

## СКРИНИНГ УСТОЙЧИВОСТИ МЕСТНЫХ СОРТОВ ЯБЛОНИ АЗЕРБАЙДЖАНА К ПАТОГЕНАМ *VENTURIA INAEQUALIS* (СООКЕ.) WINT. И *PODOSPHAERA LEUCOTRICHA* SALM. С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

Э. М. ХАНКИШИЕВА

Научно-исследовательский институт плодоводства и чаеводства  
Министерства сельского хозяйства, Абшеронская опытная станция,  
ул. Али Исазаде, 28, 1045, Баку, Азербайджан,  
e-mail: elnara\_mba@yahoo.de

### АННОТАЦИЯ

В данном исследовании с помощью молекулярных подходов была оценена устойчивость к патогену *Venturia inaequalis* (Cooke.) Wint. некоторых местных сортов яблони, произрастающих на территории Азербайджана. Использовано 27 молекулярных маркеров генов устойчивости к парше и три маркера устойчивости к мучнистой росе. В качестве объектов использовали двадцать коллекционных сортов яблони Института JK1, Дрезден, Германия, устойчивых к парше, и семь местных сортов яблони, произрастающих в Азербайджане.

Молекулярные маркеры SSR-23.03, *Rvi18*-SSR, T6, NZmsCN943818 и NH030a генов устойчивости к парше *Rvi12*, *Rvi18*, *Rvi11*, *Rvi16*, а также CH03c02 гена устойчивости к мучнистой росе *Pl-d* не были обнаружены ни в одном из исследуемых местных сортов. 30 молекулярных маркеров, использованных для тестирования генов устойчивости к *V. inaequalis* и *P. leucotricha*, могут быть использованы для интрогрессии и пирамидизации генов устойчивости в национальной селекционной программе яблони в Азербайджане.

**Ключевые слова:** молекулярные маркеры, сорта яблони, гены устойчивости, *Venturia inaequalis*, *Podosphaera leucotricha*, Азербайджан.

### ВВЕДЕНИЕ

Парша яблони является грибным заболеванием, вызванным *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. Этот патоген вызывает значительные экономические потери во всем мире [1]. Ущерб и потери значительно различаются в зависимости от погодных условий и чувствительности используемых сортов [2].

Весной, особенно в прохладную и дождливую погоду, у восприимчивых сортов тяжесть заболевания увеличивается. В случае не применения химической защиты потеря урожая может достигать 100 % [1]. В последние годы из-за значительных потерь в производстве яблок в Республике Азербайджан производители увеличили использование пестицидов против парши яблони в прохладное и влажное лето. Это увеличивает производственные затраты и оказывает негативное влияние на окружающую среду и здоровье человека. Кроме того, патоген может стать устойчивым к химическим веществам, используемым слишком часто и чрезмерно.

Чтобы избежать негативных последствий к резистентности пестицидов, проводятся селекция и использование устойчивых сортов [1]. Устойчивые гены, присутствующие в диких видах яблони, были введены в коммерческие сорта с использованием традиционных методов селекции. Среди генов, ответственных за устойчивость к парше яблони, наиболее часто используется ген *Rvi6* (*Vf*), его происхождение – дикая яблоня *Malus floribunda* 821 [3, 4]. Целый ряд устойчивых генов против *V. inaequalis* был идентифицирован у разных сортов яблони. Ген *Rvi5* (*Vm*) в *Malus micromalus*, ген *Rvi15* (*Vr*) в *M. pumila*, ген *Rvi11* (*Vbj*) в *M. baccata kakii*, ген *Rvi12* (*Vb*) в Hansen's *baccata*#2, ген *Rvi17* (*Va*) в Антоновке PI 172623, ген *Vj* в Consib и *Vc* в Katay Krab [5]. M. Gygaх и другие (2004) [6] определили первые молекулярные маркеры, связанные с геном устойчивости яблони *Vbj*, который произошел от яблони *M. baccata jakkii*.

Другие гены устойчивости к парше известны и по большей части также были генетически картированы. V. Bus и A. Patocchi разработали ряд тестеров, состоящих из устойчивых к парше генотипов, для выявления существующей вирулентности в полевых условиях ([www.vinquest.ch](http://www.vinquest.ch)). L. Parisi и другими [7] сообщалось о появлении расы парши, способной преодолеть *Rvi6*. Эта раса теперь распространилась по большей части Европы, поэтому ген *Rvi6* преодолен во многих регионах Европы, однако, он все же может играть важную роль в культивировании яблони [8].

Опыт того, что ген устойчивости преодолен появлением новой расы парши, привел к тому, что селекционеры начали работу по пирамидированию генов устойчивости к парше в геноме одного сорта [9, 10]. Для большинства генов устойчивости к парше, перечисленных в таблице 1, существуют молекулярные маркеры, которые можно использовать для селекции пирамидальной устойчивости у потомства [11]. Это требует знания генов устойчивости, присутствующих у родителей. Маркеры также могут быть использованы для скрининга генетических ресурсов с целью выявления доноров устойчивости.

