

А. С. Лыжин, Н. Н. Савельева

Федеральный научный центр им. И. В. Мичурина, Мичуринск, Тамбовская область, Россия

## ПОЛИМОРФИЗМ ДИКОРАСТУЩИХ ВИДОВ р. *Malus* MILL. ПО ГЕНАМ УСТОЙЧИВОСТИ К МУЧНИСТОЙ РОСЕ

**Аннотация:** Мучнистая роса (*Podosphaera leucotricha* (Ell. E tEv.) Salm.) – одно из наиболее распространенных заболеваний яблони в мире. Важным этапом успешной селекционной работы по созданию устойчивых к мучнистой росе сортов яблони является идентификация исходных форм, несущих гены устойчивости. Применение диагностических ДНК маркеров целевых генов повысит надежность идентификации и эффективность селекционного процесса по созданию устойчивых генотипов яблони. Цель настоящего исследования – молекулярно-генетическое тестирование дикорастущих видов р. *Malus* Mill. по генам *Pl-1*, *Pl-w* и *Pl-d* устойчивости к мучнистой росе для выявления полиморфизма изучаемых локусов и идентификации перспективных для селекции форм. Объектами исследования являлись дикорастущие виды р. *Malus* Mill. различного эколого-географического происхождения. Для идентификации гена *Pl-1* использовали маркер AT20-SCAR, гена *Pl-w* – маркер EM M02, гена *Pl-d* – маркер EM DM01. Маркер AT20-SCAR (ген *Pl-1*) идентифицирован у 37,3 % генотипов. Маркер EM M02 (ген *Pl-w*) выявлен у 16,4 % изучаемых форм. Маркер EM DM01 (ген *Pl-d*) присутствует у 10,4 % проанализированных форм. У 52,2 % анализируемых дикорастущих форм яблони в геноме присутствует хотя бы один из изучаемых молекулярных маркеров. Ген *Pl-1* наиболее распространен у ягодных яблонь (серия *Baccatae*), ген *Pl-w* – у ягодных яблонь (серия *Baccatae*) и яблонь Зибольда (серия *Sieboldinae*), ген *Pl-d* – у восточных яблонь (серия *Orientalis*). Дикорастущие формы *M. baccata* 2319, *M. mandshurica* 41947, *M. sachalinensis* 85, *M. sachalinensis* 97, *M. purpurea* v. *pendula* 2396 характеризуются сочетанием генов *Pl-1* и *Pl-w*; *M. turkmenorum* 13283, *M. turkmenorum* 29421 – генов *Pl-1* и *Pl-d*; *M. denticulata* 29416 – генов *Pl-w* и *Pl-d*, что позволяет рекомендовать их в качестве перспективных комплексных источников высокой устойчивости к мучнистой росе для селекции.

**Ключевые слова:** яблоня, дикорастущие виды, мучнистая роса, устойчивость, молекулярные маркеры, гены *Pl-1*, *Pl-w*, *Pl-d*

**Для цитирования:** Лыжин, А. С. Полиморфизм дикорастущих видов р. *Malus* Mill. по генам устойчивости к мучнистой росе / А. С. Лыжин, Н. Н. Савельева // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. аграр. наук. – 2021. – Т. 59, № 1. – С. 62–70. <https://doi.org/10.29235/1817-7204-2021-59-1-62-70>

Alexander S. Lyzhin, Natalya N. Savel'eva

I. V. Michurin Federal Science Center, Michurinsk, Russia

## POLYMORPHISM OF WILD SPECIES OF р. *Malus* MILL. ACCORDING TO POWDERY MILDEW RESISTANCE GENES

**Abstract:** Powdery mildew (*Podosphaera leucotricha* (Ell. E tEv.) Salm.) – is one of the most widespread apple diseases in world. Identification of forms, carrying resistance genes, is an important stage in breeding programs aimed at obtaining powdery mildew resistant apple varieties. Diagnostic DNA markers of target genes will increase reliability of identification and efficiency of apple breeding for the creation of resistant genotypes. The purpose of this study was molecular genetic testing of wild species of genus *Malus* Mill. According to *Pl-1*, *Pl-w* and *Pl-d* powdery mildew resistance genes for revealing polymorphism of the studied loci and identification of valuable genotypes for breeding. The study subjects were the wild species of genus *Malus* Mill. of different ecological and geographic origin. The *Pl-1* gene was identified using AT20-SCAR marker, *Pl-w* gene - EM M02 marker, *Pl-d* gene - EM DM01 marker. AT20-SCAR marker (*Pl-1* gene) was identified in 37.3 % of genotypes. EM M02 marker (*Pl-w* gene) was detected in 16.4 % of the studied forms. EM DM01 marker (*Pl-d* gene) is present in 10.4 % of the analyzed forms. At least one of the studied molecular markers is present in the genome of 52.2 % of apple wild species. The *Pl-1* gene in apple wild species is most spread in *Baccatae* series, the *Pl-w* gene - in *Baccatae* and *Sieboldinae* series, the *Pl-d* gene - in *Orientalis* series. Wild species *M. baccata* 2319, *M. mandshurica* 41947, *M. sachalinensis* 85, *M. sachalinensis* 97, *M. purpurea* v. *pendula* 2396 are characterized by combination of *Pl-1* and *Pl-w* genes; *M. turkmenorum* 13283 and *M. turkmenorum* 29421 - *Pl-1* and *Pl-d* genes; *M. denticulata* 29416 - *Pl-w* and *Pl-d* genes, which allows to recommend them as promising complex sources of high powdery mildew resistance for breeding.

