

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОРТОВ ЯБЛОНИ ПО QTL FBF7 УСТОЙЧИВОСТИ К БАКТЕРИАЛЬНОМУ ОЖОГУ

**Лыжин А.С.**, канд. с.-х. наук, **Савельева Н.Н.**, д-р биол. наук  
 Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
 «Федеральный научный центр имени И.В. Мичурина»  
 (Мичуринск, Россия)  
[Ranenburzhetc@yandex.ru](mailto:Ranenburzhetc@yandex.ru)

**Реферат.** Показаны результаты молекулярно-генетического анализа сортов яблони по QTL FBF7 устойчивости к бактериальному ожогу. Маркер CH-F7-Fb1 (фрагмент 210 п.н.) идентифицирован у 7 форм (53,8 %), маркер AE10-375 (фрагмент 375 п.н.) – у 10 форм (76,9 %), маркер GE-8019 (фрагмент 397 п.н.) – у 3 форм (23,1 %) из 13 проанализированных сортов яблони. Комбинация трёх маркеров (AE10-375, CH-F7-Fb1, GE-8019), свидетельствующая о наличии в генотипе QTL FBF7 устойчивости к бактериальному ожогу, выявлена у сортов Рождественское и Свежесть, которые можно рекомендовать в качестве перспективных источников устойчивости к *E. amylovora*.

**Ключевые слова:** яблоня, молекулярные маркеры, бактериальный ожог, QTL

**Summary.** The results of molecular-genetic analysis of apple varieties by QTL FBF7 associated with fire blight resistance were shown. Of the 13 analyzed apple varieties, marker CH-F7-Fb1 (210 bp fragment) was identified in 7 forms (53.8 %), marker AE10-375 (375 bp fragment) was identified in 10 forms (76.9 %), marker GE-8019 (397 bp fragment) was identified in 3 forms (23.1 %). A combination of three markers (AE10-375, CH-F7-Fb1 and GE-8019), indicating the presence of QTL FBF7 associated with fire blight resistance, was revealed in varieties Rozhdestvenskoe and Svezhest, which can be recommended as promising sources of resistance to *E. amylovora*.

**Key words:** apple, molecular markers, fire blight, QTL

**Введение.** Бактериальный ожог плодовых культур (возбудитель – бактерия *Erwinia amylovora* (Burill) Winslow et al.) – широко распространённое во многих странах мира (США, Канада, ЕЭС, Австралия, Япония, Россия и др.) опасное заболевание яблони. Патоген поражает все органы растения, вызывая некроз тканей и потери урожая, в дальнейшем растение погибает [1-3].

Вредоносность бактериального ожога очень велика вследствие очень быстрого распространения в плодовых насаждениях. В благоприятных условиях *E. amylovora* может поразить от 20 до 60 % насаждений, из которых 10-20 % погибает. В некоторых насаждениях бактериальным ожогом может заразиться до 90 % плодовых растений [4, 5].

Основным способом борьбы с *E. amylovora* в насаждениях плодовых культур до настоящего времени является использование синтетических антибиотиков. Однако широкое использование антибиотиков во многих странах ограничено законодательством, кроме того их применение может способствовать появлению новых высокоустойчивых штаммов *E. amylovora* [6, 7].

В связи с этим важным элементом борьбы с бактериальным ожогом в насаждениях плодовых культур является создание и возделывание сортов с генетически детерминированной устойчивостью к *E. amylovora* [8, 9].

Локусы количественных признаков (QTL), связанные с признаком «устойчивость к бактериальному ожогу» были идентифицированы у различных дикорастущих видов и разновидностей рода *Malus* (*M. fusca*, *M. baccata*, *M. prunifolia*, *M. × atrosanguinea*, *M. ×*

robusta var. persicifolia, M. sieversii, M. floribunda 821, M. × robusta), которые объясняют фенотипические различия по степени устойчивости в диапазоне от 15 до 83 % [8, 10-12].

Одним из наиболее крупных QTL, контролирующей устойчивость яблони к бактериальному ожогу является QTL FBF7, картированный на LG7 генома яблони сорта Фиеста. QTL FBF7 обеспечивает от 34,3 до 46,6 % фенотипической вариации устойчивости яблони к E. amylovora [13].

Целью настоящих исследований являлся молекулярно-генетический анализ сортов яблони QTL FBF7 устойчивости к бактериальному ожогу для идентификации генотипов, устойчивых к E. amylovora.

**Объекты и методы исследований.** Исследования проведены в 2020-2021 гг. В качестве биологических объектов использованы сорта яблони генетической коллекции ФГБНУ «ФНЦ им. И.В. Мичурина».

Для идентификации в геноплазме яблони QTL устойчивости к бактериальному ожогу использовали маркеры AE10-375, GE-8019, CH-F7-Fb1 (табл. 1).