Таблица 1. Обзор генов устойчивости к парше яблони и их локализация в геноме

Ген резистентности		Группа сцепления (на хромосоме)	Ссылка на первый отчет о положении на карте
Новая номенклатура*	Старое название		
<i>Rvi1</i>	<i>Vg</i>	12	C. Durel и др., (2000), [37]
<i>Rvi2</i>	<i>Vh2</i>	2	V. Bus и др., (2005), [13]
<i>Rvi3</i>	<i>Vh3.1</i>	4	V. Bus и др., (2011), [14]
<i>Rvi4</i>	<i>Vh4</i>	2	V. Bus и др., (2005), [11]
<i>Rvi5</i>	<i>Vm</i>	17	A. Patocchi и др., (2005), [12]
<i>Rvi6</i>	<i>Vf</i>	1	C. Maliepaard и др., (1998), [15]
<i>Rvi7</i>	<i>Vfh</i>	8	V. Bus и др., (2011), [14]
<i>Rvi8</i>	<i>Vh8</i>	2	V. Bus и др., (2005a), [13]
<i>Rvi9</i>	<i>Vdg</i>	2	V. Bus и др., (2011), [14]
<i>Rvi10</i>	<i>Va</i>	1	M. Hemmat и др., (2003), [16]
<i>Rvi11</i>	<i>Vbj</i>	2	M. Gygaх и др., (2004), [6]
<i>Rvi12</i>	<i>Vb</i>	12	N. Erdin и др., (2006), [17]
<i>Rvi13</i>	<i>Vd</i>	10	S. Tartarini и др., (2004), [18]
<i>Rvi14</i>	<i>Vdr1</i>	6	V. Soufflet-Freslon и др., (2008), [19]
<i>Rvi15</i>	<i>Vr2</i>	2	A. Patocchi и др., (2004), [20]
<i>Rvi16</i>	<i>Vmis</i>	3	V. Bus и др., (2011), [14]
<i>Rvi17</i>	<i>Val</i>	1	V. Bus и др., (2011), [14]
<i>Rvi18</i>	<i>V25</i>	1	J. Soriano и др., (2014), [21]

\* Новая номенклатура генов устойчивости к парше у яблони была предложена Bus и другими (2011), [14].

Как правило, в селекционных программах пытаются производить устойчивые сорта, отвечающие требованиям рынка. Чтобы успешно разработать селекционную программу в этом направлении, генотипы яблони, которые присутствуют в разных регионах страны, должны быть проверены на наличие устойчивости. Целью данного исследования было выявить наличие устойчивости к парше у различных сортов яблони, выращиваемых в Азербайджане, и определить ценные сорта для будущей селекции. Для вышеупомянутого скрининга мы использовали двадцать семь молекулярных маркеров для различных генов устойчивости к парше и три молекулярных маркера для устойчивости к мучнистой росе (*Podosphaera leucotricha*) соответственно, которые доступны из литературы (<https://sites.unimi.it/camelot/hidras/>).

## МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Выборка растительного материала.** В нашем исследовании для молекулярного скрининга было использовано 27 различных сортов яблони: 7 местных из опытного сада Научно-исследовательского института плодоводства и чаеводства (Губа, Азербайджан) и 20 из коллекции Юлиус Кюн-Институт (JKI, Дрезден, Германия) (табл. 2).

Таблица 2. Сорта яблони и селекционный материал, использованные в исследованиях

Название сорта	Происхождение
Гызыл Ахмеди	Азербайджан
Джир Гаджи	Азербайджан

Название сорта	Происхождение
Сары Турш	Азербайджан
Эйуби	Азербайджан
Гара Турш	Азербайджан
Шихы Джаны	Азербайджан
Нойут	Азербайджан
Гала	АСW, Швейцария
Голден Делишес	АСW, Швейцария
Присцилла	INRA, Франция
04214-79, Антоновка APF22	Россия
B45	Исследования растений и продуктов питания, Германия
TSR33T239	INRA
Дурелло ди Форли	Италия
Дюльменер Розенапфель	Германия
9-AR2T196	INRA, Франция
TSR34T15	АСW, Швейцария
Hansen's baccata#2	АСW, Швейцария
<i>M.baccata jackii</i> 2010	АСW, Швейцария
A723-6	АСW, Швейцария
J34	Исследования растений и продуктов питания, Германия
GMAL2473	АСW, Швейцария
Q71	Исследования растений и продуктов питания, Германия
<i>M. × floribunda</i> 821	Германия
06005-55	Германия
06006-8	Германия
06006-57	Германия

**Выделение ДНК, ПЦР и анализ фрагментов.** Общая ДНК была извлечена из свежих молодых листьев (100 мг) с использованием набора QIAGEN® DNeasy (Qiagen, Германия) с учетом рекомендаций производителя. Чтобы определить качество и концентрацию всей полученной ДНК, 20 мкл образцов ДНК и стандартный диапазон (50 нг, 100 нг, 200 нг, 400 нг) определяли количественно в 1,0 %-ном агарозном геле в течение 20 минут при 120 В (вольт) и окрашивали с помощью этидиум бромид. Оценку проводили с использованием системы Image ChemiDoc XRS + (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Образцы ДНК с достаточной чистотой (A260/A280 = 1,80–2,00) и концентрацией (~300–950 нг/мкл) были использованы для ПЦР.