**Keywords:** apple, wild species, powdery mildew, resistance, molecular markers, *Pl-1*, *Pl-w*, *Pl-d* genes

**For citation:** Lyzhin A. S., Savel'eva N. N. Polymorphism of wild species of p. *Malus* MILL. according to powdery mildew resistance genes. *Vesti Natsyonal'noy akademii nauk Belarusi. Seriya agrarnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Agrarian series*, 2021, vol. 59, no 1, pp. 62-70 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1817-7204-2021-59-1-62-70>

**Введение.** Мучнистая роса, возбудителем которой является облигатный биотрофный гриб *Podosphaera leucotricha* (Ell. & tEv.) Salm. – одно из наиболее распространенных заболеваний яблони в мире [1, 2]. Первичное инфицирование вызывается перезимовавшим в вегетативных тканях или инфицированных цветочных почках мицелием, который в благоприятных условиях активно колонизирует молодые развивающиеся побеги. В дальнейшем на мицелии образуются споры, служащие источником вторичной инфекции [3]. *P. leucotricha* поражает листья, соцветия, молодые побеги. Пораженные листья скручиваются, буреют и опадают, побеги замедляют рост, искривляются, соцветия и цветки деформируются и отмирают. Наиболее сильно патоген поражает активно растущие сеянцы и саженцы в питомниках [4, 5] Потери товарного урожая яблок в годы эпифитотийного развития мучнистой росы в насаждениях яблони могут достигать 50–80 % [6]. Большинство культивируемых в настоящее время сортов яблони отечественной и зарубежной селекции восприимчивы к мучнистой росе [5, 7].

Контроль распространения мучнистой росы в насаждениях яблони обеспечивается в первую очередь своевременным применением фунгицидов, обработка которыми может доходить до 18 раз за вегетационный период, а также соблюдением других агротехнических мероприятий [8, 9]. Однако широкое применение химических препаратов негативно сказывается на экологической обстановке, усиливает стрессовую нагрузку на ослабленные патогеном растения, а также требует значительных затрат финансовых и трудовых ресурсов [10, 11]. Кроме того, активное использование химических средств защиты растений противоречит мировой тенденции развития земледелия – его биологизации и экологизации [12–14]. При этом генетически детерминированная экологическая устойчивость сортов и форм растений становится необходимым условием экономически целесообразного возделывания сельскохозяйственных культур, а селекция – наиболее эффективным средством устойчивого роста величины и качества урожая [13].

Необходимым условием совершенствования сортимента яблони является углубление генетических исследований, комплексный анализ исходного материала, выявление закономерностей наследования и идентификация доноров хозяйственно ценных признаков, обуславливающих повышение эффективности селекционного процесса и создание генотипов с высоким уровнем экологической адаптации и товарно-потребительских качеств плодов.

Ценным исходным материалом в селекционной работе по совершенствованию сортимента яблони являются дикорастущие виды и разновидности р. *Malus* Mill. В частности, многие дикорастущие виды яблони являются источниками генов устойчивости ко многим заболеваниям: парше, мучнистой росе, бактериальному ожогу. Кроме того, некоторые виды яблони характеризуются устойчивостью к абиотическим стрессорам (низкие отрицательные температуры в зимний период, дефицит влаги на фоне высоких температур в период вегетации), а также высоким содержанием в плодах биологически активных веществ [15, 16].

До настоящего времени в селекции яблони наиболее активно используются успешные коммерческие сорта, что повышает вероятность отбора в потомстве ценных генотипов. Однако подобный подход приводит к снижению генетического разнообразия, а также появлению признаков инбредной депрессии в популяции яблони [17]. Интрогрессия генов дикорастущих видов в геноплазму культивируемых форм увеличит генетическое разнообразие и гетерогенность популяции яблони, позволит получить полиморфный гибридный фонд для создания на этой основе новых генотипов с комплексом ценных признаков.

Цель настоящего исследования – молекулярно-генетическое тестирование дикорастущих видов р. *Malus* Mill. по генам *Pl-1*, *Pl-w* и *Pl-d* устойчивости к мучнистой росе для выявления полиморфизма изучаемых локусов и идентификации перспективных для селекции форм.

**Материалы и методы исследования.** Биологическими объектами исследования являлись дикорастущие виды р. *Malus* Mill. различного эколого-географического происхождения. Контролем присутствия в геноме аллелей устойчивости к мучнистой росе являлась дикорастущая форма *M. robusta* K43199 (ген *Pl-1*), сорт White Angel (ген *Pl-w*), гибридная форма D12 (ген *Pl-d*).

Экстракция геномной ДНК была проведена из молодых листьев согласно протоколу Diversity Arrays Technology P/L<sup>1</sup>, позволяющему согласно проведенным ранее исследованиям [18, 19] получать экстракт геномной ДНК сортов и форм яблони, необходимой для постановки ПЦР концентрации и чистоты.

Для идентификации гена *Pl-1* использовали маркер AT20-SCAR [20], гена *Pl-w* – SCAR маркер EM M02 [21], гена *Pl-d* – SCAR маркер EM DM01 [22].

Праймеры были синтезированы в ЗАО «Синтол» (Москва, Россия) и имели следующую нуклеотидную последовательность:

1) маркер AT20-SCAR: AT20-for 5'-ATCAGCCCCACATGAATCTCATACC-3', AT20-rev: 5'-ACATCAGCCCTCAAAGATGAGAAGT-3';

2) маркер EM M02: For 5'-CTGCAGACTGTTTGTAAAGTTGG-3', Rev 5'-AACTCCTTGATTTCTCCTATTGTT-3';

3) маркер EM DM01: For 5'-AGGATAATAATCTATCTTGTAAAGG-3', Rev 5'-CCATTCAGCCCAACGAGT-3'.

Реакционная смесь для ПЦР объемом 15 мкл содержала: 20 нг геномной ДНК, 2,0 мМ dNTPs, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 пМ каждого праймера, 1 ед. Taq-полимеразы и 1,5 мМ 10x стандартного ПЦР-буфера (+ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, –KCl). Все компоненты произведены фирмой Thermo Fisher Scientific.

