчения направленного отбора. Особенно они незаменимы при отборе сеянцев с труднооценимыми признаками, такими как устойчивость к зеленой и оливковой плесени яблони или продолжительность ювенильного периода. Сегодня с помощью MAS можно проводить наиболее полный скрининг только к генам устойчивости к парше Vf. Пригодность большого количества маркеров, связанных с этим геном, позволила оптимизировать MAS. В результате этот метод стал более точным, он сокращает время отбора по сравнению с фенотипическими методами, дает возможность отличать гетерозиготные генотипы от гомозиготных, поскольку применяются 2 фланкирующих кодоминантных маркера. Поэтому позитивный отбор MAS-методом по определенной аллели может быть очень информативным для таких признаков, как устойчивость яблони и груши к парше [17, 19, 33, 34]. Другое преимущество метода — возможность эффективного негативного отбора донора по сцепленным генам с необходимым типом устойчивости, чего нельзя достичь стандартными фенотипическими методами отбора.

Исследования показали, что при селекции сортов яблони на устойчивость к парше на основании только фенотипического отбора, в геноме сеянцев есть часть генов *Malus floribunda* L., сцепленных с генами Vf даже в пятом—шестом поколениях. Устранение «диких» генов у исследуемых гибридов может быть ускорено на уровне генома при использовании генетических карт с небольшим количеством SSR-маркеров, сцепленных с генами устойчивости и «дикими» признаками [28].

Пригодность молекулярных маркеров, связанных с резистентностью к парше, и их положение на генетической карте можно использовать для оценки филогенетических связей между разными источниками устойчивости.

MAS может применяться для направленного отбора сеянцев, которые несут несколько генов вертикальной устойчивости к одному и тому же фитопатогену [6, 7, 13, 15].

Таким образом, за прошедшее десятилетие во всем мире многие исследования были посвящены улучшению стратегии отбора селекционных форм яблони и груши доступными молекулярными методами. Идентификация маркеров, сцепленных с искомым признаком, является надежным методом отбора и характеризуется высокой воспроизводимостью (например, RFLP, SSR, AFLP более надежны и воспроизводимы, чем RAPD). Доступность и полноценность MAS-анализа для ускорения направленного отбора селекционных образцов широко применяется для моногенных признаков. К сожалению, большинство ценных признаков кодируется полигенно, что не дает возможности использовать для их идентификации молекулярные маркеры в полном объеме. Известно всего несколько случаев применения QTL для анализа полигенных признаков. SSR-маркеры отличаются большим генетическим потенциалом для маркировки полигенных признаков. Основная задача в настоящее время — воплотить эти теоретические предпосылки в практику.

1. Adams-Phillips L., Barry C., Giovannoni J. Signal transduction system regulating fruit ripening // Trends Plant Sci. — 2004. — 48, N 9. — P. 331–338.
2. Arakawa O. Characteristics of color development in some apple cultivars — changes in anthocyanin synthesis during maturation as affected by bagging and light quality // J. Jap. Soc. Hort. Sci. — 1988. — 57. — P. 373–380.

