

Государственное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и селекции
плодовых растений им. И.В. Мичурина

На правах рукописи

Шамшин Иван Николаевич

**Оценка генетического разнообразия сортов и форм яблони
с использованием ДНК-маркеров**

03.02.07 – Генетика

06.01.05 – селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
доктор биологических наук Кудрявцев А.М.
академик, доктор сельскохозяйственных наук Савельев Н.И.

Мичуринск-наукоград РФ – 2014

Содержание

	Стр.
Введение	4
Глава I Обзор литературы	9
1.1 Молекулярно - генетические маркеры и их использование в генетике и селекции растений.	9
1.1.1 Типы молекулярных маркеров	9
1.1.2 Биохимические маркеры	10
1.1.3 Молекулярно-генетические маркеры	11
1.1.3.1 ДНК-маркеры, основанные на гибридизации	12
1.1.3.2 ДНК-маркеры на основе ПЦР с праймерами, имеющими множественную локализацию в геноме (мультилокусные маркеры)	12
1.1.3.3 ДНК маркеры уникальных последовательностей	13
1.1.3.4 Маркеры, основанные на однонуклеотидном полиморфизме последовательности ДНК (SNP)	15
1.2 Использование молекулярных маркеров в филогенетических и таксономических исследованиях, при изучении генетического разнообразия и паспортизации	16
1.3 Применение методов генетического маркирования и маркер-опосредованной селекции на плодовых культурах	19
1.4 Яблоня домашняя: особенности объекта и состояние исследований	22
1.4.1 Распространение и происхождение яблони домашней	22
1.4.2. Анализ генома яблони домашней	24
Глава II Материалы и методы	34
2.1. Исходный материал	34
2.2. Выделение геномной ДНК	37
2.3. Полимеразная цепная реакция	38
2.5. Фракционирование фрагментов ДНК	41
2.6 Анализ результатов и статистическая обработка данных	42
2.7 Секвенирование	42
ГЛАВА III Результаты и обсуждение	43

3.1. Оценка генетического разнообразия яблони с использованием анализа микросателлитов	43
3.1.1 Использование микросателлитных маркеров для генетической паспортизации сортов яблони	51
3.2 Распространение гена устойчивости к парше (<i>Vf</i>) у сортов и форм яблони на основании данных ДНК-маркирования	61
3.2.1 Секвенирование фрагментов генов <i>Vf</i>	67
3.3 Идентификация аллелей генов влияющих на длительность хранения плодов в коллекции сортов и форм яблони	71
3.3.1 Идентификация аллелей генов, вовлеченных в биосинтез этилена в плодах у сортов и форм яблони	71
3.3.2 Аллельное разнообразие генов, вовлеченных в биосинтез экспансина у сортов и форм яблони	79
Глава IV Применение методов маркер-опосредованной селекции для получения новых генотипов яблони	89
Глава V Экономическая эффективность использования методов ДНК-технологии.	93
Выводы	94
Практические рекомендации для селекции.	96
Список использованной литературы	97
Приложения	114

Введение

Одним из приоритетных направлений государственной политики развитых стран является рациональное питание людей, как одно из условий обеспечения их трудоспособности и долголетия. Традиционное для северных стран избыточное потребление животных жиров, мучных и крахмалистых продуктов питания сопряжено с дефицитом полиненасыщенных жиров, полноценных белков, витаминов, минеральных веществ, пищевых волокон и приводит к избытку холестерина и свободных радикалов. Следствием этого является нарастание смертности от болезней сердца и сосудов, онкологических, костей и крови. Один из путей борьбы с этой проблемой - увеличение потребления свежих плодов и овощей до 70- 80 и 100 кг на человека в год соответственно. Одним из важных условий при этом является приоритет потребления отечественных плодов и ягод, поскольку их качество легче контролировать и нет нужды в целях длительного хранения и транспортировки применять небезвредные консерванты. Продовольственные программы страны эффективны, когда на долю импортных пищевых продуктов приходится не более 15 % от их общего количества (Метлицкий, 1998).

В России, как и в большинстве стран мира, наиболее значимой из плодовых культур является яблоня. Она является лидером в увеличении производства плодов. Широкое ее распространение обусловлено, прежде всего, ценными диетическими плодами, которые богаты витаминами, легко усвояемыми аминокислотами, сахарами, азотистыми и другими биологически активными веществами. Кроме того, плоды яблони ценятся за их профилактические и лечебные свойства против многих заболеваний, а также возможность использования их как в свежем, так и в переработанном виде круглый год (Форте А.В., и др., 2004).

Продолжительный ювенильный период яблони, гетерозиготность по многим признакам и самонесовместимость ограничивают возможности интенсификации селекционного процесса и быстрого получения новых

сортов. Для оценки гибридных форм по ряду морфологических признаков требуется длительный временной период, измеряемый годами. Особенно это касается оценки параметров плодов: формы, окраски, вкусовых качеств, химического состава и т.д. (Форте А.В., и др., 2004).

Для создания сорта яблони необходим период, состоящий из трех этапов. Первый этап – селекция. Его продолжительность от проведения гибридизации до выделения элитных сеянцев. Второй этап – первичное изучение, третий – государственное сортоиспытание. Каждый из трех этапов при работе с яблоней занимает 13-17 лет, а вместе эти три этапа продолжаются от 43 до 57 лет. Эти сроки не удовлетворяют ни селекционеров, ни производство (Седов, 2011).

Актуальность исследований. Яблоня (*Malus Mill*) является одной из важнейших плодовых культур. В России ее насаждения занимают более 70% всех площадей садов. Разнообразие климатических условий нашей страны требует создания большого сортимента сортов устойчивых к различным типам стрессоров и обладающих высокими товарно-потребительскими качествами. Это, в свою очередь, ставит определенные задачи перед селекционерами по созданию новых высокоадаптивных сортов яблони.

В связи с необходимостью интенсификации селекционного процесса целесообразно использование генетических методов, основанных на анализе ДНК. Применение молекулярных маркеров позволяет значительно ускорить идентификацию исходного материала и проводить анализ результатов скрещивания в достаточно короткий период времени. Таким образом, облегчается подбор родительских пар для скрещивания, поиск родительского материала в гибридных формах и анализ интрогрессии полезных признаков от исходных форм потомкам. Маркирование сортового материала яблони облегчит контроль над его однородностью при закладке маточных насаждений, сортовой прочистке садов и при реализации посадочного материала.

Анализ ДНК, который напрямую характеризует геном, а не его фенотипическое проявление, может дать устойчивые характеристики растения, нейтральные по отношению к среде обитания и практически пригодные для идентификации генотипов, регистрации сортов и маркирования хозяйственно-ценных генов и признаков.

Целью работы было изучение генетического разнообразия сортов и форм яблони из коллекции ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина с использованием анализа микросателлитных последовательностей генома и выявление в этой коллекции целевых аллелей генов хозяйственно-ценных признаков методом молекулярных маркеров.

Для достижения цели решались следующие задачи:

1. Изучить генетическое разнообразие сортов и гибридных форм яблони, используя анализ простых микросателлитных повторов ДНК.
2. Выявить распространение в коллекции яблони гена устойчивости к парше *Vf* по данным ДНК-маркирования.
3. Оценить разнообразие сортов и гибридных форм яблони по аллелям генов, вовлеченных в контроль биосинтеза этилена (*Md-ACS1* и *Md-ACO1*).
4. Оценить разнообразие сортов и гибридных форм яблони по аллелям генов, вовлеченных в контроль синтеза экспансина.

Объектом исследования является изучение генетического полиморфизма на основе анализа простых микросателлитных последовательностей ДНК и разнообразие генов хозяйственно-ценных признаков в генотипе сортов и гибридных форм яблони.

Научная новизна:

- на основании анализа ДНК сортов яблони из коллекции ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина выявлены закономерности распределения генов, контролирующих продолжительную сохранность плодов у сортов и форм яблони.
- идентифицированы уникальные генотипы, несущие редкие аллели по микросателлитным локусам.

- на основании изучения простых микросателлитных последовательностей генома созданы генетические паспорта анализируемых сортов и форм яблони.

- показана высокая степень полиморфизма сортов селекции И.В. Мичурина.

- с использованием генетических маркеров и в коллекции сортов ВНИИГиСПР идентифицированы генотипы, обладающие моногенной устойчивостью к парше, контролируемой геном *Vf*.

Практическая значимость исследований.

Идентифицированы генисточники моногенной устойчивости к парше у яблони.

Выявлены генотипы, несущие целевые аллели генов продолжительной сохранности плодов. В частности выделены сорта, содержащие аллели генов *Md-ACO1* и *Md-ACS1*, обуславливающие сниженный уровень синтеза этилена в плодах. Идентифицированы генотипы, несущие комбинации аллелей гена *Md-Exp7* ответственные за продолжительную сохранность твердости плода. Использование таких сортов в селекционной работе в качестве родительских пар дает возможность создания сортов с длительной лежкостью.

Установлено, что анализ микросателлитных последовательностей генома у сортов и форм яблони предоставляет селекционеру дополнительную информацию о генетическом сходстве и различии селекционного материала, что позволит более обоснованно подбирать пары для скрещивания. В связи с выявленным высоким уровнем полиморфизма микросателлитных локусов установлена возможность использования данного метода для оценки гибридного фонда и паспортизации сортов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 113 страницах компьютерного текста, состоит из введения, 7 глав, выводов, выводов, практических рекомендаций для селекции, списка литературы (140 наименования, в том числе 93 зарубежных автора), содержит 15 таблиц и 12 рисунков.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены и доложены на Международной научно-практической конференции «Инновационные биотехнологии в странах ЕврАзЭС» г. Санкт-Петербург (11 – 13 октября 2012 г.), Международной научно-практической конференции, посвящённой 155-летию со дня рождения И. В. Мичурина XXII «Мичуринские чтения» (26-28 октября, 2010) г. Мичуринск, Международной научно-практической конференция «Современные сорта и технологии для интенсивных садов» г. Орел ГНУ ВНИИСПК (15-18 июля 2013 г.). Результаты исследований позволили принять участие в межгосударственной целевой программе ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии» (государственный контракт № 16.M04.11.00).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 6 в рецензируемых ВАК изданиях.