ДНК подвергали скринингу 30 парами геноспецифических праймеров. Последовательности праймеров молекулярных маркеров, использованные в нашем исследовании, приведены в таблице 3.

Таблица 3. Список праймеров и их последовательности, использованные для амплификации генов устойчивости к парше и мучнистой росе

Название маркера	Ген	Размер аллелей (п.н.)	Последовательность нуклеотидов (F + R)	Литература
Vg15_SSR	<i>Rvi1</i>	110	5'-TCGTGCAAGAAGCAA ATAGC-3' 5'-TGGGTTATAATCAAA CCATCCA-3'	V. Cova и др., (2015), [22]
Vg12_SSR	<i>Rvi1</i>	110	5'-GCTGGGGTTGTTGGA AATAG-3' 5'-TCATCCAAACAAGCA AAACCT-3'	
CH05e03	<i>Rvi2, Rvi4, Rvi9, Rvi11</i>	163, 173, 160	5'-CGAATATTTTCACTCT GACTGGG-3' 5'-CAAGTTGTTGACTGC TCCGAC-3'	V. Bus и др., 2005, [23] M. Gyga и др., 2004, [6] A. Patocchi и др., 2009, [11]
CH02b10	<i>Rvi2, Rvi4, Rvi15</i>	122–125	5'-CAAGGAAATCATCAA AGATTCAAG-3' 5'-CAAGTGGCTTCGGAT AGTTG-3'	V. Bus и др., 2005, [11]

Название маркера	Ген	Размер аллелей (п.н.)	Последовательность нуклеотидов (F + R)	Литература
OPL19 SCAR	<i>Rvi2</i> , <i>Rvi8</i>	430	5'-ACCTGCACTACAATCT TCACT AATC-3' 5'ACTCGTTTCCACTGAGGAT ATTTG-3'	V. Bus et. al., 2005, [13] A. Patocchi et. al., 2009, [11]
Hi08e04	<i>Rvi3</i>	214?	5'-GCATGGTGGCCTTTC TAAG-3' 5'-GTTTACCCTCTGACTC AACCCAAC-3'	<a href="https://sites.unimi.it/camelot/hidras/HiDRAS-SSRdb/pages/marker_display.php?SelectedSSR=Hi08e04">https://sites.unimi.it/camelot/hidras/HiDRAS-SSRdb/pages/marker_display.php?SelectedSSR=Hi08e04</a>
Vr2C5' UTR	<i>Rvi4</i> , <i>Rvi15</i>	521	5'-ATTCATGAGGTCAGC ACCCTC-3' 5'-GCGTAGGCATCAGATA GGACC-3'	H. Flachowsky, Julius Kühn-Institut (JKI) Dresden, Germany
CH02c02a	<i>Rvi4</i> , <i>Rvi15</i>	176–183	5'-CTTCAAGTTCAGCAT CAAGACAA-3' 5'-TAGGGCACACTTGCT GGTC-3'	V. Bus и др., 2005a, [23] A. Patocchi и др., 2009, [11]
Hi07h02	<i>Rvi5</i>	226	5'-ATTTGGGGTTTCAAC AATGG-3' 5'-GTTTCGGACATCAAA CAAATGTGC-3'	A. Patocchi и др., 2009, [11]
FMACH_VM3	<i>Rvi5</i>	355	5'-GTTCCCTGCAGTTTCA TGGT-3' 5'-CTAGCATTGGCCTCA GATCC-3'	V. Cova и др., 2015, [22]
FMACH_VM2	<i>Rvi5</i>	158	5'-TGGTGAAAGAAAATA TGCCAAG-3' 5'-TCCATTTCTCCATTG GTGTT-3'	V. Cova и др., 2015, [22]
CH-Vf1 <i>Rvi17</i> CH-Vf1c <i>Rvi19</i>	<i>Rvi6</i> , <i>Rvi17</i> , <i>Rvi19</i>	139–159	5'-ATCACCACCAGCAGC AAAG-3' 5'-CATACAAATCAAAGC ACAA CCC-3'	B. Vinatzer и др., 2004, [24] A. Patocchi и др., 2009, [11] V. Bus и др., 2011, [14]
OPB18 SCAR	<i>Rvi8</i>	799	5'-CCACAGCAGTCATTG GGA-3' 5'-CCACAGCAGTGCATA AAC-3'	V. Bus и др., 2005, [23]
CH03d01	<i>Rvi9</i> , <i>Rvi11</i>	115	5'-CGCACCACAAATCCA ACTC-3' 5'-AGAGTCAGAAGCACA GCCTC-3'	M. Gygaх и др., 2004, [6]
T6SCAR	<i>Rvi11</i>	410	5'-CGTTCAACTCATAAG TGGT CCC-3' 5'-AAGGGCAGAATCATA AAAGCC-3'	M. Gygaх и др., 2004, [6]
SSR23.03	<i>Rvi12</i>	106	5'-CAGTGCTGGCTTTAAG TTTGG -3' 5'-AATACAACGCCAGAT GAGAG G-3'	S. Padmarasu и др., 2014, [25]
SSR-24.91	<i>Rvi12</i>	209	5'-CTTGCTAGGGTTGTGC TTGG-3' 5'-CCACATAAAAGAAAG CCTTGG-3'	S. Padmarasu и др., 2014, [25]
SSR-23.17	<i>Rvi12</i>	242	5'-GTTGCCCGTTAGAATT TTGC-3' 5'-CTAGTGTAGTGTGTG GGTGTGG-3'	
CH02c06	<i>Rvi12</i>	248	5'-TGACGAAATCCACTA CTAATGCA-3' 5'-GATTGCGCGCTTTTT AACAT-3'	L. Gianfranceschi и др., 1998, [26]
CH02b07	<i>Rvi13</i>	120	5'-CCAGACAAGTCATCA CAACACTC-3' 5'-ATGTCGATGTCGCTCT GTTG-3'	S. Tartarini и др., 2004, [18] A. Patocchi и др., 2009, [11]
CH04f03	<i>Rvi13</i>	191	5'-CTTGCCCTAGCTTCA AATGC-3' 5'-TCGATCCGGTTAGGTT TCTG-3'	S. Tartarini и др., 2004, [18] A. Patocchi и др., 2009, [11]
HB09	<i>Rvi14</i>	210	5'GCTCAAATACTGAAGCC TTGC-3' 5'-GGGGAAGCAGGATGG TTACT-3'	V. Soufflet-Freslon и др., 2008, [19] A. Patocchi и др., 2009, [11]
CH02f06	<i>Rvi15</i>	152	5'-CCCTCTTCAGACCTG CATATG-3' 5'-ACTGTTTCCAAGCGC TCAGG-3'	A. Patocchi и др., 2004, [20] A. Patocchi и др., 2009, [11]
NZmsCN 943818	<i>Rvi16</i>	198	5'-CGGGAAGAGGAAAT GTGATT-3' 5'-TGAACAGCTCATCGT CCGTA-3'	V. Bus и др., 2010, [27] J. Celton и др., 2009, [28]