3. Belfanti E., Barbieri M., Tartarini S. et al. Gala apple transformed with the putative resistance gene HcrVf2 // Eucarpia Symp. in Fruit Breed. and Genetics (Sept. 1–5, 2003, Angers, France). — 2003. — P. 254–259.
4. Belfanti E., Silfverberg-Dilworth E., Tartarini S. et al. The HcrVf2 gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety // PNAS. — 2006. — **101**, N 3. — P. 886–890.
5. Bendokas V., Gelvonauskiene D., Gelvonauskis B. et al. Identification of apple columnar hybrids in juvenile phase using molecular markers // Scientific Works of Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture. — 2007. — **26**, N 3. — P. 295–298.
6. Bokszczyński K., Dondini L., Przybyła A.A. First report on the presence of fire blight resistance in linkage group 11 of *Pyrus ussuriensis* Maxim // J. Appl. Genet. — 2009. — **50**, N 2. — P. 99–104.
7. Bonasera J.M., Kim J.F., Beer S.V. PR genes of apple: identification and expression in response to elicitors and inoculation with *Erwinia amylovora* // BMC Plant Biol. — 2006. — **23**, N 6. — P. 1–12.
8. Brisset M.N., Cesbron S., Thomson S.V., Paulin J.P. Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight // Eur. J. Plant Pathol. — 2000. — **106**, N 6. — P. 529–536.
9. Chen D.M., Zlang S.L., Jin Y.F. A method for genomic DNA preparation of woody fruit crops // J. Zhejiang Agr. Univ. — 1997. — **23**. — P. 261–264.
10. Chevalier M., Lespinasse Y., Renaudin S. Amicroscopic study of different classes of symptoms coded by the Vf gene in apple for resistance to scab (*Venturia inaequalis*) // Plant Pathol. — 1991. — **40**. — P. 249–256.
11. Costa F., Stella S., Van de Weg 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. — **141**. — P. 181–190.
12. De Jong W.S., Eannetta N.T., De Jong D.M., Bodis M. Candidate gene analysis of anthocyanin pigmentation loci in the Solanaceae // Theor. Appl. Genet. — 2004. — **108**. — P. 423–432.
13. Dondini L., Pierantoni L., Gaiotti F. et al. Identifying QTLs for fire-blight resistance via a European pear (*Pyrus communis* L.) genetic linkage map // Mol. Breed. — 2004. — **14**. — P. 407–418.
14. Dong Y.H., Mitra D., Kootstra A. et al. Postharvest stimulation of skin colour in Royal Gala apple // J. Amer. Soc. Hort. Sci. — 1998. — **120**. — P. 95–100.
15. Durel C.E., Calenge F., Parisi L. et al. Stability of scab resistance QTLs in several mapped progenies // Eucarpia Symposium in Fruit Breeding and Genetics (Sept. 1–5, 2003, Angers, France). — Angers, 2003. — P. 5–7.
16. Gao Z., Matos E., Arens P. et al. Assessment of allelic diversity in introncontaining Mal d1 genes and their association to apple allergenicity // BMC Plant Biol. — 2008. — **8**. — P. 116–129.
17. Gardner R.G., Cummins J.N., Aldwinckle H.S. Inheritance of fire blight resistance in *Malus* in relation to rootstock breeding // J. Amer. Soc. Hort. Sci. — 1980. — **105**. — P. 912–916.
18. Gau A.E., Koutb M., Piotrowski M., Kloppstech K. Accumulation of pathogenesis-related proteins in the apoplast of a susceptible cultivar of apple (*Malus domestica* cv. Elstar) after infection by *Venturia inaequalis* and constitutive expression of PR genes in the resistant cultivar Remo // Eur. J. Plant Pathol. — 2004. — **110**, N 7. — P. 703–711.
19. Hafiz I.A., Long L.Z., Long Z.S. et al. Genomic DNA variation associated with phase change in crab apple and peach // Int. J. Agr. Biol. — 2000. — **2**, N 3. — P. 2–12.
20. Hiroyasu Kitashiba, Chikako Honda, Takaya Moriguchi. Identification of polyamine oxidase genes from apple and expression analysis during fruit development and cell growth // Plant Biotechnol. — 2006. — **23**. — P. 425–429.
21. Hokanson S.C., Lamboy W.F., Szewc-McFadden A.K., McFerson J.R. Microsatellite (SSR) variation in a collection of *Malus* (apple) species and hybrids // Euphytica. — 2001. — **118**. — P. 281–294.
22. Kenis K., Keulemans J. Genetic linkage maps of two apple cultivars based AFLP and microsatellite markers // Mol. Breed. — 2005. — **15**. — P. 205–219.
23. Kitashiba H., Hao Y-J., Honda C., Moriguchi T. Two types of spermine synthase gene: MdACL5 and MdSPMS are differentially involved in apple fruit development and cell growth // Gene. — 2005. — **361**. — P. 101–111.
24. Kotoda N., Wada M., Kusaba S. et al. Overexpression of MdMADS5, an APETALA1-like gene of apple, causes early flowering in transgenic *Arabidopsis* // Plant Sci. — 2002. — **162**. — P. 679–687.
25. Liebhart R., Gianfranceschi L., Koller B. et al. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus domestica* Borkh.) // Mol. Breed. — 2004. — **10**. — P. 217–241.