Глава I Обзор литературы

1.1 Молекулярно - генетические маркеры и их использование в генетике и селекции растений

Исторически все закономерности изменчивости и наследственности изучались при помощи анализа морфологических характеристик.

Различия по морфологическим признакам до настоящего времени остается главным критерием в систематике растений, при изучении мутационного процесса, в исследованиях филогенетических связей. Однако, морфологические признаки не всегда имеют полную информативность, так как на них сильное влияние оказывают условия окружающей среды и проявляются они чаще всего на поздних стадиях онтогенеза. Кроме того, наблюдается недостаточность морфологических данных при селекции на количественные признаки, такие как: продуктивность, устойчивость к абиотическим стрессам, качество урожая и др. (Конарев, 2006).

Современные методы молекулярной биологии существенно дополнили методы селекции растений. Широкое распространение получил метод молекулярных маркеров.

Генетические маркеры представляют собой фрагменты ДНК, соответствующие нуклеотидным последовательностям, входящих непосредственно в структуру агрономически важного гена или сцепленных с этим геном (Мягких, 2009).

Будучи сцепленными с генами, отвечающими за проявление важнейших хозяйственно ценных признаков сельскохозяйственных растений, они позволяют достоверно провести отбор на уровне индивидуального растения или селекционной линии непосредственно по генотипу, не завуалированному модифицирующим действием средовых факторов (Беспалова, 2012).

1.1.1 Типы молекулярных маркеров

Выбор для работы конкретного типа маркеров зависит от целей исследования, возможностей лаборатории и объема имеющейся генетической информации об объекте и ранее полученных для него маркерах. Выделяют

несколько групп молекулярных маркеров: маркеры основанные на полиморфизме белков (биохимические маркеры) и ДНК (молекулярно-генетические) (Конарев, 1983, , Чесноков, 2005, Павловская, 2007).

1.1.2 Биохимические маркеры

Биохимические маркеры основаны на полиморфизме запасных белков или изоферментных систем и характеризуют организм на уровне продуктов генов (Конарев, 2006).

Выделяют два типа белковых маркеров иммунохимические, или серологические, и электрофоретические. Наиболее эффективные электрофоретические маркеры – это полиморфные ферменты и запасные белки семян. Использование белковых маркеров позволяет по электрофоретическим спектрам полиморфных белков проводить анализ морфологически однородной популяции. Однако зимограммы многих ферментов имеют органную, тканевую и субклеточную специфичность, также возможны изменения в спектре изозимов по фазам развития организма и под влиянием таких факторов, как температура, фотопериод, инфекция и условия питания растений (Конарев 2000, 2002, Пикунова, 2010).

Метод электрофоретического разделения белков семян широко используется для исследования многих сельскохозяйственных культур, как двудольных так и однодольных (Кудрявцев, 1994; Кудрявцев, 2007; Метакровский и др., 1990; Новосельская и др., 1987; Драгович и др., 2004; Володин и др., 1978, Лесневич и др., 2002, Поморцев и др., 2002, Корниенко, 2006, Павловская и др., 2007, Конарев В.Г., 2007 и др.).

Широкого применения в исследовании плодовых культур данный метод не нашел, что вероятно связано с их вегетативным размножением. Тем не менее, он был успешно использован в ряде работ, например для генетической характеристики иранских диких видов сливы (род *Prunus*) (Zeinalabedini et al, 2008), яблони (Бирюк, Козловская, 2002) и смородины (Сабитов, 1994, Пикунова, 2010).

Возможности указанного метода ограничиваются также низким уровнем белкового полиморфизма в популяциях плодовых растений, ограничениями в выборе биологического материала и времени его сбора (Чесноков, 2005).

1.1.3 Молекулярно-генетические маркеры

Более перспективным представляется использование в качестве маркерных систем полиморфных нуклеотидных последовательностей ДНК, позволяющих тестировать генетический полиморфизм непосредственно на уровне генов, а не на уровне продуктов генов, как в случае использования метода белкового полиморфизма. ДНК-маркеры позволяют решить проблему насыщения генома маркерами и маркировать практически любые участки ДНК, в том числе некодирующие. Кроме того, эта маркерная система дает возможность использовать для анализа любые ткани и органы, независимо от стадии развития организма и имеет целый ряд преимуществ по сравнению с другими типами маркеров (Сулимова, 2004).

Идентификация растений является одним из основных направлений применения молекулярно-генетических маркеров на основе ДНК. Надежность ДНК-анализа для плодовых растений связана с высокими уровнями генетической изменчивости между сортами и отсутствием изменчивости в пределах сорта (Романова и др., 2007).

В настоящее время в зависимости от техники исполнения и характеризующей части генома выделяют большое количество разнообразных ДНК-маркеров: RFLP, AFLP, RAPD, CAPS, SSR, SCAR, SNP, и др. (Сулимова, 2004, Чесноков, 2005).

Генетическими маркерами могут служить также повторяющиеся последовательности SINE и LINE. Они представляют собой ретротранспозоны или мобильные генетические элементы, широко представленные в геномах всего царства эукариот и составляющие огромную часть геномной ДНК (до половины генома растений) (Романова и др., 2007).

В литературе описан простой в исполнении метод анализа полиморфизма ретротранспозонов семейства R 173 повторяющихся

последовательностей ДНК, которые специфичны для ржи (Guidet et al., 1991). Оно составляет около 15 000 копий на диплоидный геном ржи, которые распределены по всем 7 хромосомам диспергированным образом.

1.1.3.1 ДНК-маркеры, основанные на гибридизации

ПДРФ (RFLP)

Одним из наиболее ранних методов получения ДНК-маркеров является ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов), называемый также RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Принцип метода основан детекции специфических нуклеотидных последовательностей в геномной ДНК, расщепленной эндонуклеазами рестрикции, с помощью так называемой «блот-гибридизации», предложенной Southern в 1975 году (Southern, 1975).

Данный метод анализа до сих пор востребован, но в области идентификации и различения растений ему на смену пришли методы, основанные на ПЦР-амплификации ДНК с использованием случайно выбранных праймеров или праймеров, комплементарных известным участкам генома.

1.1.3.2 ДНК-маркеры на основе ПЦР с праймерами, имеющими множественную локализацию в геноме (мультилокусные маркеры)

RAPD-маркеры

Одним из самых популярных типов маркеров в картировании геномов растений является RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams et. al., 1990). Метод заключается в амплификации геномной ДНК объекта в ходе ПЦР со случайным праймером, обычно длиной 10-11 нуклеотидов. Методика выявления RAPD-маркеров проста в техническом исполнении. Особенно важно то, что для успешного применения RAPD не требуется никаких знаний о генетической конституции объекта, поэтому именно с данного типа маркеров начинаются исследования по молекулярному картированию геномов плохо изученных видов (Hu et. al., 1991; Lodhi et. al., 1995). При оптимизации протокола метод RAPD отличается быстротой, удобством и хорошо подходит для анализа генома растений. Метод был успешно

использован для картирования геномов многих культур (Hu et. al., 1991; Lodhi et. al., 1995), для маркирования сортов (Гостимский и др., 1999; Оганисян и др., 1996), анализа внутри- и межвидового полиморфизма (Кочиева и др., 2002; Сиволап и др., 1998; Weising et. al., 1995). Особенно перспективным в фундаментальном и прикладном плане является использование RAPD-метода для картирования генов количественных признаков растений (Чегамирза, 2004; Galande et. al., 2001; Irzikowska et. al., 2002).

AFLP

AFLP (Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism) –технология получения случайных молекулярных маркеров с использованием специфических праймеров. При AFLP-подходе ДНК обрабатывают комбинацией из двух рестриктаз. Специфические адаптеры лигируют с "липкими" концами рестрикционных фрагментов. Затем эти фрагменты амплифицируют, используя праймеры, комплементарные последовательности адаптера и сайту рестрикции, и несущие дополнительно одно или более случайно выбранных оснований на их 3'-концах. Набор полученных фрагментов зависит от рестриктаз и случайно выбранных нуклеотидов на 3'-концах праймеров. Для разделения фрагментов используют агарозный или полиакриламидный гели (Voset. al., 1995).

AFLP – достаточно дешевый и надежный метод, используя который можно быстро генерировать сотни высоковоспроизводимых маркеров, случайно распределенных по всему геному. Для создания AFLP-карты генома не требуется знание его последовательности (Коновалов, 2006).

1.1.3.3 ДНК маркеры уникальных последовательностей

SCAR-маркеры

SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) или охарактеризованный секвенированием амплифицированный район (Kesseli et. al., 1992). Это основанные на ПЦР молекулярные маркеры, происходящие из RAPD- или ISSR-фрагментов, которые лишены большинства недостатков

RAPD-маркеров и применимы для разнообразных исследований (Jiang et. al., 1997; Weng et. al., 1998; Zijlstra et. al., 2000). По многочисленным наблюдениям, данные, полученные с помощью RAPD-анализа с использованием случайных праймеров, довольно относительноны в силу чувствительности этого метода к условиям реакции (Weeden et. al., 1993). Поэтому для изучения полиморфных RAPD-фрагментов и создания на их основе специфических ДНК-маркеров возникла необходимость перехода к классическому ПЦР-методу с использованием пары длинных праймеров, комплементарных определенной последовательности (Deng et. al., 1997; Kesseli et. al., 1992). С этой целью полиморфные RAPD-фрагменты (или ISSR-) вырезают из геля, клонируют и секвенируют. После секвенирования к концевым участкам фрагментов подбирают SCAR-праймеры длиной обычно 20-25 оснований (Коновалов, 2006).

CAPS

Методика CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences), также как и SCAR, относится к группе STS (Sequence Tagged Site), поскольку базируется на амплификации строго определенных фрагментов генома с известной последовательностью. Принцип метода таков: геномная ДНК амплифицируется с помощью пары высокоспецифичных праймеров, затем полученный фрагмент обрабатывается эндонуклеазой рестрикции; различия между геномами проявляются в виде разного количества и длин рестриктных фрагментов при электрофорезе в агарозном геле (Konieczny et. al., 1993).