Название маркера	Ген	Размер аллелей (п.н.)	Последовательность нуклеотидов (F + R)	Литература
NH030a	<i>Rvi16</i>	210	5'-GCAACAGATAGGAG CAAAGAGGC-3' 5'-TCCAAAGTTCAACAC AGATCAAGAG-3'	V. Bus и др., 2010, [27] T. Yamamoto и др., 2002, [29] J. Celton и др., 2009, [28]
<i>Rvi18</i> -SSR	<i>Rvi18</i>	478	5'-GGTTTTTCATTCTTGCA TGAGG -3' 5'-GTTTTTCGACGAACTC CТААСТ TCACC-3'	J. Soriano и др., 2014, [21]
AT20-450 SCAR	<i>Pl1</i>	450	5'-ATCAGCCCCACATGA ATCTCATACC-3' 5'-ACATCAGCCCTCAAA GATGAGAAGT-3'	T. Markussen и др., 1995, [30] J. Frey и др., 2004, [31]
CH02d12	<i>Plm</i>	205	5'-AACCAGATTTGCTTG CCATC-3' 5'-GCTGGTGGTAAACGT GGTG-3'	S. Gardiner и др., 2003, [32]
CH03c02	<i>Pld</i>	133	5'-TCACTATTTACGGGA TCAAGCA -3' 5'-GTGCAGAGTCTTTGA CAAGGC-3'	C. James и др., 2004, [33] N. Seglias и др., 1997, [34]
Pl2_F/R	Pl2	252	5'-CTGCTCTTCCACATG TACCT-3' 5'-TAAGAGCACTGTTCT TAGTGG-3'	

Шесть мультиплексных смешанных флуоресцентных маркеров (100 мМ) были подготовлены для работы на ABI 3500 XL (генетический анализатор ДНК Hitachi, Япония) (<https://www.esprg.cgiar.org>). Протоколы для каждой мультиплексной ПЦР были получены с использованием набора для микросателлитной ПЦР Type-it (Qiagen, Германия). Для каждого образца готовили раствор, состоящий из 1хММ (мастер-микс), 1 мМ Q-раствора (Q), 1 мМ мультиплексной смеси, 1 мкл ddH<sub>2</sub>O и 2 мкл ДНК. Использовали следующие условия ПЦР: начальная денатурация при 95 °С в течение 5 мин, затем 40 циклов при 95 °С в течение 30 с, 58 °С в течение 1 мин 30 с и 72 °С в течение 1 мин, затем 60 °С в течение 30 мин и окончательное удлинение при 60 °С в течение 30 мин. Амплификации проводили в градиентной ПЦР на амплификаторе Thermal Cycler (FlexCycler, Analytic Jena). Анализ фрагментов проводили на капиллярном секвенаторе ABI 3500XL (Applied Biosystems) в соответствии с инструкциями производителя, 1 мкл ПЦР продукта разводили с 8,95 мкл формамида HiDi, 0,05 мкл 600-LIZ (Applied Biosystems) и денатурировали в течение 5 мин при 95 °С. После секвенирования был проведен анализ генотипа с использованием программного пакета GeneMapper® 5.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В наших исследованиях мы применяли молекулярные маркеры для выявления генов устойчивости к парше и мучнистой росе яблони в 27 сортах.