Аmplification проводили в термоциклере T100 («BIO-RAD», США) по следующим программам:

1) маркер AT20-SCAR: денатурация 94 °С – 5 мин, 35 циклов: 94 °С – 1 мин, 60 °С – 2 мин, 72 °С – 2 мин; финальная элонгация: 94 °С – 1 мин, 60 °С – 2 мин, 72 °С – 10 мин;

2) маркер EM M02: денатурация 94 °С – 2 мин 30 с, 35 циклов: 94 °С – 30 с, 56 °С – 45 с, 72 °С – 1 мин; финальная элонгация: 72 °С – 10 мин;

3) маркер EM DM01: денатурация 94 °С – 5 мин, 35 циклов: 94 °С – 30 с, 53 °С – 45 с, 72 °С – 1 мин; финальная элонгация: 72 °С – 6 мин.

Разделение ампликонов осуществляли методом электрофореза в агарозном геле (концентрация агарозы – 2 %, буферная система – 1x TBE (трис-боратный буфер), напряженность электрического поля при электрофорезе – 3,9–4,5 В/см.). Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали маркер молекулярного веса Gene Ruler 100bp DNA ladder (Thermo scientific) (0,1мкг/мкл).

**Результаты и их обсуждение.** К настоящему времени у яблони идентифицировано несколько неаллельных генов, детерминирующих устойчивость к различным физиологическим расам *P. leucotricha* – *Pl-1* (источник – *Malus robusta*), *Pl-2* (*M. zumi*), *Pl-d* (D12), *Pl-w* (White Angel), *Pl-mis* (Mildew immune selection) [20, 21].

Ген *Pl-1* картирован в кластере генов устойчивости на 12-й хромосоме. Для его идентификации разработан RAPD маркер OPAT20<sub>450</sub>, который впоследствии был конвертирован в SCAR маркер AT20. Маркер AT20-SCAR локализован на расстоянии 4,5 сМ от гена *Pl-1*. На электрофореграмме маркер AT20-SCAR представлен фрагментами размером 450 и 500 п.н. Аллель резистентности *Pl-1* соответствует целевой фрагмент маркера размером 450 п.н. Продукт размером 500 п.н. может амплифицироваться как у устойчивых, так и у восприимчивых к мучнистой росе по гену *Pl-1* генотипов яблони [23].

В анализируемой коллекции дикорастущих видов яблони маркер AT20-SCAR идентифицирован у 25 форм из 67, что составляет 37,3 % (пример идентификации приведен на рис. 1, а, результаты – в табл. 1).

Маркерный аллель гена *Pl-1* наиболее распространен у ягодных яблонь (серия *Baccatae*): из 19 проанализированных генотипов фрагмент размером 450 п.н. присутствует у 15 форм (78,9 %). В серии киргизские яблони (*Kirghisores*) маркер AT20-SCAR идентифицирован у 3 форм из 12, серии восточные яблони (*Orientalis*) – у 2 форм из 7, серии настоящие яблони (*Malus*) – у 1 формы (*M. prunifolia* 2454) из 13 проанализированных. Также маркерный аллель присутствует у некоторых форм из небольших по числу видов серий: *M. asiatica* 2343 (серия *Asiaticae*), *M. coronaria* (серия *Coronariae*), *M. florentina* (секция *Eriolobus*), *M. sikkimensis* (секция *Docyniopsis*).

<sup>1</sup> DArT, 2014 available at [http://www.diversityarrays.com/sites/default/files/resources/DaRT\\_DNA\\_isolation.pdf](http://www.diversityarrays.com/sites/default/files/resources/DaRT_DNA_isolation.pdf)