SSR-маркеры

Микросателлиты, называемые также простыми повторяющимися последовательностями (Simple Sequence Repeats, SSRs) – это короткие tandemные повторы простых нуклеотидных мотивов, которые содержат от одного до десяти нуклеотидов в повторяющейся единице. Они встречаются во всех эукариотических геномах, причем у растений наиболее обычными повторами являются $(A)_n$, $(AT)_n$ и $(GA)_n$ мотивы, где n колеблется между 10 и 80 (Hicks et. al., 1998).

Микросателлиты - первые, полученные с использованием ПЦР, высокополиморфные маркеры для индивидуальных локусов, которые относят к диспергированным tandemно повторяющимся последовательностям.

Для создания SSR-маркеров подбираются праймеры к уникальным последовательностям ДНК, фланкирующим микросателлитный повтор, что требует предварительного знания их нуклеотидной последовательности. Длина полиморфного амплифицированного фрагмента потом визуализируется с помощью электрофореза в агарозном или полиакриламидном гелях. Полиморфизм возникает из-за разного числа tandemных повторов, вероятно вытекающих из проскальзывания репликации и/или неравных рекомбинаций (Burstin e tal., 2001).

Важной особенностью микросателлитов является то, что они эволюционируют быстрее, чем остальная ДНК, подвергаясь "динамичным мутациям", которые приводят к появлению аллелей с различным количеством повторяющихся единиц. Как следствие, микросателлиты очень полиморфны. Высокий полиморфизм в сочетании с повсеместным распространением и мультиаллелизмом делает их очень перспективными в качестве молекулярных маркеров (Nguyen et. al., 2005; Paniego et. al., 2005).

1.1.3.4 Маркеры, основанные на однонуклеотидном полиморфизме последовательности ДНК (SNP)

SNP-маркеры

SNP-маркеры представляют собой новое – третье по счету (после RFLP- и ПЦР-маркеров) поколение ДНК-маркеров.

SNP (SinglNucleotidePolymorphism) – полиморфизм единичного нуклеотидного сайта, или однонуклеотидный полиморфизм, чаще всего представлен двумя аллельными вариантами (заменами) однонуклеотидного сайта. Эти маркеры выявляют полиморфизм по принципу «±». Многочисленные однонуклеотидные замены порождаются точечными мутациями, инсерциями и делециями в участках ядерной и хлоропластной ДНК.

Общее число SNP на геном пшеницы и кукурузы может исчисляться миллионами, что позволяет различать индивидуальные организмы, оправдывая одно из определений ДНК-генотипирования – «метод отпечатков пальцев» (DNA fingerprinting).

По информативности и скорости выполнения анализа ни один из прежних методов анализа (RFLP-, RAPD-, SSR-, AFLP-анализ и другие) не могут сравниться с SNP-анализом (Романова и др., 2007).

1.2 Использование молекулярных маркеров в филогенетических и таксономических исследованиях, при изучении генетического разнообразия и паспортизации растений.

В последние годы ПЦР технологии получили эффективное применение в изучении многих плодовых культур. Основные направления их использования сводятся в основном к созданию насыщенных молекулярными маркерами генетических карт, установлению филогенетических отношений между культурными и дикорастущими видами - донорами ценных признаков, идентификации сортов и гибридов, маркированию локусов, контролирующих хозяйственно-ценные признаки (Maliepaard, 1998; Kenis, 2005; Hokanson, 2001; J.-M. Celton, 2009; Gianfranceschi, 1998, Guilford, 1997, Wang et. al., 2000, Hoepfher et. al., 1993, Dubrova et. al., 1998, Di Gaspero et. al., 2000; Moreno et. al., 1998, Charters et. al., 2000).

Широкое применение при изучении плодовых культур нашел RFLP-подход. Метод позволяет фиксировать изменения в последовательности сайтов рестрикции ДНК, вызванных мутациями, делециями, инсерциями, транслокациями или инверсиями; а также выявлять различия в характере метилирования нуклеотидных остатков (цитозина) в последовательности ДНК. Получаемые сложные картинки гибридизации геномной ДНК, характерные для каждой особи, выявляют индивидуальные различия. Этот метод получил название «геномной дактилоскопии» (Романова и др., 2007).

Полиморфные последовательности находят применение в исследованиях многих проблем: идентификации линейного материала, анализа мутаций, контроль уровня гомо- и гетерозиготности (Картель и др. 1991).

Для оценки связи между сортами плодовых культур с использованием метода RFLPs было сообщено многими исследователями. Рестрикционная характеристика использовалась для определения отношения между сортами вишни по хлоропластной ДНК (Wang et. al., 2000) и для исследования изменчивости рибосомальной ДНК у груши, алычи и терна (Reynders et. al., 1990).

Была выполнена сортовая идентификация и оценены генетические связи яблони, ежевики и малины методом гибридизации ДНК-образцов с пробой M13 (Hoerfher et. al., 1993). RFLPs обнаружили полиморфизм хлоропластной ДНК у персика (Dubrova et. al., 1998).

В последнее время в изучении генома яблони получил распространение метод маркирования простых (микросателлитных) повторов ДНК - SSR-технология (Weber et. al., 1989) и маркирования локусов между простыми повторами ДНК - ISSR-технология (Salimath et. al., 1995).

Простые повторы ДНК, как правило, связаны с межвидовым и межсортовым полиморфизмом. Наличие подобной вариабельности внутри повторяющихся сайтов получило распространение в филогенетических исследованиях яблони (Hokanson et. al., 1998), винограда (Di Gaspero et. al., 2000; Moreno et. al., 1998), персика (Cipriani et. al., 1999), какао (Charters et. al., 2000) и других культур. SSR-анализ уже успешно был применен на яблоне для выявления внутривидового полиморфизма и построения генетической карты вида *Malus domestica* (Gianfranceschi et. al., 1998; Guilford et. al., 1997; Hokanson et. al., 1998). Также SSR-маркеры показали высокий уровень генетического межсортового полиморфизма ДНК винограда (Sefc et. al., 2000), персика (Sosinski et. al., 2000), маслины (Rallo et. al., 2000) и др. плодовых культур.

Успешное применение в молекулярном маркировании нашел также метод AFLP (Zabeau et. al., 1993). Например, этот метод был использован для оценки генетических расстояний между различными видами груши (Monte-Corvo et. al., 2000), земляники (Degani, 2001), кофе, а также для поиска AFLP-маркеров *Vf* - гена устойчивости яблони к парше (Xu et. al., 2000).

С появлением в начале 90-х годов RAPD-технологии (Williams et. al., 1990) и благодаря ее простоте и относительно недорогим затратам при использовании, этот метод в последние годы становится все более популярным в исследованиях геномов различных растений. Применение RAPD-анализа получило широкое распространение при работе с однолетними и многолетними с/х культурами. В список исследуемых RAPD методом растений уже в 1995 г. были включены представители 87 родов (Weising et. al., 1995).

Большое количество публикаций посвящено значимости молекулярных маркеров, подобных RAPD, в таксономической классификации и типировании сортов плодовых культур. RAPD-маркеры успешно использовались для идентификации и установления генетических взаимоотношений у яблони (Heinkel et. al., 2000), черешни (Gerlach et. al., 1998; Stockinger et al., 1996) сливы (Bellini et al., 1998; Gregor et al., 1994; Ortiz et al., 1997; Shimada, 1996; Shimada et al., 1999) черной смородины (Lanham et. al., 1996), малины и ежевики (Соболев и др., 1995) крыжовника (Lanham et al., 2000) персика (Warburton et al., 1996) и абрикоса (Takeda. et al., 1998).

С помощью RAPD-маркеров отличили индуцированные мутанты черешни в родительской популяции (Yang et al., 1994). Большое количество работ посвящено изучению межсортового или межвидового полиморфизма ДНК у черной смородины (Lanham, 1996), сливы (Antonius-Klemova, 1999), вишни (Shimada T. et al., 1999) и груши (Monte-Corvo et al. 2000).

В 1994 году начал развиваться метод, названный *inter-simple sequence repeat* (ISSR-между повторяющимися простыми последовательностями). Такие праймеры избирательно амплифицируют фрагменты ДНК, которые

располагаются между двумя достаточно близко расположенными микросателлитными последовательностями (Романова и др., 2007).

Л. Гуало с сотрудниками использовали 6 ISSR-праймеров для характеристики сортов сливы. ISSR-фрагменты имели высокую воспроизводимость и полиморфизм. Маркеры данного типа применялись для паспортизации 28 сортов малины (Соболев и др., 2005, 2006). ISSRs успешно использовались для изучения генетической изменчивости черной смородины (Lanham et al., 2000) и груши (Monte-Corvo et. al., 2001).

1.3 Применение методов генетического маркирования и маркер-опосредованной селекции на плодовых культурах

Ключевым направлением применения молекулярных маркеров является маркерная помощь селекции. Благодаря их использованию широко внедряется в практику новое направление, получившее название маркер-опосредованной селекции (МОС). ДНК-маркеры успешно применяют, как на этапе подбора исходных источников для гибридизации, так и при последующем анализе гибридного материала и полученного сорта. ДНК-маркирование хозяйственно-ценных признаков позволяет вовлечь их в маркер опосредованную селекцию, призванную обеспечить более высокую эффективность, меньшую стоимость и меньшую продолжительность получения новых сортов и гибридов по сравнению с традиционными методами селекции (Тихонова, 2011).

Основной принцип маркер-опосредованной селекции изображен на рисунке 1.

Принцип Маркер-опосредованной селекции

отбор генотипов, несущих целевой ген, с помощью тесно-сцепленных с ним ДНК-маркеров



Или маркеров прямо идентифицирующих нужный аллель



Надежность отбора:

1 маркер: 100%

Рисунок 1 Основной принцип маркер-опосредованной селекции (Кудрявцев, 2009).