Для идентификации гена устойчивости к парше *Rvi1* использовали молекулярные маркеры Vg12\_SSR и Vg15\_SSR, которые были разработаны V. Cova и др. [22]. Данные маркеры картированы в группе сцепления 12-й хромосомы генома яблони и находятся на расстоянии 0,12 сМ от *Rvi1*. Этот ген устойчивости к парше был выявлен у 3 сортов яблони Азербайджана: Гызыл Ахмеди, Эйуби, Нойут и коллекционных сортов-эталонов Gala и Golden Delicious (табл. 4).

Гены *Rvi2* и *Rvi4* определяются маркером CH02b10, который разработан V. Bus и др. (2005). Маркер картирован в группе сцепления 2-й хромосомы и был обнаружен в устойчивом к парше сорте TSR34T15. Молекулярные SSR-маркеры CH05e03 и CH03d01 были разработаны M. Gygaх и другими [6] для идентификации гена *Rvi11*, они картированы на 2-й хромосоме [17]. Маркер CH05e03 находится в 0,6 сМ от гена *Rvi11*. С помощью данного маркера идентифицируют не только *Rvi11*, но и гены устойчивости к парше *Rvi2*, *Rvi4*, *Rvi9*, которые были обнаружены у 4 образцов яблони TSR34T15, TSR33T239, J34, *M. baccata* jackii. А молекулярный маркер CH03d01 генов устойчивости к парше *Rvi9* и *Rvi11* был выявлен у двух образцов яблони – В 45 и Hansen's baccata#2.

Таблица 4. Обнаружение молекулярных маркеров (SSR и SCAR) генов устойчивости у сортов яблони

Название сортов	Маркер устойчивости к парше																								
	CH02c02a	Н107h02	P12_E/R	НВ09	OPL19SCAR	FMACH_VM3	V2C5'UTR	CH03d01	SSR-24.91	CH02f06	SSR-23.17	FMACH_VM2	CH-Vf1	CH02b07	AT20Scar	CH02b10	CH04f03	OPB18SCAR	CH02c06	CH05c03	CH02d12	Vg15_SSR	Vg12_SSR	Н108c04	
Гызыл Ахмеди	+		+		+					+															
Джир Гаджи	+				+				+																
Сары Турш	+				+					+															
Эйуби	+				+					+															
Гара Турш	+				+					+															
Шихы Джаны	+				+					+															
Нойут					+																				
Gala			+																						
Golden Delicious																									
TSR34T15			+		+					+															
Q71 (Geneva x Braeburn)			+		+					+															
TSR33T239	+		+							+															
9-AR2T196			+							+															
Priscilla			+							+															
M. x floribunda 821			+							+															
B45			+		+																				
I34			+							+															
A723-6			+																						
Hansen `s baccata#2			+																						
M.baccata jackii from 2010			+																						
Durello di Forli			+																						
Dülmener Rosenapfel			+																						
GMAL2473	+		+							+															
04214-79,			+																						
Антоновка APF22			+																						
06005-55			+																						
06006-8			+																						
06006-57			+																						

Гены устойчивости к парше *Rvi2* и *Rvi8* были картированы на хромосоме LG2 [8]. Для этих основных генов был разработан V. Bus и другими [13] маркер OPL19SCAR, который был обнаружен у 2 устойчивых к парше эталонных образцов TSR34T15 и B45 и у исследованных местных азербайджанских сортов. Маркер Hi08e04 был использован для идентификации гена *Rvi3* и был обнаружен у местных азербайджанских сортов Эйуби и Нойут (табл. 4) и в устойчивом к парше образце Q71 (Geneva × Brabern).

Молекулярные маркеры FMACH\_VM2 и FMACH\_VM3 были разработаны для *Rvi5* V. Cova и др. [22]. A. Patocchi и другие [11] для этого же гена разработали маркер Hi07h02. Ген *Rvi5* был обнаружен в устойчивом к парше сорте 9-AR2T196 с применением обоих маркеров.

Маркер CH-Vf1 гена устойчивости к парше *Rvi6* был обнаружен только у образцов Priscilla, *Malus × floribunda* 821 и Antonovka APF22. Эти молекулярные маркеры были разработаны B. Vinatzer и др. [24]. Согласно предоставленной информации C. Gessler и др. [35], гены устойчивости к парше *Rvi6* и *Rvi17* расположены очень близко на хромосоме 1 (LG1). J. Patzak и другие [36] не обнаружили молекулярный маркер гена устойчивости *Rvi17* у устойчивого к парше сорта Антоновка. Согласно их информации, реакция между молекулярными маркерами гена устойчивости *Rvi6* и гена устойчивости *Rvi17* не была подтверждена.