Таблица 1 – Характеристика использованных в работе маркеров

Маркер	Нуклеотидная последовательность праймеров	Размер ампликонов, п.н.	Источник
AE10-375	F 5'-CTGAAGCGCACGTTCTCC-3' R 5'-CTGAAGCGCATCATTTCTGATAG-3'	375	Khan et al., 2007 [13]
GE-8019	F 5'-TTGAGACCGATTTTCGTGTG-3' R 5'-TCTCTCCCAGAGCTTCATTGT-3'	397	
CH-F7-Fb1	F 5'-AGCCAGATCACATGTTTTTCATC-3' R 5'-ACAACGGCCACCAGTTTATC-3'	174, 210	

Использованные в работе праймеры, синтезированы в ЗАО «Синтол» (Москва).

Маркер CH-F7-Fb1 представлен фрагментами размером 174 и 210 п.н. Фрагмент 174 п.н. присутствует в геноме яблони независимо от наличия QTL FBF7. Фрагмент 210 п.н. амплифицируется только при наличии в геноме QTL FBF7. Маркер AE10-375 представлен фрагментом размером 375 п.н., маркер GE-8019 – фрагментом размером 397 п.н. Указанные ампликоны синтезируются только у генотипов с QTL FBF7 [13].

Экстракция геномной ДНК сортов яблони была проведена из молодых листьев согласно протоколу Diversity Arrays Technology P/L [14] с модификациями, позволяющими согласно проведённым ранее исследованиям [15, 16] получать экстракт геномной ДНК дикорастущих видов, сортов и гибридных семян яблони необходимой для постановки ПЦР концентрации и чистоты.

Реакционная смесь для ПЦР объемом 15 мкл содержала: 20 нг ДНК, 1,5 мМ dNTPs, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 пМ каждого праймера, 1 U Taq-полимеразы и 2,5 мМ 10x Taq-буфера (+(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, -KCL). Все компоненты произведены фирмой Thermo Fisher Scientific.

Амплификацию проводили в термоциклере T100 производства фирмы «BIO-RAD» по следующей программе: денатурация 94 °С – 5 мин, 35 циклов: 94 °С – 1 мин, 50 °С – 1,5 мин, 72 °С – 1,5 мин; финальная элонгация 72 °С – 15 мин.

Разделение целевых продуктов маркеров осуществляли методом электрофореза в 2 % агарозном геле. В качестве буферной системы использовался 1x TBE (трис-боратный буфер). Для определения длины амплифицированных фрагментов использовался маркер молекулярной массы GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

**Обсуждение результатов.** Согласно проведённым исследованиям маркер CH-F7-Fb1 присутствует у всех изученных генотипов: фрагмент размером 174 п.н. (амплификация данного продукта не зависит от наличия или отсутствия локуса устойчивости – QTL FBF7) – у 6 форм, фрагмент 210 п.н., свидетельствующий о присутствии в геноме яблони QTL FBF7 – у 7 форм (53,8 %). Маркер AE10-375 (фрагмент 375 п.н.) идентифицирован у 10 форм (76,9 %), маркер GE-8019 (фрагмент 397 п.н.) – у 3 форм (23,1 %) из 13 проанализированных сортов яблони (табл. 2).

Таблица 2 – Результаты ПЦР-анализа QTL FBF7 у сортов яблони

Сорт	Маркеры QTL FBF7			
	GE-8019	AE10-375	CH-F7-Fb1	
	397 п.н.	375 п.н.	174 п.н.	210 п.н.
Антоновка обыкновенная	0	0	1	0
Вымпел	0	1	1	0
Гала	0	1	1	0
Галарина	0	0	1	0
Кандиль орловский	0	1	1	0
Лигол	0	1	0	1
Лобо	1	1	1	0
Рождественское	1	1	0	1
Свежесть	1	1	0	1
Скала	0	1	0	1
Флагман	0	0	0	1
Фрегат	0	1	0	1
Фуджи	0	1	0	1

Хотя бы один из трёх маркеров (для маркера CH-F7-Fb1 имеется в виду наличие фрагмента размером 210 п.н.) идентифицирован у 11 из 13 сортов яблони, что составляет 84,6 %. Два маркера из трёх выявлены у 5 генотипов (38,5 % форм). У сорта народной селекции Антоновка обыкновенная и французского сорта Галарина изучаемые маркеры в генотипе отсутствуют.

Комбинация маркеров AE10-375 и CH-F7-Fb1 (210 п.н.), локализованных с одной стороны, QTL FBF7, присутствует у 6 сортов: Лигол, Рождественское, Свежесть, Скала, Фрегат и Фуджи. У сортов Вымпел, Гала, Кандиль орловский и Лобо маркер AE10-375 присутствует, тогда как фрагмент маркера CH-F7-Fb1 размером 210 п.н. не выявлен. У сорта Флагман выявлено наличие маркера CH-F7-Fb1 (210 п.н.) при отсутствии маркера AE10-375. При этом необходимо отметить, что в исследовании Khan et al. (2007) [13] все генотипы яблони, характеризующиеся наличием маркера AE10-375, также имели маркер CH-F7-Fb1 (210 п.н.).