Принцип маркер-опосредованной селекции заключается в отборе генотипов, несущих целевой ген на основании данных о присутствии ДНК-маркеров, тесно сцепленных с ним. Рекомендуется использовать маркеры, расположенные в непосредственной близости к гену (в пределах 5сМ). При этом надёжность маркерного отбора возрастает при использовании фланкирующих (окружающих ген с двух сторон) маркеров или внутригенного маркера, напрямую идентифицирующего нужный аллель (Кудрявцев, 2009).

Молекулярные маркеры, используемые в маркер-опосредованной селекции, должны соответствовать ряду требований. Выделяют пять факторов, учитываемых при выборе маркера:

- надёжность - близкое расположение к гену (менее 5 сМ);
- требуемое качество и количество ДНК;

- техническая процедура анализа маркеров должна быть простой и не требовать значительного расхода времени;

- уровень полиморфизма, выявляемый данным типом маркеров;

- расходы на проведение анализа (Пикунова, 2012, Mackill & Ni 2000).

Одним из приоритетных направлений применения молекулярных маркеров в последнее время является работа по идентификации генов селекционно-значимых признаков у сельскохозяйственных растений, в том числе и у плодовых культур (Гостимский и др., 2005, Павловская и др., 2009, Ribaut et al., 2007, Jena et al., 2008, Tartarini et al., 2000, Bus et al., 2002, Hemmat et al., 2003, Liebhard et al., 2003).

Одной из наиболее разрабатываемой культурой является яблоня. На сегодняшний день разработаны молекулярные маркеры для генов устойчивости к парше (Afunian et al., 2004, Gardiner et al., 1996, Gygax et al., 2004, Koller et al., 2003, Soriano et al., 2009, Tartarini, 1999, Tartarini et al., 2000, Hemmat, 2003, Liebhard et al., 2003, Boudichevskaya et al., 2004, Patocchi et al., 2004, Patocchi et al., 2005), синтезу этилена (Harada et al., 2000; Sunako et al., 1999), тлям (Roche, Alston et al., 1997, Cevik and King, 2002, Bus and Chagné et al., 2008), мучнистой росе (Dunemann, Bracker et al., 1999, James and Evans, 2004), бактериальному ожогу вызываемому *Erwinia amylovora* (Khan et al., 2009), компактной формы кроны яблони (гена *Co*) (Hemmat et al., 1997; Cheng, 1997; Yi-Ke Tian, 2005; Форте, 2004).

Активно ведется работа с другими культурами. Идентифицированы несколько кандидатов в гены, контролирующих цветение миндаля (Silva, Garcia-Mas, 2005), найдены молекулярные маркеры генов устойчивости сливы (Lecouls, Rubio-Cabetas et al., 1999, Esmenjaud, 2009) и персика к нематод (Arús and Mnejja, 2004).

Однако, применение методов маркер-опосредованной селекции затрудняется (МОС) тем, что многие наиболее интересные признаки контролируются полигенно. Сложности разработки МОС для перечисленных признаков связаны с комплексностью их наследования, взаимодействием

между генами (эпистазом) и зависимостью экспрессии генов от окружающей среды. Тем не менее, на современном этапе МОС возможна как для признаков, контролируемых несколькими основными генами, так и для локусов, контролирующих количественные признаки (QTL) (Пикунова, 2011).

Разработка маркеров количественных признаков основана на создании расщепляющейся популяции; построении генетических карт, объединяющих фенотипические и молекулярные данные; выявление локусов, отвечающих за проявление количественных признаков; подтверждении позиции и эффекта данных локусов на различных популяциях; тестировании маркеров на важном селекционном материале (по Collard and Mackill, 2008).

Построение генетических карт – метод классической генетики основанный на определении групп сцепления, частоты рекомбинации, где единицей измерения служат проценты рекомбинации, или сантиморганы (Рахманалиев и др., 2004). Генетические карты на основе молекулярных маркеров конструируются путём анализа частоты рекомбинации аллелей молекулярных маркеров в потомстве от скрещивания двух родительских генотипов, между которыми выявлен полиморфизм нуклеотидной последовательности ДНК. От взаимного расположения двух маркеров относительно друг друга зависит вероятность рекомбинации между ними в процессе кроссинговера, которая прямо пропорциональна дистанции между ними (Потокина, Чесноков, 2005). Совмещение фенотипических данных и данных молекулярных маркеров позволяет увидеть относительное их расположение, обнаружить молекулярные маркеры генов хозяйственно-ценных признаков (Collard, Mackill, 2008).

1.4 Яблоня домашняя: особенности объекта и состояние исследований

1.4.1 Распространение и происхождение яблони домашней

Яблоня самая распространенная и значимая из всех плодовых культур. В настоящее время в мире насчитывается более 15 тысячи сортов яблони. В

нашей стране яблоня занимает около 74% площадей садов и является основной плодовой культурой (Пономаренко, 2013).

Широкое распространение яблони объясняется многими ценными хозяйственно-биологическими признаками, прежде всего, меньшей требовательностью к условиям произрастания и более высокой адаптивностью по сравнению с другими плодовыми культурами (Савельев, 2005).

Подсемейство *Maloideae* к которому относится яблоня включает 22-25 родов и около 600 видов, которые произрастают в основном в умеренной зоне северного полушария (Седов, 2008). Род *Malus*, принадлежащий к этому подсемейству, является наиболее важным в народнохозяйственном отношении. Этот род имеет широкое распространение в различных эколого-географических условиях. Ареал рода находится в пределах Европы, Азии и Северной Америки. Здесь находятся три основных центра генетического разнообразия:

- Переднеазиатский генетический центр, представленный видами: Яблоня лесная (*Malus sylvestris* (L) Mill.), Яблоня ранняя (*Malus praecox* (Pall.)), Яблоня восточная или кавказская (*Malus orientalis* Uglitzk), Яблоня домашняя или культурная (*Malus domestica* Borkh.);

- Восточно-Азиатский генетический центр, представленный видами: Яблоня сибирская (*Malus baccata* (L) Borkh.), Яблоня сикимская (*Malus sikkimensis* (Wenzig) Koehne), Яблоня переходная (*Malus transitoria* (Batal.) Schneid), Яблоня Зибольда (*Malus sieboldii* (Regel) Rend);

- Среднеазиатский генетический центр, в котором произрастает яблоня Сиверса (*Malus sieversii* (Ledeb) Roem);

- Северо-Американский генетический центр. Здесь произрастают виды: Яблоня айовская (*Malus ioensis* (Wood) Britt.), Яблоня венечная (*Malus coronauria* (L) Mill.), Яблоня узколистная (*Malus angustifolia* (Ait.) Michx.), Яблоня бурая (*Malus fusca* (Rafin.) Chneid.) (Седов, 2010).

Центром происхождения Яблони домашней является Среднеазиатский генетический центр (Pereira-Lorenzo, 2009). На основании данных, полученных в результате секвенирования генома яблони, выявлено, что предком *Malus domestica* является дикий вид *Malus sieversii* (Velasco et al, 2010).

В тоже время хорошая скрещиваемость между видами яблони различных секций рода *Malus* Mill. дает возможность предполагать, что яблоня домашняя имеет сложную межвидовую структуру полифилитического происхождения (Седов, 2011). Считают, что культурные сорта яблони представляют собой сложные гибриды между несколькими дикими видами (*Malus silvestris*, *Malus sieversii*, *Malus orientalis*, *Malus baccata*), которые произрастают в различных природно-климатических зонах. Среди таких гибридов наибольшую роль в развитии культурного плодоводства сыграли гибридные виды ($M \times prunifolia$, $M \times floribunda$, $M \times zumi$ и др.), которые возникли на границах ареалов и являются более устойчивыми и приспособленными чем чистые виды (Урбанович и др., 2010).

Род *Malus* принадлежит семейству *Rosaceae* трибы *Pyreae* и тесно связан с родами *Pyrus* и *Cydonia*, а также *Amelanchier*, *Aronia*, *Chaenomeles*, *Cotoneaster*, *Crateagus*, *Pyracantha*, *Sorbus* подсемейства *Maloideae*. Это подсемейство является аллополиплоидом, которое возникло путем скрещивания между *Spiraeoidae* ($x = 9$) и *Prunoidae* ($x = 8$) и привело к основному гаплоидному числу $x = 17$ для *Pomoidae*. Род *Malus* представлен диплоидами ($2n = 34$), но некоторые виды являются триплоидами (например, *M. hupehensis* и *M. coronaria*), или тетраплоидами (например, *M. sargentii*) (Gardiner et al, 2007).

1.4.2. Анализ генома яблони домашней

Секвенирование последовательности ДНК яблони домашней позволило выявить 57 386 предполагаемых генов. Значительную долю генома составляют повторяющиеся последовательности. При этом незначительна

доля мобильных элементов, что характерно для большинства растений, геном которых более чем на 50% состоит из транспозонов (Velasco et al, 2010).

Растения яблони гетерозиготны по многим генам, что вызывает затруднения для изучения многих признаков и анализа потомства.

Известно более 40 главных генов яблони наиболее часто используемых в селекции (табл. 1).