Маркер OPB18SCAR был разработан для *Rvi8* V. Bus и др. [23]. Этот SCAR маркер был обнаружен в устойчивом к парше образце B45. Молекулярные маркеры SSR-23.17 и SSR-24.91 были разработаны для гена *Rvi12* S. Padmarasu и др. [25], который был обнаружен только у одного генотипа (Hansen's baccata). В этом же генотипе ген *Rvi12* был выявлен и маркером CH02c06.

Маркер CH04f03 был разработан для гена *Rvi13* S. Tartarini и др. [18], картирован на 10-й хромосоме яблони [12]. С помощью данного маркера был обнаружен ген устойчивости к парше *Rvi13* у сорта Durello di Forli. В то же время ген устойчивости к парше *Rvi13* выявлен молекулярным маркером CH02b07 в 5 устойчивых к парше сортах: Priscilla, J34, Durello di Forli, Dülmener Rosenapfel, 04214-79. Наши результаты отличались от опубликованных данных для ранее изученного сорта Durello di Forli [12, 18]. В нашем исследовании маркер CH02b07 амплифицирован двумя фрагментами 111 bp и 126 bp в упомянутом сорте.

Ген *Rvi14* был обнаружен маркером HB09 в устойчивом к парше сорте Dülmener Rosenapfel. Молекулярные маркеры CH02f06, Vr2C5'UTR и CH02c02a были разработаны A. Patocchi и др. [20]. Молекулярный маркер CH02f06 гена устойчивости к парше *Rvi15* был обнаружен у 11 сортов: Гызыл Ахмеди, Джир Гаджи, Сары Турш, Эйуби, Гара Турш, Шихы Джаны, TSR34T15, TSR33T239, Присцилла, J34, GMAL2473. Маркер CH02c02a генов устойчивости к парше *Rvi4* и *Rvi15* был обнаружен у восьми образцов: Гызыл Ахмеди, Джир Гаджи, Сары Турш, Эйуби, Гара Турш, Шихы Джаны, TSR33T239, GMAL2473. Эти же гены *Rvi4* и *Rvi15* были обнаружены маркером Vr2C5'UTR у двух устойчивых к парше образцов TSR33T239 и GMAL2473.

Молекулярный маркер Pl2\_F/R гена устойчивости к мучнистой росе *Pl 2* был обнаружен у 20 генотипов яблони, но молекулярный маркер CH02d12 гена устойчивости к мучнистой росе *Plm* был идентифицирован у генотипов яблони 06006-8 и 06006-57. Молекулярный маркер AT20Scar гена устойчивости к мучнистой росе *Pl1* был обнаружен в образцах: J34, Hansen's baccata, 06005-55, 06006-8, 06006-57.

Молекулярные маркеры SSR-23.03, Rvi18-SSR, T6, NZmsCN943818 NH030a генов устойчивости к парше *Rvi12*, *Rvi18*, *Rvi11*, *Rvi16* и маркер CH03c02 гена устойчивости к мучнистой росе *Pl-d* не были обнаружены в наших исследованных образцах. Некоторые маркеры не позволили найти различие между устойчивыми и восприимчивыми сортами. Мы полагаем, что изученные устойчивые сорта можно использовать в селекции сортов новой генерации, применяя молекулярные маркеры для идентификации генов устойчивости к парше.

## ВЫВОДЫ

Наша страна занимает важное место с точки зрения генетических ресурсов яблони. Полученные результаты показывают, что в местных сортах Азербайджана наблюдается вариабельность устойчивости генотипов по отношению к патогену. Создание качественных сортов

яблони, подходящих для товарного производства, созревающих в разные сроки и устойчивых к распространенным болезням, таким как парша и мучнистая роса, обеспечит высокую добавленную стоимость для экономики страны и принесет пользу окружающей среде и здоровью человека. В будущем новые источники устойчивости могут быть использованы в селекционных программах.