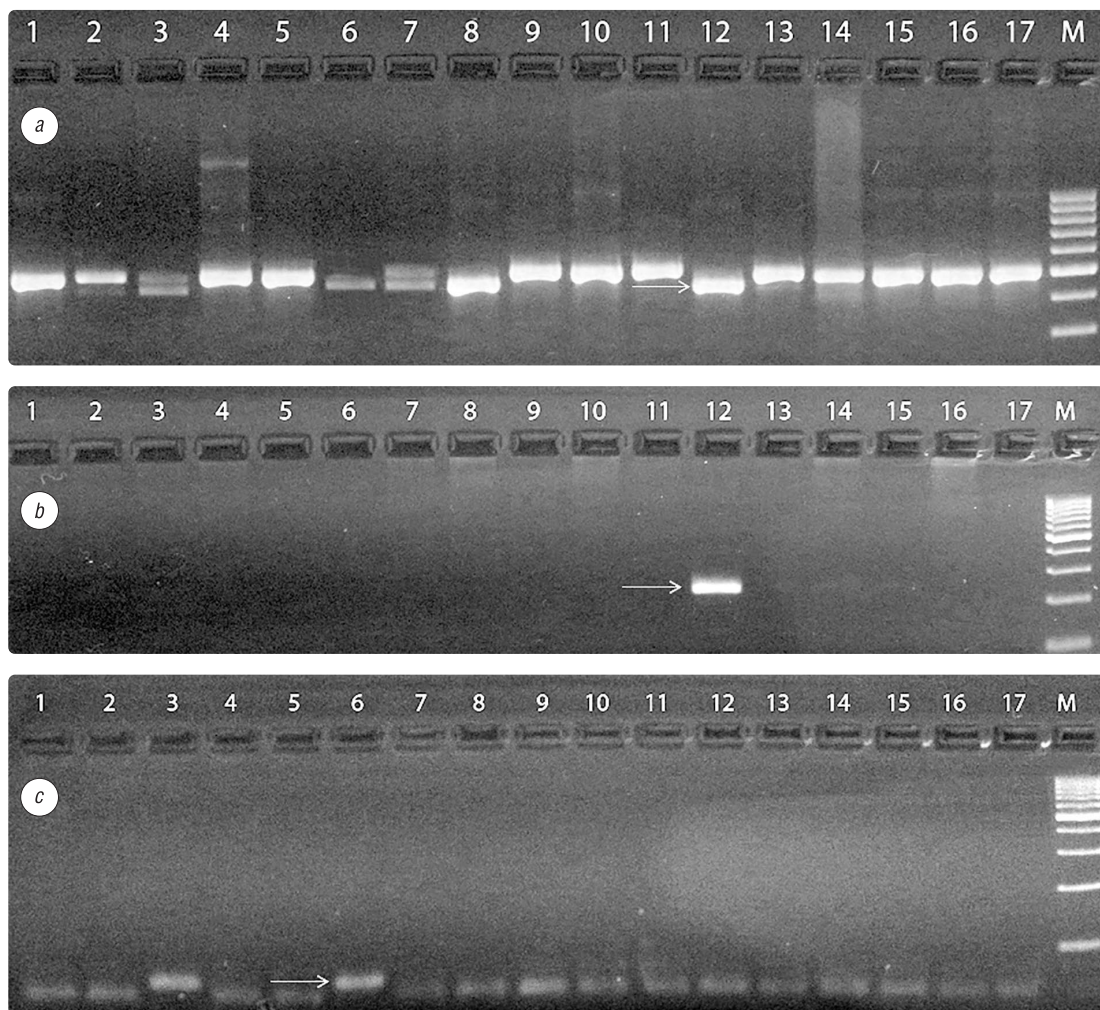


Рис. 1 Электрофоретический профиль маркеров AT20-SCAR (a), EM M02 (b) и EM DM01 (c) дикорастущих видов яблони 1 – *M. pumila*, 2 – *M. niedzwetzkyana* 13279, 3 – *M. turkmenorum* 13283, 4 – *M. purpurea* v. *aldenhamensis*, 5 – *M. pumila* v. *gallica*, 6 – *M. turkmenorum* 29421, 7 – *M. sieversii* 13280, 8 – *M. asiatica* 2343, 9 – *M. caspiensis* 14943, 10 – *M. orientalis* 49478, 11 – *M. sachalinensis* 25951, 12 – *M. sachalinensis* 97, 13 – *M. mandshurica* 41277, 14 – *M. sylvestris* 41639, 15 – *M. spectabilis* 2415, 16 – *M. orientalis* 29484, 17 – *M. sylvestris* ssp. *praecox*, M – маркер молекулярного веса, стрелкой отмечен целевой фрагмент

Fig. 1. Electrophoresis profile of markers AT20-SCAR (a), EM M02 (b) and EM DM01 (c) of wild apple species: 1 – *M. pumila*, 2 – *M. niedzwetzkyana* 13279, 3 – *M. turkmenorum* 13283, 4 – *M. purpurea* v. *aldenhamensis*, 5 – *M. pumila* v. *gallica*, 6 – *M. turkmenorum* 29421, 7 – *M. sieversii* 13280, 8 – *M. asiatica* 2343, 9 – *M. caspiensis* 14943, 10 – *M. orientalis* 49478, 11 – *M. sachalinensis* 25951, 12 – *M. sachalinensis* 97, 13 – *M. mandshurica* 41277, 14 – *M. sylvestris* 41639, 15 – *M. spectabilis* 2415, 16 – *M. orientalis* 29484, 17 – *M. sylvestris* ssp. *praecox*, M – Molecular weight marker, target fragments is marked by arrow

Наряду с межвидовым разнообразием для гена *Pl-1* отмечен и внутривидовой полиморфизм. Например, маркерный аллель присутствует у форм *M. mandshurica* 41947 и *M. niedzwetzkyana* 29422, но не выявлен у *M. mandshurica* 41277, *M. niedzwetzkyana* 29429 и *M. niedzwetzkyana* 13279. Кроме того, в работе О.Ю. Урбанович с соавт. [5] ген *Pl-1* был идентифицирован у *M. cerasifera*, *M. sargentii*, *M. robusta* и *M. baccata*, тогда как согласно нашим данным (табл. 1) у видов *M. cerasifera* и *M. sargentii* ген *Pl-1* отсутствует. Подобные результаты, вероятно, объясняется различными эколого-географическими условиями формирования популяций.

Ген *Pl-w* локализован на 8-й хромосоме. Для его идентификации разработаны SCAR маркеры EM M01 и EM M02, расположенные на расстоянии 4,6 и 6,4 сМ от гена соответственно. Целевым продуктом маркера EM M02 является фрагмент размером 250 п.н., амплифицирующийся только при наличии аллеля *Pl-w*. У форм с рецессивным гомозиготным состоянием гена *Pl-w* (*pl-wpl-w*) данный фрагмент не амплифицируется [21].

Т а б л и ц а 1. Аллельное разнообразие генов устойчивости к мучнистой росе у дикорастущих видов яблони (1 – аллель присутствует, 0 – аллель отсутствует)

Table 1. Allelic diversity of powdery mildew resistance genes in wild apple species (1 - allele available, 0 - no allele available)