Таблица 1. Гены, идентифицированные у яблони (по Седову, 2011)

Символы	Эффект гена	Источник
1	2	3
$a_1a_2a_3$	Желтая крапчатость (мозаичность)	Worcester
<i>ape</i>	Безлепестность. Wellington Bloomless	Spencer Seedless
<i>at</i>	Атрофированный венчик	Melrose
C_1	Альбинизм	Rev. Wilks
Ca_a, Ca_b	Опадающая чашечка	M. zumi Rehd
<i>Co</i>	Компактный габитус	Mcintosh Wijcik
Bp_1, Bp_2	Устойчивость к горькойямчатости	Coop 11, PCP 10-16
$bu_1 bu_2 (ttuu)$	Образование бернотов	Northern Spy521. Starkrimson
d_1, d_2d_3, d_4	Карликовость	Northern Spy. Ottawa
<i>Er</i>	Устойчивость к кровавой тле	Northern Spy
<i>Gb</i>	Чувствительность к горькойгнили	Golden Delicious
<i>Gy</i>	Устойчивость к ржавчине	McIntosh
<i>I</i>	Летальный ген бледно-зеленой окраски	Northern Spy
<i>Ma</i>	Содержание яблочной кислоты	Lord Lamboume
<i>nb</i>	Некротическая кора	Rainette du Mans
P_1	Пыльцевая деталь	Reale du Entravques
P_2	То же	Transparente de croncels
P_3	То же	Germaine (Loire)
P_4	То же	Carrey
P_5	То же	Cellini
<i>Pc</i>	Устойчивость к фитофторозу	Northern Spy
<i>Pd</i>	Сдвоенные Лепестки	Dorothea
Pl_1	Устойчивость к мучнистой росе	M. robusta Mai. 59/9
Pl_2	То же	M. zumi Mai. 68/5
Ps_1	Восприимчивость к пятнистости	Jonathan
Ps_2	То же	Idared
<i>Rf</i>	Наличие антоциана в коже плодов	Worcester
R_t	Пурпуровая пигментация	Baskatong
<i>Ru</i>	Оржавленность плодов	D' Arcy Spice
$S^1S^2S^3$	Несовместимость (множествен. аллели)	Northern Spy
<i>Sb</i>	Присутствие снеболдина	M. floribunda 821
Sd_1	Устойчивость к 1-му и 2-му биотипам красногалловой тли	Cox's Orange Pippin
Sd_2	Устойчивость к 1-му биотипу тли	Northern Spy
Sd_3	Устойчивость к 1,2 и 3-му биотипам тли	M. robusta Mai. 59/
Sm_h	Сверхчувствит. к подорожниковойтле	M. robusta Mai. 59/9

Продолжение таблицы 1

1	2	3
<i>Va</i>	Устойчивость к парше	AntonovkaPl 172612
<i>Vb</i>	То же	<i>M. baccata</i> Dolgo
<i>Vbj</i>	То же	<i>M. baccata jackii</i> Dg R27T1
<i>Vf</i>	То же	<i>M. floribunda</i> 821
<i>Vm</i>	То же	<i>M. micromalus</i> 245-38
<i>Vr</i>	То же	Russian seedling R12740-7A
<i>W</i>	Пониклый габитус	<i>M. baccata gracilis</i>

Большая часть молекулярных исследований до настоящего времени сосредоточилась на создании насыщенных молекулярными маркерами генетических карт, изучении полиморфизма ДНК, установлении филогенетических отношений между сортами, а также между культурными и дикорастущими видами - донорами ценных признаков. Значительная часть работ посвящена идентификации сортов, гибридных форм яблони и выявлению маркеров генов, контролирующих хозяйственно-ценные признаки.

Первые работы по идентификации сортов яблони были основаны на анализе систем изоферментов, таких как аспартатаминотрансфераза и фосфоглюкомутаза. Однако, имеются ограничения в применении этого типа маркеров. Прежде всего, это то, что анализ белков позволяет исследовать полиморфизм только белок-кодирующих последовательностей и только у экспрессирующихся генов. Если учесть, что у высших эукариот всего около 1% генома составляют белок-кодирующие последовательности, очевидно, что от внимания исследователей ускользает основная часть генома. При этом из анализа исключаются такие функционально-значимые участки, как промоторные области, энхансеры, различные сайты регуляции, расположенные в интронах, нетранслируемых областях генов, а также вне генов, часто на значительном расстоянии от кодирующей последовательности (Schuyler et. al., 2009).

Возможности указанного метода ограничиваются также низким уровнем белкового полиморфизма в популяциях культурных растений,

ограничениями в выборе биологического материала и времени его сбора. В частности ограничения данного метода отмечены для яблони (Бирюк, Козловская, 2002).

Наличие подходящих генетических маркеров, имеет значение для эффективного отбора и размножения сортов яблони высокого качества и устойчивых к заболеваниям. Широкое распространение получил анализ маркеров на основе простых повторяющихся последовательностей ДНК (микросателлитов). Микросателлитные маркеры характеризуются кодоминантностью, высокой полиморфностью и надежной воспроизводимостью. Этот тип маркеров наиболее удобен для построения генетических карт (Liebhard, 2002, 2003; Silfverberg-Dilworth, 2006; Maliepaard, 1998; Kenis, 2005; Hokanson, 2001; J.-M. Celton, 2009; Gianfranceschi, 1998).

Многие авторы используют простые повторяющиеся последовательности для анализа генетического разнообразия сортов и видов яблони. Hokanson и соавторы проанализировали коллекцию из 66 сортов яблони домашней с использованием 8 пар микросателлитных маркеров. Выявлен значительный уровень вариации, в среднем 12,1 аллелей на локус (Hokanson, 1998). Высокий уровень полиморфизма и простое менделевское наследование показали SSR-маркеры при анализе 21 культурного сорта яблони. При этом для дифференцировки всех исследуемых сортов было достаточно только трех маркеров (Guilford, 1997).

119 аллелей позволил идентифицировать SSR-анализ в коллекции из 114 местных культурных сортов яблони с Северо-запада Испании. Из них 10 аллелей оказались уникальными с частотами ниже, чем 0.01 (Pereira-Lorenzo, 2007).

Молекулярные маркеры используют в различных программах по картированию многих хозяйственно-важных признаков яблони. Одной из таких программ является проект D.A.R.E. (Durable Apple Resistance in Europe), по маркированию генов устойчивости яблони к возбудителю парши -

Venturia inaequalis и возбудителю мучнистой росы - *Podosphaera leucoticha*, начавший свою работу в 1998 году и рассчитанный на 4 года (Lespinasse et al., 1999). В рамках этого проекта были задействованы многие маркерные системы: изоферментные локусы, RFLP, AFLP, SSR, RAPD.

Одной из наиболее часто применяемых в исследовании генома яблони маркерных систем, являются RAPD маркеры. Этот тип маркеров использовали в работах по идентификации гена окраски кожицы плода яблони (Cheng, 1996). Авторами на основании молекулярного анализа гибридных популяций было сделано предположение о моногенном наследовании красной и желтой антоциановой окраски плода, причем красная окраска является доминантным признаком.

RAPD маркеры интенсивно использованы при идентификации гена компактной формы кроны яблони (гена *Co*) (Hemmat et al., 1997; Cheng, 1997; Yi-Ke Tian, 2005 Форте, 2004). Ген колонновидного типа кроны является доминантным и впервые выявлен у сорта Мекинтош “Важек”. Этот ген представляет особый интерес для селекционеров, так как деревья с компактным типом кроны начинают раньше плодоносить и удобны для ухода и сбора урожая. Колонновидные сорта яблони из-за их высокой скороплодности и продуктивности (более 400т\га) пригодны для создания суперинтенсивных садов нового поколения (Кичина, 2006).

Широкое распространение RAPD метода нашло в маркировании генов, отвечающих за устойчивость к болезням и вредителям яблони, например, для поиска маркеров, сцепленных с геном *Sd₁*, ответственным за устойчивость яблони к красногалловой тле (Roche et al., 1997) или для идентификации маркеров, сцепленных с геном *Pl₁*, контролирующим устойчивость яблони к мучнистой росе (Markussen, 1995).

Однако наиболее интенсивная работа ведется по изучению устойчивости к возбудителю парши яблони *Venturia. inaequalis*. В условиях средней полосы России, особенно в эпифитотийные годы, это заболевание причиняет значительный ущерб насаждениям яблони (Савельев, 2009).

Из всех болезней плодовых культур парша яблони является наиболее вредоносной и широко распространенной. Гриб, вызывающий заболевание, поражает листья, черешки, цветки, плоды, плодоножки и побеги (прирост текущего года) яблони.

Известно, что, по крайней мере, 11 хромосом содержат различные факторы устойчивости к парше (основные гены или QTLs) (LG 2 (*Vr1/Vh4/Vx*, *Vr2*, *Vbj*, *Vh2*, *Vh8*, *VT57*), LG 10 (*Vd*), LG 12 (*Vb* и *Vg*) и LG 17) (*Vm*)). Однако основные гены устойчивости, наиболее часто используемые в селекции, были выявлены на первой хромосоме (*Vf* и *Va*) (Boudichevskaja, 2009).

До недавнего времени было известно 6 вирулентных рас парши, поражающих растения. Однако предполагается, что существует 7 раса способная преодолеть ранее известные типы устойчивости (Савельев, 2009).

На сегодняшний день установлен генетический контроль устойчивости к парше, а также идентифицирован ряд неаллельных генов резистентности у следующих видов яблони: *Vf* – *M. Floribunda*821, *Vm* – *M. micromalus*245-38, *Va* – Антоновка PI172623, *Vb* – *M.baccata*Dolgo, *Vbj* – *M.baccatajackii*DgR 27T1, *Vr* – RussianseedlingR12740-7A. Выявление 7 расы позволило идентифицировать доминантный ген *Vg*, контролирующей устойчивость к 7 расе парши у Голден Делишес (Савельев, 2009).

Наиболее широко применяется в селекционных программах стран Америки, Западной и Восточной Европы интродукция гена *Vf*. Сорта и формы яблони с данным геном сохраняют устойчивость уже на протяжении более 60 лет (Седов и др., 1983; Жданов и др., 1992; Савельев, 2009).

Выявлено много молекулярных маркеров, идентифицирующих ген устойчивости к парше *Vf*, полученный от *Malus floribunda* 821, сеянца четвертого поколения, *Malus floribunda* (таблица 3). Этот ген кодирует устойчивость к пяти расам патогена. Гены *Vfa* 1, *Vfa* 2, *Vfa* 3, *Vfa* 4 кодируют белки, богатые лейцином, которые находятся в трансмембранной области (Киселев, 2010).