Комбинация маркеров GE-8019 и AE10-375, которые фланкируют локус FBF7 устойчивости к бактериальному ожогу, выявлена у 3 сортов яблони: Лобо, Рождественское и Свежесть, что свидетельствует о присутствии в генотипе QTL FBF7 устойчивости к бактериальному ожогу. Однако комбинация трёх маркеров выявлена только у двух сортов – Рождественское и Свежесть, так как у сорта Лобо отсутствует маркер CH-F7-Fb1, который используется в дополнение к маркеру AE10-375 для повышения надёжности анализа.

**Выводы.** С использованием молекулярных маркеров проведён анализ сортов яблони по QTL FBF7 устойчивости к бактериальному ожогу. Маркер CH-F7-Fb1 (210 п.н.) идентифицирован у 7 форм, маркер AE10-375 (фрагмент 375 п.н.) – у 10 форм, маркер GE-8019 (фрагмент 397 п.н.) – у 3 форм из 13 проанализированных сортов яблони. Комбинация трёх маркеров (AE10-375, CH-F7-Fb1, GE-8019), свидетельствующая о наличии в генотипе

QTL FBF7 устойчивости к бактериальному ожогу, выявлена у сортов Рождественское и Свежесть, которые можно рекомендовать в качестве перспективных источников устойчивости к *E. amylovora*.

### Литература

1. Le Roux P.M., Khan M.A., Brogginì G.A., Duffy B., Gessler C., Patocchi A. Mapping of quantitative trait loci for fire blight resistance in the apple cultivars 'Florina' and 'Nova Easygro' // *Genome*. 2010. V. 53(9). P. 710-722.
2. Kostick S.A., Norelli J.L., Evans K.M. Novel metrics to classify fire blight resistance of 94 apple cultivars // *Plant Pathology*. 2019. V. 68(5). P. 985-996.
3. Дренова Н.В. Ожог плодовых культур в Российской Федерации и современные подходы к его диагностике // *Плодоводство и ягодоводство России*. 2020. Т. 58. С. 131-137.
4. Дренова Н.В., Исин М.М., Джаймурзина А.А., Жармухамедова Г.А., Айткулов А.К. Бактериальный ожог плодовых культур в Республике Казахстан // *Карантин растений. Наука и практика*. 2013. №1(3). С. 39-43.
5. Ходжаева С.М., Хасанов Б.А., Гузалова А.Г. Бактериальный ожог плодовых деревьев в Узбекистане, вызываемый бактерией *Erwinia amylovora* (Burill) Winslow et al. // *International Scientific and Practical Conference "World Science"*, January 2016. №1(5). V. 5. P. 17-20.
6. Turechek W. Apple diseases and their management // *Diseases of fruits and vegetables*. 2004. V. I. P. 1-108.
7. Jarolmasjed S., Sankaran S., Marzougui A., Kostick S., Si Y., Quirós Vargas J.J., Evans K. High-throughput phenotyping of fire blight disease symptoms using sensing techniques in apple // *Frontiers in plant science*. 2019. V. 10. P. 576.
8. Harshman J.M., Evans K.M., Allen H., Potts R., Flamenco J., Aldwinckle H.S., Wisniewski M.E., Norelli J.L. Fire blight resistance in wild accessions of *Malus sieversii* // *Plant disease*. 2017. V. 101(10). P. 1738-1745.
9. Kostick S.A., Teh S.L., Norelli J.L., Vanderzande S., Peace C., Evans K.M. Fire blight QTL analysis in a multi-family apple population identifies a reduced-susceptibility allele in 'Honeycrisp' // *Horticulture research*. 2021. V. 8(1). P. 1-13.
10. Durel, C.E., Denance C., Brisset M.N. Two distinct major QTL for resistance to fire blight co-localize on linkage group 12 in apple genotypes 'Evereste' and *Malus floribunda* clone 821 // *Genome*. 2009. V. 52(2). P. 139-147.
11. Emeriewen O., Malnoy M., Richter K., Kilian A., Hanke M.-V., Peil A. Evidence of a major QTL for fire blight resistance in the apple wild species *Malus fusca* // *Acta Hort.* 2014. V. 1056. P. 289-293.
12. Kost T.D., Gessler C., Jansch M., Flachowsky H., Patocchi A., Brogginì G.A.L. Development of the First Cisgenic Apple with Increased Resistance to Fire Blight // *PLoS ONE*. 2015. V. 10(12). e0143980.
13. Khan M.A., Durel C.E., Duffy B., Drouet D., Kellerhals M., Gessler C., Patocchi A. 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. V. 50(6). P. 568-577.
14. DArT, 2014 (дата обращения: 10.07.2018). URL: [http://www.diversityarrays.com/sites/default/files/resources/DArT\\_DNA\\_isolation.pdf](http://www.diversityarrays.com/sites/default/files/resources/DArT_DNA_isolation.pdf)
15. Савельев Н.И., Лыжин А.С., Савельева Н.Н. Отбор перспективных генотипов яблони на колонновидность и устойчивость к парше с помощью диагностических ДНК-маркеров // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016. Т. 20. №3. С. 329-332.
16. Лыжин А.С., Савельева Н.Н. Полиморфизм сортов яблони по локусам моногенной устойчивости к парше // *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2020. Т. 181. №1. С. 64-72.