№	Дикорастущие виды яблони	<i>Pl-I</i>	<i>Pl-w</i>	<i>Pl-d</i>
		AT20-SCAR, 450 п.н.	EM M02, 250 п.н.	EM DM01, 90 п.н.
<b>Section <i>Baccatomalus</i> Rehd. (<i>Gymnomeles</i>)</b>				
Series <i>Baccatae</i> Rehd.				
1	<i>M. baccata</i> 14207 L. / Borkh.	1	0	0
2	<i>M. baccata</i> 2324	1	0	0
3	<i>M. baccata</i> 2317	1	0	0
4	<i>M. baccata</i> 2316	1	0	0
5	<i>M. baccata</i> 2319	1	1	0
6	<i>M. baccata</i> v. <i>coerulescens</i> 2333	1	0	0
7	<i>M. mandshurica</i> 41277 Maxim. / Komarov	0	0	0
8	<i>M. mandshurica</i> 41947	1	1	0
9	<i>M. pallasiana</i> Juz.	1	0	0
10	<i>M. sachalinensis</i> 25951 Juz.	0	0	0
11	<i>M. sachalinensis</i> 85	1	1	0
12	<i>M. sachalinensis</i> 97	1	1	0
13	<i>M. robusta</i> 43199 Rehd.	1	0	0
14	<i>M. robusta</i> v. <i>persicifolia</i>	1	0	0
15	<i>M. cerasifera</i> v. <i>aurantiaka</i>	1	0	0
16	<i>M. cerasifera</i> v. <i>hiemalis</i>	1	0	0
17	<i>M. cerasifera</i> 29494 Spach.	0	0	0
18	<i>M. cerasifera</i> v. <i>adarata</i>	1	0	0
19	<i>M. denticulata</i> 29416	0	1	1
Series <i>Hupehenses</i> Langenf.				
20	<i>M. hupehensis</i> Pamp. / Rehd.	0	1	0
<b>Section <i>Eumalus</i> Zabel.</b>				
Series <i>Asiaticae</i> Langenf.				
21	<i>M. asiatica</i> 2343 Asami.	1	0	0
Series <i>Kirghisores</i> Langenf.				
22	<i>M. sieversii</i> 13280 Ledeb. / Roem M.	1	0	0
23	<i>M. sieversii</i> 13975	0	0	0
24	<i>M. sieversii</i> 29493	0	0	1
25	<i>M. pumila</i> Mill.	0	0	0
26	<i>M. pumila</i> v. <i>gallica</i>	0	0	0
27	<i>M. niedzwetzkyana</i> 29422 Dieck.	1	0	0
28	<i>M. niedzwetzkyana</i> 29429	0	0	0
29	<i>M. niedzwetzkyana</i> 13279	0	0	0
30	<i>M. purpurea</i> v. <i>pendula</i> 2396	1	1	0
31	<i>M. purpurea</i> v. <i>aldenhamensis</i>	0	0	0
32	<i>M. purpurea</i> v. <i>eleyi</i>	0	0	0
33	<i>M. purpurea</i> 2392 Barbier / Rehd.	0	0	0
Series <i>Orientalis</i> Langenf.				
34	<i>M. orientalis</i> 41623 Uglitzk.	0	0	1
35	<i>M. orientalis</i> 29484	0	0	0
36	<i>M. orientalis</i> 29476	0	0	1
37	<i>M. orientalis</i> 49478	0	0	0
38	<i>M. orientalis</i> 29460	0	0	1

Окончание табл. 1

№	Дикорастущие виды яблони	<i>Pl-l</i>	<i>Pl-w</i>	<i>Pl-d</i>
		AT20-SCAR, 450 п.н.	EM M02, 250 п.н.	EM DM01, 90 п.н.
39	<i>M. turkmenorum</i> 13283 Jut. et M. Pop.	1	0	1
40	<i>M. turkmenorum</i> 29421	1	0	1
Series <i>Malus</i> Mill.				
41	<i>M. sylvestris</i> 73 L. / Mill.	0	0	0
42	<i>M. sylvestris</i> 123	0	0	0
43	<i>M. sylvestris</i> 41639	0	0	0
44	<i>M. sylvestris</i> ssp. <i>praecox</i> Pall. / Soo	0	0	0
45	<i>M. caspiensis</i> 14942 Langenf.	0	0	0
46	<i>M. caspiensis</i> 14943	0	0	0
47	<i>M. × domestica</i> Borkh. Антоновка обыкновенная	0	0	0
48	<i>M. prunifolia</i> 2454 Willd. / Borkh.	1	0	0
49	<i>M. prunifolia</i> 2430	0	0	0
50	<i>M. prunifolia</i> Borkh. v. <i>ringo</i> Asami	0	0	0
51	<i>M. spectabilis</i> 2415 Ait. / Borkh.	0	0	0
52	<i>M. spectabilis</i> v. <i>albi plena</i> Siebold.	0	0	0
53	<i>M. spectabilis</i> v. <i>rubra plena</i>	0	0	0
Section <i>Sorbomalus</i> Zabel.				
Series <i>Sieboldinae</i> Rehd.				
54	<i>M. sieboldii</i> Rgl. / Rehd.	0	1	0
55	<i>M. floribunda</i> Siebold.	0	1	0
56	<i>M. sargentii</i> 2428 Rehd.	0	1	0
57	<i>M. zumi</i> Mats. / Rehd.	0	1	0
58	<i>M. arnoldiana</i> Rehd. / Sarg.	0	0	0
59	<i>M. scheidekerii</i> Spach. / Zabel.	0	0	0
60	<i>M. honanensis</i> Rehd.	0	0	0
Series <i>Kansuenses</i> Rehd.				
61	<i>M. transitoria</i> Batal. / Schneid.	0	0	0
Section <i>Chloromeles</i> Deone. / Rehd.				
Series <i>Coronariae</i> Rehd.				
62	<i>M. coronaria</i> L. / Mill.	1	0	0
63	<i>M. ioensis</i> Wood. / Britt.	0	0	0
64	<i>M. soulardii</i> Bailey. / Britt.	0	0	0
65	<i>M. platycarpa</i> Rehd.	0	0	0
Section <i>Eriolobus</i> Schneid				
66	<i>M. florentina</i> Zuce. / Schneid.	1	0	0
Section <i>Docyniopsis</i> Schneid / Langenf.				
67	<i>M. sikkimensis</i> Wensig. / Koehne	1	0	0

В анализируемой коллекции дикорастущих видов яблони маркер EM M02 идентифицирован у 11 форм из 67, что составляет 16,4 % (пример идентификации приведен на рис. 1, b, результаты – в табл. 1).

Маркерный аллель гена *Pl-w* наиболее распространен у ягодных яблонь (серия *Baccatae*) и яблонь Зибольда (серия *Sieboldinae*). В серии *Baccatae* маркерный аллель гена *Pl-w* выявлен у 5 форм из 19, в серии *Sieboldinae* – у 4 форм из 7. В серии киргизские яблони (*Kirghisores*) маркер EM M02 идентифицирован у *M. purpurea* v. *pendula* 2396. У генотипов серий восточные (*Orientalis*) и настоящие (*Malus*) яблони маркерный аллель гена *Pl-w* отсутствует. Наличие гена *Pl-w* у *M. sieboldii*, *M. sargentii* 2428 и *M. zumi* подтверждается также другими исследователями [5, 24]. Однако в работе О.Ю. Урбанович с соавт. ген *Pl-w* выявлен также у видов *M. ioensis* и *M. cerasifera*, которые согласно нашим данным (табл. 1) геном *Pl-w* не обладают.