Таблица 2. Основные молекулярные маркеры гена устойчивости яблони к парше *Vf* (Киселев, 2010; Gau et al., 2004)

Номер	Тип маркера	Название маркера	Расстояние, сМ
1	RAPD	OPM18	10,6
2	RAPD	OPU01	19,7
3	RAPD	OPD20	19,0
4	RAPD	OPA15	—
5	CAPS	OPM18	1,9
6	SCAR	OPU01	4,0
7	RAPD	OPH01	10,0
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	SCAR	OPAM19	0,9
18	SCAR	OPAL07	0,9
19	AFLP	EA9MC15-1	0,2
20	AFLP	EA4MG1-1	0,2
21	AFLP	EA16MG2-1	0,2
22	AFLP	ET4MC14-1	0,2
23	AFLP	ET8MG16-1	0,2
24	AFLP	ET3MG10-2	0,2
25	AFLP	ET10MG8-1	0,2

Первые исследования по маркированию гена *Vf* были выполнены с использованием полиморфизма изоферментов. Например, идентифицированный изоферментный локус *Pgm-1*, контролирующей активность фосфоглюкомутазы у яблони, был тесно сцеплен с геном *Vf* и расположен от него на генетическом расстоянии 6 сМ (Manganaris et al., 1994). Впервые работа по идентификации ДНК-маркеров, сцепленных с

геном *Vf*, были опубликованы в 1994 году одновременно двумя исследовательскими группами (Gianfranceschi et al., 1994; Yang et al., 1994). В результате их работы был обнаружен RAPD-фрагмент с молекулярной массой 600 п.н. Несмотря на то, что степень сцепления найденного маркера с геном *Vf* оказалась низкой (20% рекомбинаций), опыт этих первых работ был учтен в последующих исследованиях. Так, американскими исследователями были использованы почти двести RAPD праймеров для скрининга сортов и гибридных форм яблони для создания маркеров, связанных с геном *Vf*. В результате работы был выявлен маркер ОРК16/1300, который связан с геном устойчивости с частотой рекомбинации 4,3%. (Yang et al., 1997).

Интенсивно ведется работа по созданию генетических карт вокруг области гена *Vf*. Гардинером и коллегами была опубликована карта сцепления RAPD маркеров распространяющихся примерно на 28 сМ по обе стороны вокруг региона гена *Vf* (Gardiner et al., 1996). Использование метода AFLP позволило идентифицировать 15 маркеров тесно связанных с геном *Vf* и расположенных на расстоянии 0.6 сМ вокруг области гена (Xu. et al., 2000).

Маркирование гена *Vf* является наиболее актуальным направлением в изучении генома яблони, так как обеспечит ускоренный отбор перспективных форм и создание новых устойчивых сортов. Так Винатзер и соавторы. (Vinatzer et al., 1998) клонировали группу рецептор-подобных генов в локусе *Vf* у сорта Флорина: *HcrVf1*, *HcrVf2*, *HcrVf3* и *HcrVf4*. Однако было не ясно, какой из этих генов ответственен за устойчивость. При клонировании четырех сходных генов (*Vfa1*- *Vfa4*) в *Vf*-локусе *Malus floribunda* 821 оказалось, что непосредственно за иммунитет к заболеванию отвечает ген *Vfa4* (Xu & Korban, 2000).

Идентифицированы также маркеры и других генов, отвечающих за иммунитет к парше. Так, например, были выявлены два маркера гена *Vm*, расположенного на 17 хромосоме яблони. Наиболее близко к гену устойчивости расположен микросателлитный маркер *Hi07h02*. На расстоянии 5 сМ расположен также SCAR маркер ОРВ12₆₈₇. Оба маркера дают четкие и

повторяющиеся фрагменты, позволяющие идентифицировать ген *Vm* (Patocchi et al., 2005). Найдены также SSR маркеры для выявления гена *Vbj* (Gygax et al., 2004), гена *Vd* (Soriano et al., 2009)

Одной из важных характеристик сортов яблони является продолжительность хранения плодов. Культурные сорта яблони по длительности хранения различаются: некоторые сорта требуют немедленного помещения в камеры после сбора, так как особенно быстро теряют свои товарные качества, в то время как другие способны к длительному хранению без особых условий. Этилен является ключевым регулирующим созревание яблок фактором, и подавление биосинтеза этилена и его действия является основным механизмом продления сроков хранения в контролируемых условиях. Показано, что биосинтез этилена в плодах яблони различных сортов варьирует в больших пределах и установлено влияние этого варьирования на лежкость плодов (Супрун, 2013). Ф. Коста и соавторами были разработаны STS- маркеры генов *Md-ACO1* и *Md-ACS1*, вовлеченных в биосинтез этилена в плодах яблони. В результате проведенной работы было выяснено, что все растения, являющиеся гомозиготными по аллелям *Md-ACS1-2* и *MD-ACO1-1*, синтезируют небольшое количество этилена, и плоды после сбора урожая теряют степень твердости незначительно (Costa et al., 2005). Аналогичные данные получены и другими авторами (Harada et al., 2000; Sunako et al., 1999).

Срок сохранности плодов зависит от степени зрелости яблока. Созревание фруктов - сложный процесс из биохимических и физиологических изменений, происходящих в конце стадии развития плода. Среди этих сложных процессов, потеря хрустящих свойств яблока является одним из наиболее важных изменений. Смягчение фруктов – процесс, происходящий из-за деполимеризации различных классов полисахаридов. Экспансин – белок, участвующий в нарушении нековалентных связей между матрицей гемицеллюлозы и целлюлозы микрофибрилл. Тем самым он способствует воздействию ферментов на клеточную стенку и подвергает ее

разрушению (McQueen-Mason et al., 2006). Для гена, вовлеченного в биосинтез экспансина у яблони, был разработан функциональный микросателлитный маркер, который позволил идентифицировать 3 аллельных состояния гена *MD-Exp7*. Низкому синтезу экспансина в плодах соответствует присутствие только одного аллеля (Costa et. al., 2008).

Таким образом, современные методы исследования генома растений позволяют создавать новые подходы для селекции сельскохозяйственных культур. Аналитический обзор современной литературы показал, что широкое применение методов молекулярной биологии, в частности ПЦР-анализа, значительно расширяют возможности селекционеров. Применение систем молекулярных маркеров позволяет изучать полиморфизм ДНК, устанавливать генетические взаимоотношения, выявлять гены хозяйственно-ценных признаков, что является актуальным направлением в селекции плодовых культур.

Глава II Материалы и методы

2.1 Исходный материал

Работа выполнена во Всероссийском научно-исследовательском институте генетики и селекции плодовых растений им. И.В. Мичурина и Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова в 2009 – 2012 годах.

Биологическими объектами исследования послужили сорта и гибридные формы яблони из коллекции ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина. Краткая характеристика исходного материала приведена в таблице 3.

Таблица 3 Сорта и формы яблони, используемые в работе

№ п/п	Сорт	Страна происхождения	Происхождение
1	2	3	4
Сорта российской селекции			
	Антоновка обыкновенная	Россия	Народная селекция
2	Антоновка шестисотграммовая	Россия	Клон Антоновки могилевской
3	Аркад летний	Россия	Сорт неизвестного происхождения
4	Аркад зимний	Россия	Яблоня Надзвецкого × Антоновка обыкновенная.
5	Благовест	Россия	Прима × Бессемянка мичуринская
6	Бессемянка мичуринская	Россия	Скрыжапель × Бессемянка комсинская
7	Успенское	Россия	Прима × Бессемянка мичуринская
8	Болотовское	Россия	Скрыжапель × 1924 (IV поколение от яблони обильноцветущей)
9	Бельфлер-китайка	Россия	Бельфлер желтый × крупноплодная китайка
10	Большак	Россия	Апорт × Славянка
11	Васюган	Россия	Брусничное × KB5
12	Веняминовское	Россия	Семена от свободного опыления иммунной формы 814

Таблица 3 (продолжение)

1	2	3	4
13	Дочь коричневого	Россия	Коричное× китайская сливолистная яблоня.
14	Есаул Ермака	Россия	Сеянцы крупноплодной китайки
15	Жигулевское	Россия	Боровинка обыкновенная × Вагнер призовой.
16	Золотая китайка	Россия	Налив белый × китайская сливолистная яблоня.
17	Зимнее полосатое	Россия	Боровинка × Ренет шампанский.
18	Рождественское	Россия	Уэлси × ВМ41497
24	Краснознаменное	Россия	Шампанрен-китайки × Яхонтовое.
25	Феникс алтайский	Россия	Сорт отобран среди сеянцев от свободного опыления сорта Бельфлер-феникс.
26	Парадизка мичуринская	Россия	<i>Malus primifolia</i> W. × <i>Malus paradisiaca</i> Med.
27	Малюха	Россия	Сорт получен от гибридизации донора колонновидности КВ 103 с сортом Брусничное.
28	Мирон сахарный	Россия	Старинный сорт народной селекции.
29	Мичуринец	Россия	Сорт получен на Крымской опытной станции.
30	Останкино	Россия	Обильное × Ваяк
31	Трувор	Россия	Скрижапель × Ренет бленгеймский.
32	Таежное	Россия	Кандиль-китайка × <i>M. baccata</i>
34	Шаропай	Россия	Старинный сорт народной селекции. Впервые был распространен на Дальнем Востоке
35	Шафран-китайка	Россия	Ренета Орлеанский × Китайская садовая яблоня
36	Яхонтовое	Россия	Яблоня Недзвецкого × Антоновка обыкновенная
37	Бельфлер-рекорд	Россия	Бельфлер-китайка × Яхонтовое

Таблица 3 (продолжение)