26. Norelli J.L. Effect of prohexadione-calcium dose level on shoot growth and fire blight in young apple trees // Plant Disease. — 2004. — **88**. — P. 1099—1106.
27. Orazuie N.C., Gardiner S.E., Basset H.C.M. et al. Genetic diversity and relationship in *Malus* sp. germplasm collections as determined by Random Amplified Polymorphic DNA // J. Amer. Soc. Hort. Sci. — 2001. — **126**, N 3. — P. 318—328.
28. Pierantoni L., Cho K.H., Shin I.S. et al. Characterisation and transferability of apple SSRs to two European pear F1 populations // Theor. Appl. Genet. — 2004. — **109**. — P. 1519—1524.
29. Puhringer H., Moll D., Hoffmann-Sommergruber K. et al. The promoter of an apple Ypr10 gene, encoding the major allergen Mal d1, is stress and pathogen-inducible // Plant Sci. — 2000. — **152**, N 1. — P. 35—50.
30. Sawamura Y., Saito T., Takada N. et al. Identification of parentage of Japanese pear Housui // J. Jap. Soc. Hort. Sci. — 2004. — **73**. — P. 511—518.
31. Sparla F., Rotino L., Valgimigli M.C. et al. Systemic resistance induced by benzothiadiazole in pear inoculated with the agent of fire blight (*Erwinia amylovora*) // Sci. Hort. — 2004. — **101**, N 3. — P. 269—279.
32. Tatum T.C., Stepanovic S., Biradar D.P. et al. Variation in nuclear DNA content in *Malus* species and cultivated apples // Genome. — 2005. — **48**. — P. 924—930.
33. Yamamoto T., Kimura T., Sawamura Y. et al. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear // Theor. Appl. Genet. — 2001. — **102**. — P. 865—870.
34. Yamamoto T., Saito T., Kotobuki K. et al. Genetic linkage maps of Japanese and European pears aligned to the apple consensus map // Eucarpia Symp. in Fruit Breed and Genetics (Sept. 1—5, 2003, Angers, France). — 2003. — P. 145—147.

Получено 09.09.2009

ВИКОРИСТАННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ У СЕЛЕКЦІЇ ЯБЛУНІ ТА ГРУШІ

Д.О. Кисельов, К.М. Удовиченко

Інститут садівництва Української академії аграрних наук, Київ

Розробка стратегії добору гібридних сіянців за допомогою молекулярних маркерів — один із пріоритетних напрямів селекції у плідівництві. Для ідентифікації маркерів, пов'язаних із моно- і мультигенними ознаками яблуні (*Malus × domestica* Borkh.) та груші (*Pyrus communis* L.) використовують численні типи аналізів ДНК.

USE OF MOLECULAR MARKERS IN APPLE AND PEAR BREEDING

D.A. Kyselyov, E.N. Udovichenko

Institute of Horticulture of Ukrainian Academy of Agrarian Sciences
6 Sadova St., Kyiv, 03027, Ukraine

The development of markers-assisted selection strategies is one of prior directions in pome fruit breeding. Many different types of DNA analyses are used to identify markers linked with both monogenic and multigenic traits of apple (*Malus × domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus communis* L.).

Key words: apple (*Malus × domestica* Borkh.), pear (*Pyrus communis* L.), QTL, MAS.