Для ягодных яблонь также отмечен внутривидовой полиморфизм по гену *Pl-w*: целевой фрагмент маркера EM M02 выявлен у *M. baccata* 2319, однако отсутствует у 4 других форм – *M. baccata* 14207, *M. baccata* 2324, *M. baccata* 2317, *M. baccata* 2316.

Ген *Pl-d* локализован на 12-й хромосоме. Для его идентификации разработан SCAR маркер EM DM01, расположенный на расстоянии 9 см от гена. Целевым продуктом маркера EM DM01 является фрагмент размером 90 п.н., который амплифицируется только при наличии аллеля резистентности *Pl-d*. У форм с рецессивным гомозиготным состоянием гена *Pl-d* (*pl-dpl-d*) данный фрагмент не амплифицируется [22].

В анализируемой коллекции дикорастущих видов яблони маркер EM DM01 идентифицирован у 7 форм из 67, что составляет 10,4 % (пример идентификации приведен на рис. 1, с, результаты – в табл. 1).

Маркерный аллель гена *Pl-d* наиболее распространен у восточных яблонь (серия *Orientalis*): из 7 проанализированных генотипов фрагмент размером 90 п.н. присутствует у 5 форм (71,4 %). При этом также наблюдается внутривидовой полиморфизм: у форм *M. orientalis* 41623, *M. orientalis* 29476 и *M. orientalis* 29460 ген *Pl-d* присутствует, у форм *M. orientalis* 29484 и *M. orientalis* 49478 – отсутствует. Также ген *Pl-d* выявлен у *M. denticulata* 29416 (серия *Baccatae*) и *M. sieversii* 29493 (серия *Kirghisores*). У остальных изучаемых форм яблони маркер EM DM01 отсутствует.

Как следует из данных табл. 1, хотя бы один из изучаемых молекулярных маркеров присутствует в геноме 52,2 % изучаемых форм. Наибольшее количество форм с генами устойчивости к мучнистой росе выявлено в серии ягодные яблони (84,2 % от общего количества видов в серии); в серии восточные яблони их количество составило 71,4 %; в серии яблони Зибольда – 57,1 %; в серии киргизские яблони – 33,3 %. В серии настоящие яблони моногенная устойчивость к мучнистой росе выявлена у 1 вида (7,7 %).

Сочетанием аллелей резистентности генов *Pl-1* и *Pl-w* характеризуются 5 генотипов (7,5 %); генов *Pl-1* и *Pl-d* – 2 генотипа (2,9 %); генов *Pl-w* и *Pl-d* – 1 генотип (1,5 %). Форм, совмещающих аллели резистентности 3 генов устойчивости к мучнистой росе в изучаемой коллекции дикорастущих форм яблони не выявлено.

**Заключение.** По результатам молекулярно-генетического анализа среди проанализированных дикорастущих форм р. *Malus* установлено, что ген *Pl-1* наиболее распространен у ягодных яблонь (серия *Baccatae*), ген *Pl-w* – у ягодных яблонь (серия *Baccatae*) и яблонь Зибольда (серия *Sieboldinae*), ген *Pl-d* – у восточных яблонь (серия *Orientalis*). Комплексными источниками олигогенной устойчивости к мучнистой росе являются дикорастущие формы яблони – *M. baccata* 2319, *M. mandshurica* 41947, *M. sachalinensis* 85, *M. sachalinensis* 97, *M. purpurea* v. *pendula* 2396 (гены *Pl-1* и *Pl-w*); *M. turkmenorum* 13283, *M. turkmenorum* 29421 (гены *Pl-1* и *Pl-d*); *M. denticulata* 29416 (гены *Pl-w* и *Pl-d*).

#### Список использованных источников

1. A partial diallel study of powdery mildew resistance in six apple cultivars under three growing conditions with different disease pressures / V.G. M. Bus [et al.] // Euphytica. – 2006. – Vol. 148, N 3. – P. 235–242. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-9014-2>
2. The knock-down of the expression of MdMLO19 reduces susceptibility to powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*) in apple (*Malus domestica*) / S. Pessina [et al.] // Plant Biotechnology J. – 2016. – Vol. 14, N 10. – P. 2033–2044. <https://doi.org/10.1111/pbi.12562>
3. Radwan, M. Effect of integrated control program of powdery mildew disease on growth and productivity of apple / M. Radwan, D. Darwesh // J. of Plant Protection a. Pathology. – 2018. – Vol. 9, N 12. – P. 787–794. <https://doi.org/10.21608/jppp.2018.44066>
4. Susuri, L.R. *Podosphaera leucotricha* and reaction of some apple cultivars / L.R. Susuri, H.S. Susuri, I.Z. Muja // Agron. Glasnik. – 2000. – Vol. 63, № 1/2. – P. 29–39.
5. Урбанович, О.Ю. Распространение генов устойчивости к мучнистой росе в коллекции сортов и видов яблони, выращиваемых в Беларуси / О.Ю. Урбанович, З.А. Козловская, Н.А. Картель // Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии Нац. акад. наук Беларуси. – Минск, 2010. – Т. 11. – С. 20–25.
6. Создание иммунных к парше генотипов яблони с комплексом ценных агробиологических признаков / Е.В. Ульяновская [и др.] // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2011. – № 10 (4). – С. 14–30.
7. A European project: D.A. R.E – durable apple resistance in Europe (FAIR5 CT97–3898) durable resistance of apple to scab and powdery-mildew: one step more towards an environmental friendly orchard / Y. Lespinasse [et al.] // Acta Horticulturae. – 2000. – N 538. – P. 197–200. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2000.538.32>