### ПРИЗНАТЕЛЬНОСТЬ

Это исследование было проведено при финансовой поддержке Международного фонда сельскохозяйственного развития (IFAD). Выражаю огромную благодарность доктору Ильхаму Гурбанову, доктору Вахиду Алиеву, Ханмеду Мамедову за предоставление финансовой поддержки во время учебы в Германии, а также огромную благодарность за сотрудничество Институту селекционных исследований по плодовым культурам, доктору Андреас Пейл, доктору Кристине Грейф, госпоже Гизеле Шульц, госпоже Кэролайн Мелциг и госпоже Инес Хиллер за помощь в выполнении основных задач исследовательского проекта. Благодарю за помощь проф. др. Сарп Кайя Университета Акдениз, доктора философии Аманулла Белудж Университета Хуачжун Сельскохозяйственный, а также Турал Алиева, Камала Ханкишиева, Замина Сархадова, Бахар Эльдарова за подготовку растительного материала.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Kaymak, S. Apple scab disease caused by *Venturia inaequalis* [(Cooke) G. Winter1875] Turkey isolates determination of molecular characterization and pathogenicity : Ph.D Thesis. – Konya, 2012. – 122 p.
2. Jafarov, İ. Agricultural Phytopathology / İ. Jafarov. – Baku : Science publishing house, 2001. – 277 p.
3. Janick, J. Fruit breeding / ed. J. Janick, J. N. Moore // New York, USA : Tree and Tropical Fruits. – 1996. – Vol. 1. – 77 p.
4. Williams, E. B. A new physiologic race of *Venturia inaequalis*, incitant of apple scab / E. B. Williams, A. G. Brown // Plant Disease Reporter. – 1968. – 52 (10). – P. 799–801.
5. Williams, E. Resistance in *Malus* to *Venturia inaequalis* / E. Williams, J. Kuc // Annual Review of Phytopathology. – 1969. – 7. – P. 223–246.
6. Molecular markers linked to the apple scab resistance gene *Vbj* derived from *Malus baccata* jackii / M. Gyga [et al.] // Journal of Theoretical and Applied Genetics. – 2004. – 109(8). – P. 1702–1709. doi: 10.1007/s00122-004-1803-9.
7. A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the *Vf* gene / L. Parisi [et al.] // Phytopathology. – 1993. – 83(5). – P. 533–537.
8. Schorfresistente Sorten: Nach wie vor ein wichtiger Baustein zur nachhaltigen Obstproduktion / A. Peil [et al.] // Obstbau. – 2014. – 39. – S. 131.
9. Breeding elite lines of apple carrying pyramided homozygous resistance genes against apple scab and resistance against powdery mildew and fire blight / I. O. Baumgartner [et al.] // Plant Molecular Biology Reporter. – 2015. – 33 (5). – P. 1573–1583. doi:10.1007/s11105-015-0858-x.
10. Resistance breeding in apple at Dresden-Pillnitz / A. Peil [et al.] // In: Weinsberg FÖOEV, ed. Proceedings of the 13<sup>th</sup> International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing. – 2008. – 220 (5). – P. 220–225.
11. Development and test of 21 multiplex PCRs composed of SSRs spanning most of the apple genome / A. Patocchi [et al.] // Tree Genetics & Genomes. – 2009. – 5. – P. 211–223.
12. Identification by genome scanning approach (GSA) of a microsatellite tightly associated with the apple scab resistance gene *Vm* / A. Patocchi [et al.] // Tree Genetics & Genomes. – 2005. – 48(4). – P. 630–636.
13. The *Vh2* and *Vh4* scab resistance genes in two differential hosts derived from Russian apple R12740-7A map to the same linkage group of apple / V.G.M. Bus [et al.] // Molecular Breeding. – 2005b. – 15 (1). – P. 103–116. doi: 10.1007/s11032-004-3609-5.
14. Revision of nomenclature of the differential host-pathogen interactions of *Venturia inaequalis* and *Malus* / V. G. M. Bus [et al.] // Annual Review of Phytopathology. – 2011. – 49. – P. 391–413. doi: 10.1146/annurev-phyto-072910-095339.
15. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers / C. Maliepaard [et al.] // TAG Theoretical and Applied Genetics. – 1998. – 97 (1). – P. 60–73.
16. Identification and mapping of markers for resistance to apple scab from ‘Antonovka’ and ‘Hansen’s baccata#2’ / M. Hemmat [et al.] // Journal of Acta Horticulturae. – 2003. – 622. – P. 153–161. doi: 10.17660/ActaHortic.2003.622.13.
17. Mapping of the apple scab-resistance gene *Vb* / N. Erdin [et al.] // Tree Genetics & Genomes. – 2006. – 49 (10). – P. 1238–1245.
18. Characterisation and genetic mapping of a major scab resistance gene from the old Italian apple cultivar ‘Durello di Forlì’ / S. Tartarini [et al.] // Acta Horticulturae. – 2004. – 663. – P. 129–134.
19. Inheritance studies of apple scab resistance and identification of *Rvi14*, a new major gene that acts together with other broad-spectrum QTL / V. Soufflet-Freslon [et al.] // Tree Genetics & Genomes. – 2008. – 51 (8). – P. 657–667.