1	2	3	4
38	Свежесть	Россия	Антоновка краснобочка × PR12T67 (Уэлси × F2 <i>M. floribunda</i>)
39	Флагман	Россия	Богатырь × Скала
40	Пепин шафранный	Россия	Ренет орлеанский × (Пепинка литовская × китайка).
41	Полинка	Россия	Получен от скрещивания Богатыря, выращенного из кроны и корня (Богатырь - крона × Богатырь - корни)
42	Осеннее полосатое	Россия	Сорт народной селекции
43	Северная зорька	Россия	Китайка Красная × Кандиль-китайка.
Сорта зарубежной селекции			
44	Бребурн (Braeburn)	Новая Зеландия	Происхождение не установлено, вероятно, получено в результате случайного скрещивания. Возможными предками считаются сорта Леди Гамильтон и Грэнни Смит.
45	Гала (Gala)	Новая Зеландия	Киддс Оранж Ред × Голден Делишес.
46	Гренни Смит (Granny smith)	Новая Зеландия	Происхождение неизвестно.
47	Голден делишес (Golden Delicious)	США	Сеянец неизвестного происхождения.
48	Прима (Prima)	США	В происхождении сорта принимали участие: <i>M. floribunda</i> 821 и сорта – Уэлси, Мелба, Ром Бьюти, Голден делишес и их производные.
49	Лавиа	Финляндия	Неизвестно
50	Мантет (Mantet)	Канада	Сорт получен из семян от свободного опыления старинного русского сорта Титовка.
51	Мекинтош (McIntosh)	Канада	Считается, что этот сорт был получен из сорта Снежные яблоки, известного также как Феймюс

Таблица 3 (продолжение)

1	2	3	4
52	Надзейны	Белоруссия	ВМ41497 × Антей
53	Украинское	Украина	Папировка × Мекинтош
54	Фуджи (Fuji)	Япония	Рале Жанет × Ред Делишес
55	Спартан (Spartan)	Канада	Мекинтош × Желтый Ньютаун
56	Сябрина	Белоруссия	Лобо × Прима
57	Хувитус	Финляндия	Неизвестно
58	Фридом (Freedom)	США	Скращивание сеянцев NY 18492 (Мекаун × Антоновка) и NY 49821 (Голден Делишес × F2 26829—2—2)
59	Тилеймон (Tileymon)	Англия	Важак × Голден Делишес
Гибридные формы			
60	11-6-2	Россия	Сеянец от свободного опыления сорта Важак
61	3-19	Россия	Красуля × Важак
62	Х-3	Россия	Сеянец от свободного опыления сорта Важак
63	10-16	Россия	Бессемянка мичуринская × Важак
64	10-18	Россия	Бессемянка мичуринская × Важак
Дикорастущие виды			
65	<i>Malus sargentii</i>		-
66	<i>Malus pumila</i>	-	-
67	<i>Malus ringo</i>	-	<i>Malus spectabilis</i> × <i>Malus sieversii</i>
68	<i>Malus cerasifera</i>	-	<i>Malus baccata</i> × <i>Malus domestica</i>
69	<i>Malus robusta</i>	-	<i>Malus baccata</i> × <i>Malus prunifolia</i>
70	<i>Malus baccata</i>	-	-

2.2 Выделение геномной ДНК

Для выделения ДНК брали молодые, здоровые листья яблони с верхушечной части побега или начинающие распускаться почки по одному образцу для каждого сорта.

Экстрагирование ДНК было проведено по протоколу предложенному Эдвардсом (Edwards et. al., 1991) в модификации Форте (Форте, 2004) с применением очистки от полифенольных соединений хлоридом лития. Кроме того использовали методику Puchooa (Puchooa, 2004) адаптированную для работы с растительным материалом с высоким содержанием фенольных соединений (приложение 1).

2.3 Полимеразная цепная реакция

Аmplификацию проводили в приборе GeneAmp 9700 производства фирмы «Applied Biosystems» или ДТ-96 фирмы «ДНК-технология».

Реакционная смесь для ПЦР со всеми используемыми праймерами объемом 15 мкл содержала: 20 нг ДНК, 1,5 мМ dNTP, 2,5 мМ MgSO₄, 10 пМ каждого праймера, 1 ед. Taq-полимеразы и 10хстандартного ПЦР-буфера.

Для анализа коллекции сортов и гибридных форм яблони нами был проведен поиск наиболее продуктивных маркеров гена *Vf* в литературных источниках. Для определения наличия гена *Vf* использован маркер *VfC* полученный на основе исследования первичной последовательности гомологичных членов *HcrVf* семьи, расположенных в *Vf* локусе первой хромосомы (Afunian et al., 2004).

Для идентификации гена *Vf* использовали ПЦР с праймерами *VfC1* и *VfC2*. Амплификацию проводили в режиме: 94⁰С – 4 мин, 30 циклов: 94⁰С – 1 мин, 58⁰С – 1 мин, 72⁰С – 1 мин; 72⁰С – 7 мин (Afunianetal., 2004).

Для идентификации генов, вовлеченных в биосинтез этилена, использовали маркеры *Md-ACO1* и *Md-ACS1*. Реакцию проводили по следующей программе: 94⁰С – 2 мин, 35 циклов: 65⁰С – 45 с, 72⁰С – 2 мин, 94⁰С – 45 с; 1 цикл: 65⁰С – 45 с; 72⁰С – 10 мин. (Costa, 2005).

Ген, вовлеченный в синтез экспансина в плодах яблони, выявляли, используя маркер *MD-Exp7^{SSR}*. ПЦР-реакция была проведена по следующей программе: 94⁰С – 120с, 35 циклов: 52⁰С – 45с, 72⁰С – 120с, 94⁰С – 30с; 1 цикл 52⁰С – 45с, 72⁰С – 10 мин. (Costa, 2008).

Анализ генетического полиморфизма сортов и гибридных форм яблони проводили с использованием микросателлитных праймеров (Таблица 4). Реакцию проводили по следующей программе: 94⁰С – 2мин 30с; 4 цикла: 65⁰С – 30с , 72⁰С – 1 мин при этом температура отжига праймера с каждым циклом понижается на 1⁰С; 30 циклов: 94⁰С – 30с, 60⁰С – 1 мин, 72⁰С – 1 мин; 72⁰С – 5 мин. (Gianfranceschi, 1998).

Таблица 4. Характеристика микросателлитных локусов, использованных в работе (по Liebhard, 2002; Costa, 2008)

Название	Прямая последовательность (5'-3')	Обратная последовательность (5'-3')	Размер фрагментов	Число аллелей	Тип маркера	Группа сцепления
CH01f03b	gag aag caa atg caa aac cc	ctc ccc ggc tcc tat tct ac	139–183	7	Монолокусный	9
CH03d11	acc cca cag aaa cct tct cc	caa ctg caa gaa tcg cag ag	115–181	6	Монолокусный	10
CH04e03	ttg aag atg ttt ggc tgt gc	tgc atg tct gtc tcc tcc at	179–222	11	Монолокусный	5
COL	agg aga aag gcg ttt acc tg	gac tca ttc ttc gtc gtc act g	220–240	5	Монолокусный	10
CH02c02b	tgc atg cat gga aac gac	tgg aaa aag tca cac tgc tcc	78–126	5	Монолокусный	4
CH02g04	ttt tac ctt ttt acg tac ttg agc g	agg caa aac tct gca agt cc	132–197	7	Монолокусный	17
CH03d12	gcc cag aag caa taa gta aac c	att gct cca tgc ata aag gg	108–154	7	Монолокусный	6
CH03d07	caa atc aat gca aaa ctg tca	ggc ttc tgg cca tga ttt ta	186–226	8	Монолокусный	6
CH03d01	cgc acc aca aat cca act c	aga gtc aga agc aca gcc tc	95–115	7	Монолокусный	2
CH03d08	cat cag tct ctt gca ctg gaa a	tag ggc tag gga gag atg atg a	129–161	5	Монолокусный	14
Ch05g03	gct ttg aat gga tac agg aac c	cct gtc tca tgg cat tgt tg	135–192	6	Монолокусный	17
CH05g08	cca aga cca agg caa cat tt	ccc ttc acc tca ttc tca cc	161–179	5	Монолокусный	1
CH04c07	ggc ctt cca tgt ctc aga ag	cct cat gcc ctc cac taa ca	98–135	8	Монолокусный	14
CH03a04	gac gca taa ctt ctc ttc cac c	tca agg tgt gct aga caa gga g	92–124	11	Монолокусный	5
MD-Exp7 ^{SSR}	cat aga agg tgg cat gag ca	ttt ctc ctc aca ccc aaa cc	198–220	8	Мультилокусный	

2.5 Фракционирование фрагментов ДНК

Разделение продуктов амплификации с праймерами VfC, Md-ACO1 и Md-ACS1 проводили путем электрофореза в агарозном геле. В качестве буферной системы использовали 1xTBE. Для приготовления геля использовали агарозу Amresco Type I. в конечной концентрации 2%. Для визуализации ДНК в гель добавляли раствор бромистого этидия до конечной концентрации 0,005%. Напряженность электрического поля при электрофорезе составляла 3,9-4,5В/см. После электрофореза гели анализировали в ультрафиолетовом свете с использованием трансиллюминатора и фотографировали с использованием цифровой фотокамеры. Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали маркер молекулярной массы: 100bp+1,5Kb+3Kb (СибЭнзим) (0,05 г/л). Для удобства нанесения образцов на гель и наблюдения за ходом фракционирования, непосредственно перед электрофорезом их смешивали с раствором бромфенолового синего в глицерине (2:1). Этой смеси на гель наносили по 5 мкл.

Разделение продуктов амплификации с микросателлитными праймерами проводили путем электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в камере для вертикального электрофореза Sequi-gen GT system (BIO-RAD). В качестве буферной системы использовали TBE. Проявляли гель, используя метод окрашивания нитратом серебра (Benbouzaetal., 2006). ПЦР продукты предварительно визуализировали на агарозном геле, чтобы подтвердить, что амплификация прошла успешно. После этого амплификат разделяли методом электрофореза в 6% полиакриламидном геле. Данный метод позволил разделить фрагменты, отличающиеся на 1 пару нуклеотидов. Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали маркер молекулярной массы 10bp DNA ladder (Invitrogen) (0,05 г/л). После просушивания геля просматривали его на световом столике, фотографировали и анализировали.

2.6 Анализ результатов и статистическая обработка данных

В статистический анализ были включены только четкие, воспроизводимые фрагменты.

Результаты микросателлитного анализа были использованы для определения полиморфизма ДНК. Показатель генетического разнообразия рассчитывали по Нею:

$H=1-\sum p_i^2$, где H – коэффициент полиморфизма, p_i – частота аллелей (Nei, 1973).