8. Якуба, Г. В. Технология защиты яблони от болезней с применением отечественных фунгицидов / Г. В. Якуба // Садоводство и виноградарство. – 2016. – № 4. – С. 33–39. <https://doi.org/10.18454/VSTISP.2016.4.2841>
9. Bioefficacy studies of new fungicide molecules (Proquinazid 20 EC) against powdery mildew of apple / T. R. Rather [et al.] // J. of Pharmacognosy a. Phytochemistry. – 2019. – Vol. 8, N 1. – P. 1963–1965.
10. Эффективность отбора сеянцев яблони в школке на устойчивость к парше и мучнистой росе / И. И. Супрун [и др.] // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2016. – № 38 (2). – С. 117–129.
11. Comparative efficacy of bio control agent bacillus subtilis and fungicides against powdery mildew of apple / M. Nasir [et al.] // J. of Agr. Research. – 2017. – Vol. 55, N 1. – P. 75–84.
12. Palmer, C. «Greening» agriculture in the developing world / C. Palmer // Rural 21. – 2008. – Vol. 42, N 3. – P. 30–32.
13. Жученко, А. А. Биологизация и экологизация интенсификационных процессов в сельском хозяйстве / А. А. Жученко // Вестн. ОрелГАУ. – 2009. – № 3 (18). – С. 8–12.
14. Gorgitano, M. T. Life cycle economic and environmental assessment for a greening agriculture / M. T. Gorgitano, M. Pirilli // Quality – Access to Success. – 2016. – Vol. 17, suppl. 1. – P. 181–185.
15. Breeding of new apple cultivars in Belarus / Z. Kazlouskaya [et al.] // Proc. of the Latv. Acad. of Sciences. Sect. B, Natural, Exact, a. Appl. Sciences. – 2013. – Vol. 67, N 2. – P. 94–100. <https://doi.org/10.2478/prolas-2013-0015>
16. Savel'ev, N. I. Genetic diversity of genus Malus Mill. for scab resistance genes. / N. I. Savel'ev, A. S. Lyzhin, N. N. Savel'eva // Russ. Agr. Sciences. – 2016. – Vol. 42, N 5. – P. 310–313. <https://doi.org/10.3103/S1068367416050189>
17. Investigation of wild species potential to increase genetic diversity useful for apple breeding / C. Dan [et al.] // Genetika. – 2015. – Vol. 47, N 3. – P. 993–1011. <https://doi.org/10.2298/gensr1503993d>
18. Савельев, Н. И. Отбор перспективных генотипов яблони на колонновидность и устойчивость к парше с помощью диагностических ДНК-маркеров / Н. И. Савельев, А. С. Лыжин, Н. Н. Савельева // Вавил. журн. генетики и селекции. – 2016. – Т. 20, № 3. – С. 329–332. <https://doi.org/10.18699/VJ16.122>
19. Лыжин, А. С. Создание генетических паспортов подвойных форм яблони на основе анализа полиморфизма микросателлитных последовательностей ДНК / А. С. Лыжин // Достижения науки и техники АПК. – 2019. – Т. 33, № 2. – С. 11–13. <https://doi.org/10.24411/0235-2451-2019-10203>
20. Mapping of the apple powdery mildew resistance gene P11 and its genetic association with an NBS-LRR candidate resistance gene / F. Dunemann [et al.] // Plant Breeding. – 2007. – Vol. 126, N 5. – P. 476–481. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2007.01415.x>
21. Evans, K. Identification of SCAR markers linked to Pl-w mildew resistance in apple / K. Evans, C. James // Theoretical a. Appl. Genetics. – 2003. – Vol. 106, N 7. – P. 1178–1183. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1147-2>
22. James, C. M. Identification of molecular markers linked to the mildew resistance gene Pl-d in apple / C. M. James, J. B. Clarke, K. M. Evans // Theoretical a. Appl. Genetics. – 2004. – Vol. 110, N 1. – P. 175–181. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1836-0>
23. Identification of PCR-based markers linked to the powdery-mildew-resistance gene P11 from Malus robusta in cultivated apple / T. Markussen [et al.] // Plant Breeding. – 1995. – Vol. 114, N 6. – P. 530–534. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1995.tb00850.x>
24. 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. of Genetics a. Plant Breeding. – 2011. – Vol. 47, N 4. – P. 156–165.

## References

1. Bus V. G. M., Ranatunga C., Alspach P. A., Oraguzie N. C., Whitworth C. A partial diallel study of powdery mildew resistance in six apple cultivars under three growing conditions with different disease pressures. *Euphytica*, 2006, vol. 148, no. 3, pp. 235-242. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-9014-2>
2. Pessina S., Angeli D., Martens S., Visser R. G., Bai Y., Salamini F., Velasco R., Schouten H. J., Malnoy M. A. The knock-down of the expression of MdMLO19 reduces susceptibility to powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*) in apple (*Malus domestica*). *Plant Biotechnology Journal*, 2016, vol. 14, no. 10, pp. 2033-2044. <https://doi.org/10.1111/pbi.12562>
3. Radwan M., Darwesh D. Effect of integrated control program of powdery mildew disease on growth and productivity of apple. *Journal of Plant Protection and Pathology*, 2018, vol. 9, no. 12, pp. 787-794. <https://doi.org/10.21608/jppp.2018.44066>
4. Susuri L. R., Susuri H. S., Muja I. Z. *Podosphaera leucotricha* and reaction of some apple cultivars. *Agronomski Glasnik*, 2000, vol. 63, no. 1/2, pp. 29-39.
5. Urbanovich O. Yu., Kozlovskaya Z. A., Kartel' N. A. Spread of mildew resistance genes in the collection of apple cultivars and species grown in Belarus. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika: sbornik nauchnykh trudov* [Molecular and applied genetics: a collection of scientific papers]. Minsk, 2010, vol. 11, pp. 20-25 (in Russian).
6. Ul'yanovskaya E. V., Suprun I. I., Sedov E. N., Sedysheva G. A., Serova Z. M. Creation of the apple-tree genotypes immune to scab and with complex of valuable agrobiological traits. *Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii = Fruit Growing and Viticulture of South of Russia*, 2011, no. 10 (4), pp. 14-30 (in Russian).
7. Lespinasse Y., Durel C. E., Laurens F., Chevalier M., Pinet C., Parisi L. A European project: D. A. R.E - durable apple resistance in Europe (FAIR5 CT97-3898) durable resistance of apple to scab and powdery-mildew: one step more towards an environmental friendly orchard. *Acta Horticulturae*, 2000, no. 538, pp. 197-200. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2000.538.32>
8. Yakuba G. V. Apple technologies protection from diseases with domestic fungicides application. *Sadovodstvo i vinogradarstvo = Horticulture and Viticulture*, 2016, no. 4, pp. 33-39 (in Russian). <https://doi.org/10.18454/VSTISP.2016.4.2841>