20. *Vr(2)*: a new apple scab resistance gene / A. Patocchi [et al.] // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2004. – 109 (5). – P. 1087–1092.
21. Fine mapping of the gene *Rvi18* (*V25*) for broad-spectrum resistance to apple scab, and development of a linked SSR marker suitable for marker-assisted breeding / J. M. Soriano [et al.] // *Molecular breeding*. – 2014. – 34 (4). – P. 2021–2032.
22. High-resolution genetic and physical map of the *Rvi1* (*Vg*) apple scab resistance locus / V. Cova [et al.] // *Molecular Breeding*. – 2015. – 35 (16). – P. 1–13. doi: 10.1007/s11032-015-0245-1.
23. 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 / V. G. M. Bus [et al.] // *New Phytologist*. – 2005a. – 166 (3). – P. 1035–1049. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01395.x.
24. Isolation of two microsatellite markers from BAC clones of the *Vf* scab resistance region and molecular characterization of scab resistant accessions in *Malus* germplasm / B. A. Vinatzer [et al.] // *Journal of Plant Breeding*. – 2004. – 123. – P. 312–326.
25. Fine-mapping of the apple scab resistance locus *Rvi12* (*Vb*) derived from ‘Hansen’s baccata#2’ / S. Padmarasu [et al.] // *Mol Breeding*. – 2014. – 34. – P. 2119–2129. doi: 10.1007/s11032-014-0167-3.
26. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple / L. Gianfranceschi [et al.] // *Journal of Plant Pathology*. – 1998. – 96. – P. 1069–1076.
27. Genome mapping of an apple scab, a powdery mildew and a woolly apple aphid resistance gene from open-pollinated Mildew Immune Selection / V. G. M. Bus [et al.] // *Tree Genetics & Genomes*. – 2010. – 6. – P. 470–477. doi:10.1007/s11295-009-0265-2.
28. Construction of a dense genetic linkage map for apple rootstocks using SSRs developed from *Malus* ESTs and *Pyrus* genomic sequences / J. M. Celton [et al.] // *In Tree Genetics & Genomes*. – 2009. – 5 (1). – P. 93–107. doi: 10.1007/s11295-008-0171-z.
29. Genetic linkage maps constructed by using an interspecific cross between Japanese and European pears / T. Yamamoto [et al.] // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2002. – 106. – P. 9–18.
30. Identification of PCR-based markers linked to the powdery-mildew resistance gene *Pl1* from *Malus robusta* in cultivated apple / T. Markussen [et al.] // *Plant Breeding*. – 1995. – 114. – P. 530–534. doi.org/10.1111/j.1439-0523.1995.tb00850.x.
31. Efficient low-cost DNA extraction and multiplex fluorescent PCR method for marker-assisted selection in breeding / J. E. Frey [et al.] // *Plant Breeding*. – 2004. – 123. – P. 554–557.
32. Candidate resistance genes from an EST database prove a rich source of markers for major genes conferring resistance to important apple pests and diseases / S. E. Gardiner [et al.] // *Acta Horticulturae*. – 2003. – 622. – P. 141–151.
33. James, C. M. Identification of molecular markers linked to the mildew resistance genes *Pl-d* and *Pl-w* in apple / C. M. James, K. M. Evans // *Acta Horticulturae*. – 2004. – 663. – P. 123–127. doi.org/10.1007/s00122-004-1836-0.
34. Seglias, N. Genetics of apple powdery mildew resistance from *Malus zumi* (*Pl2*) / N. Seglias, C. Gessler // *IOBC (WPRS) Bulletin: Integrated control of pome fruit diseases*. – 1997. – 20. – P. 195–208.
35. *Venturia inaequalis* Resistance in Apple / C. Gessler [et al.] // *Critical Reviews in Plant Sciences*. – 2006. – 25. – P. 473–503.
36. Patzak, J. Identification of Apple Scab and Powdery Mildew Resistance Genes in Czech Apple (*Malus × domestica*) Genetic Resources by PCR Molecular Markers / J. Patzak, F. Paprštejn, A. Henychová // *Czech J. Genet. Plant Breed.* – 2011. – 47 (4). – P. 156–165.
37. Localisation of a major gene for apple scab resistance on the European genetic map of the Prima × Fiesta cross / C. Durel [et al.] // *IOBC wprs Bulletin*. – 2000. – 23(12). – P. 245–248.

## SCREENING FOR RESISTANCE OF LOCAL AZERBAIJAN APPLE VARIETIES TO *VENTURIA INAEQUALIS* (COOKE.)WINT. AND *PODOSPHAERA LEUCOTRICHA* SALM. PATHOGEN USING MOLECULAR MARKERS

E. M. KHANKISHIYEVA

### Summary

In this study, using molecular approaches, we evaluated the resistance to the pathogen *Venturia inaequalis* (Cooke.)Wint. of some local apple varieties growing in Azerbaijan. Twenty seven molecular markers of scab resistance genes and three powdery mildew resistance markers were used. Twenty collection apple varieties of the JKI Institute, Dresden, Germany, resistant to scab and seven local apple varieties growing in Azerbaijan were used as objects.

Molecular markers SSR-23.03, *Rvi18*-SSR, T6, NZmsCN943818 and NH030a of the scab resistance genes *Rvi12*, *Rvi18*, *Rvi11*, *Rvi16*, and CH03c02 of the powdery mildew resistance gene *Pl-d* were not found in any of the studied local varieties. 30 molecular markers used to test resistance genes for *V.inaequalis* and *P.leucotricha* can be used for introgression and pyramidization of resistance genes in the national apple selection program in Azerbaijan.

*Keywords:* molecular markers, apple varieties, resistance genes, *Venturia inaequalis*, *Podosphaera leucotricha*, Azerbaijan.

*Поступила в редакцию 27.05.2020 г.*