9. Rather T. R., Bhat Z. A., Pandit B. A., Shiekh K., Malik A. R., Ganai M. A. Bioefficacy studies of new fungicide molecules (Proquinazid 20 EC) against powdery mildew of apple. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2019, vol. 8, no. 1, pp. 1963-1965.
10. Suprun I. I., Nasonov A. I., Yakuba G. V., Lobodina E. V., Barsukova O. N. Effective selection of apple seedlings in a seed plot on resistance to scab and powder mildew. *Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii = Fruit Growing and Viticulture of South of Russia*, 2016, no. 38 (2), pp. 117-129 (in Russian).
11. Nasir M., Idress M., Iqbal B., Hussain M., Mohy-ud-Din G., Ayub M. Comparative efficacy of bio control agent bacillus subtilis and fungicides against powdery mildew of apple. *Journal of Agricultural Research*, 2017, vol. 55, no. 1, pp. 75-84.
12. Palmer C. «Greening» agriculture in the developing world. *Rural 21*, 2008, vol. 42, no. 3, pp. 30-32.
13. Zhuchenko A. A. Biologization and greening of intensification processes in agriculture. *Vestnik OrelGAU*, 2009, no. 3 (18), pp. 8-12 (in Russian).
14. Gorgitano M. T., Pirilli M. Life cycle economic and environmental assessment for a greening agriculture. *Quality – Access to Success*, 2016, vol. 17, suppl. 1, pp. 181-185.
15. Kazlouskaya Z., Hashenka T., Vaseha V., Yarmolich S. Breeding of new apple cultivars in Belarus. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*, 2013, vol. 67, no. 2, pp. 94-100. <https://doi.org/10.2478/prolas-2013-0015>
16. Savel'ev N. I., Lyzhin A. S., Savel'eva N. N. Genetic diversity of genus Malus Mill. for scab resistance genes. *Russian Agricultural Sciences*, 2016, vol. 42, no. 5, pp. 310-313. <https://doi.org/10.3103/S1068367416050189>
17. Dan C., Sestras A., Bozdog C., Sestras R. Investigation of wild species potential to increase genetic diversity useful for apple breeding. *Genetika*, 2015, vol. 47, no. 3, pp. 993-1011. <https://doi.org/10.2298/gensr1503993d>
18. Savel'ev N. I., Lyzhin A. S., Savel'eva N. N. Selection of promising apple genotypes for columnar growth habit and scab resistance using diagnostic DNA markers. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2016, vol. 20, no. 3, pp. 329-332 (in Russian). <https://doi.org/10.18699/VJ16.122>
19. Lyzhin A. S. Creation of genetic passports of apple rootstock forms on the basis of microsatellite DNA polymorphism. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK = Achievements of Science and Technology in Agro-Industrial Complex*, 2019, vol. 33, no. 2, pp. 11-13 (in Russian). <https://doi.org/10.24411/0235-2451-2019-10203>
20. Dunemann F., Peil A., Urbanietz A., Garcia-Libreros T. Mapping of the apple powdery mildew resistance gene *Pl1* and its genetic association with an NBS-LRR candidate resistance gene. *Plant Breeding*, 2007, vol. 126, no. 5, pp. 476-481. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2007.01415.x>
21. Evans K., James C. Identification of SCAR markers linked to Pl-w mildew resistance in apple. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, vol. 106, no. 7, pp. 1178-1183. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1147-2>
22. 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, no. 1, pp. 175-181. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1836-0>
23. Markussen T., Kruger J., Schmidt H., Dunemann F. Identification of PCR-based markers linked to the powdery-mildew-resistance gene Pl1 from Malus robusta in cultivated apple. *Plant Breeding*, 1995, vol. 114, no. 6, pp. 530-534. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1995.tb00850.x>
24. Patzak J., Paprštejn F., Henychová A. Identification of apple scab and powdery mildew resistance genes in Czech Apple (*Malus × domestica*) genetic resources by PCR molecular markers. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 2011, vol. 47, no. 4, pp. 156-165.

### Информация об авторах

Лыжин Александр Сергеевич – кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник, ФГБНУ «Федеральный научный центр им. И.В. Мичурина» (ул. Мичурина, 30, 393774, Мичуринск, Тамбовская область, Россия). E-mail: [Ranenburzhetc@yandex.ru](mailto:Ranenburzhetc@yandex.ru), ORCID ID: 0000-0001-9770-8731

Савельева Наталья Николаевна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, ФГБНУ «Федеральный научный центр им. И.В. Мичурина» (ул. Мичурина, 30, 393774, Мичуринск Тамбовская область, Россия). E-mail: [saveleva\\_natalya\\_nic@mail.ru](mailto:saveleva_natalya_nic@mail.ru), ORCID ID: 0000-0003-4874-7536

### Information about the authors

Alexander S. Lyzhin – Ph.D. (Agriculture). I. V. Michurin Federal Science Center (30 Michurina Str., 393774 Michurinsk, Tambov region, Russia). E-mail: [Ranenburzhetc@yandex.ru](mailto:Ranenburzhetc@yandex.ru), ORCID ID: 0000-0001-9770-8731

Natalya N. Savel'eva – D.Sc. (Biological). I. V. Michurin Federal Science Center (30 Michurina Str., 393774 Michurinsk, Tambov region, Russia). E-mail: [saveleva\\_natalya\\_nic@mail.ru](mailto:saveleva_natalya_nic@mail.ru), ORCID ID: 0000-0003-4874-7536