Для количественной оценки полиморфизма полученные данные были представлены в виде матрицы состояний бинарных признаков, в которых наличие или отсутствие в электрофоретических спектрах одинаковых по размеру ампликонов рассматривалось как состояние 1 или 0 соответственно. Построение дендрограмм выполнено с использованием программы Past.

Расчет генетических расстояний (GD) проводили с использованием коэффициента различий Дайсона. В качестве дистанционного метода построения филогенетических деревьев использовался UPGMA анализ (метод попарного внутригруппового невзвешенного среднего - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Кластерный UPGMA анализ в качестве правила объединения или связи двух кластеров использует невзвешенное попарное среднее. Общий принцип метода заключается в попарном сравнении объектов и построении матрицы дистанций, которая затем используется для построения филогенетического дерева.

2.7 Секвенирование

Секвенирование было проведено с помощью автоматического секвенатора Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer в Институте Молекулярной Биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. Обработка результатов секвенирования проведена с использованием пакета программ MEGA5.0 и Chromas 4.0.

ГЛАВА III Результаты и обсуждение

3.1 Оценка генетического разнообразия яблони с использованием анализа микросателлитов

Для оценки вариабельности генома яблони был использован SSR-анализ. Проанализировано 15 микросателлитных локусов на 71 растении отечественных и зарубежных сортов и форм яблони. Выбранные локусы характеризовались высоким уровнем информативности. Число аллелей на локус варьировало от 10 (для локуса CH02c02b) до 20 (для локуса CH03d07), что дает возможность выявлять межсортовой полиморфизм. Использование отобранных праймеров позволило получить для каждого исследуемого образца яблони воспроизводимые специфичные полиморфные электрофоретические спектры SSR фрагментов (рис. 2, 3).

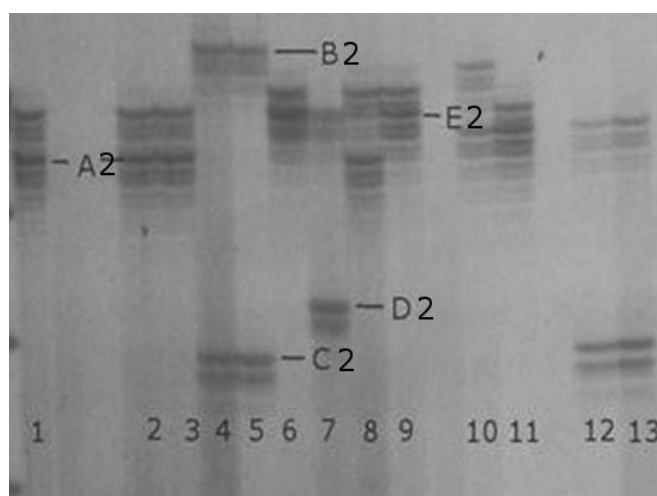


Рис. 2 Аллельное разнообразие по локусу CH02c02b у сортов и форм яблони
1 – Голден делишес; 2 – 10-18; 3 – Останкино; 4 – 10-16; 5 – Х-3; 6 – 3-19; 7 – Васюган; 8 – 11-6-2; 9 – Тилеймон; 10 – Малюха; 11 – Коричное полосатое; 12 – Мекинтош; 13 – Гренни Смит
A2-E2 – аллельные варианты

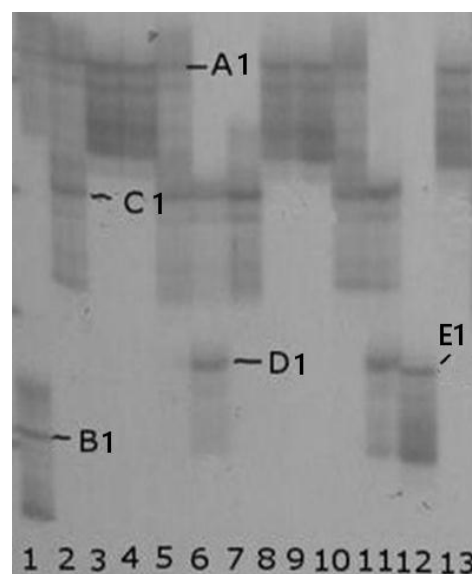


Рис. 3 Аллельное разнообразие по локусу CH01f03b у сортов и форм яблони
1 – Голден делишес; 2 – 10-18; 3 – Останкино; 4 – 10-16; 5 – Х-3; 6 – 3-19; 7 – Васюган; 8 – 11-6-2; 9 – Тилеймон; 10 – Малюха; 11 – Коричное полосатое; 12 – Мекинтош; 13 – Гренни Смит
A1-E1 – аллельные варианты

Всего было выявлено 217 SSRфрагментов размером от 76 до 250 п.н. Значительная часть выявляемых аллелей относится к редким, то

есть встречались только один раз среди анализируемых генотипов. Например, в локусе CH02g04 из 18 детектируемых аллелей 6 (размером 178, 185, 186, 189, 191 и 194 п.н.) можно отнести к редким, так как они обнаружены только у одного из анализируемых генотипов, тогда как аллель длиной 199 п.н. встречается у 19 образцов.

Высокий уровень полиморфизма микросателлитных локусов генома яблони уже отмечался ранее некоторыми исследователями при анализе коллекции сортов и видов. Так Урбанович отмечает, что при анализе коллекции сортов и видов яблони уровень полиморфизма для локуса CH05e03 составил 0,88 (Урбанович и др., 2010). Хокансоном при анализе 66 сортов яблони для этого же локуса отмечен коэффициент полиморфности равный 0,87 (Hokanson et. al., 2001).

Для удобства аллели обозначили латинскими буквами с цифровым индексом, обозначающим номер локуса (табл. 5). При анализе электрофореграмм нами были идентифицированы аллели специфичные для отдельных образцов (табл.6).

Таблица 5. Цифровое обозначение микросателлитных локусов, анализируемых в работе

№ п\п	Микросателлитный локус	№ п\п	Микросателлитный локус
1	CH01f03b	9	CH03d12
2	CH02c02b	10	CH04c07
3	CH02g04	11	CH04e03
4	CH03a04	12	CH05g03
5	CH03d01	13	CH05g08
6	CH03d07	14	COL
7	CH03d08	15	Md-Exp7
8	CH03d11		

Таблица 6. Аллели, специфичные для отдельных генотипов

№	Название сортообразца	Специфичные аллели		
		Аллель	Размер*, п.н.	Название праймера
1	Дорунак	<i>b1</i>	142	CH01f03b
2	Зимнее полосатое	<i>d1</i>	146	
3	Лавиа	<i>k1</i>	163	
4	Кавказское самоплодное	<i>m1</i>	177	
5	54-118	<i>c2</i>	79	CH02c02b
6	<i>Malus baccata</i>	<i>a3</i>	178	CH02g04
7	Мекинтош	<i>c3</i>	185	
8	Васюган	<i>d3</i>	186	
9	Коричное полосатое	<i>e3</i>	189	
10	Осеннее полосатое	<i>g3</i>	191	
11	<i>Malus pumila</i>	<i>i3</i>	194	
12	Пепин шафранный	<i>p3</i>	201	
13	Бребурн	<i>d4</i>	95	CH03a04
14	Пепин шафранный	<i>h4</i>	101	CH03d07
15	Осеннее полосатое	<i>j6</i>	205	
16	Кандиль орловский	<i>l6</i>	211	
17	Бельфлер-китайка	<i>m6</i>	213	
18	10-18	<i>o6</i>	215	
19	Мирон сахарный	<i>q6</i>	220	CH03d08
20	Золотая китайка	<i>f7</i>	135	
21	Голден делишес	<i>g7</i>	137	CH03d11
22	<i>Malus cerasifera</i>	<i>a8</i>	100	
23	Золотая китайка	<i>b8</i>	102	
24	Голден делишес	<i>h8</i>	121	CH03d12
25	<i>Malus robusta</i>	<i>m9</i>	144	
26	Кулон-китайка	<i>p9</i>	156	CH04c07
27	Гала	<i>a10</i>	97	
28	Кавказское самоплодное	<i>a11</i>	170	
29	54-118	<i>b11</i>	180	
30	Яхонтовое	<i>h11</i>	199	CH04e03
31	Кавказское самоплодное	<i>o11</i>	218	
32	Веньяминовское	<i>p11</i>	222	
33	<i>Malus ringo</i>	<i>b12</i>	140	
34	Лавиа	<i>c12</i>	142	CH05g03
35	Пепин шафранный	<i>n12</i>	182	
36	<i>Malus cerasifera</i>	<i>a15</i>	226	Md-Exp7

*-размер фрагментов рассчитан приблизительно, опираясь на близлежащие фрагменты маркера молекулярного веса, разница между которыми 10 пн.

Всего выделено 36 сортообразцов для которых идентифицированы специфичные аллели. Наибольшее количество уникальных аллелей (по три аллеля) отмечены у сортовой формы Кавказское самоплодное и сорта Пепин шафранный. Анализ таблицы показывает, что из 36 выделенных образцов для

которых идентифицированы уникальные аллели, присутствуют только 5 сортов зарубежной селекции. При этом аллель *a10* по локусу CH04c07 характерен только для сорта Гала. Вероятно, это связано с тем, что он получен от родительского сорта Киддс Оранж Ред производным которого является сорт Гала.

На основании анализа SSR-спектров были рассчитаны генетические расстояния между образцами. При этом проводится вычисление коэффициента сходства Дайсона между парами образцов. Было установлено, что у исследованных образцов значения коэффициентов сходства варьируют в пределах от 0 (между сортами Гала и Поинка) и 0,7 (между сортами Аркад летний и Аркад зимний). При этом коэффициент сходства был высоким у сортов имеющих общую родословную (Аркад летний и Аркад зимний, Успенское и Прима).

На основании данных о генетическом полиморфизме сортов и форм яблони была построена дендрограмма, отражающая сходство изучаемых генотипов (рисунке 4).

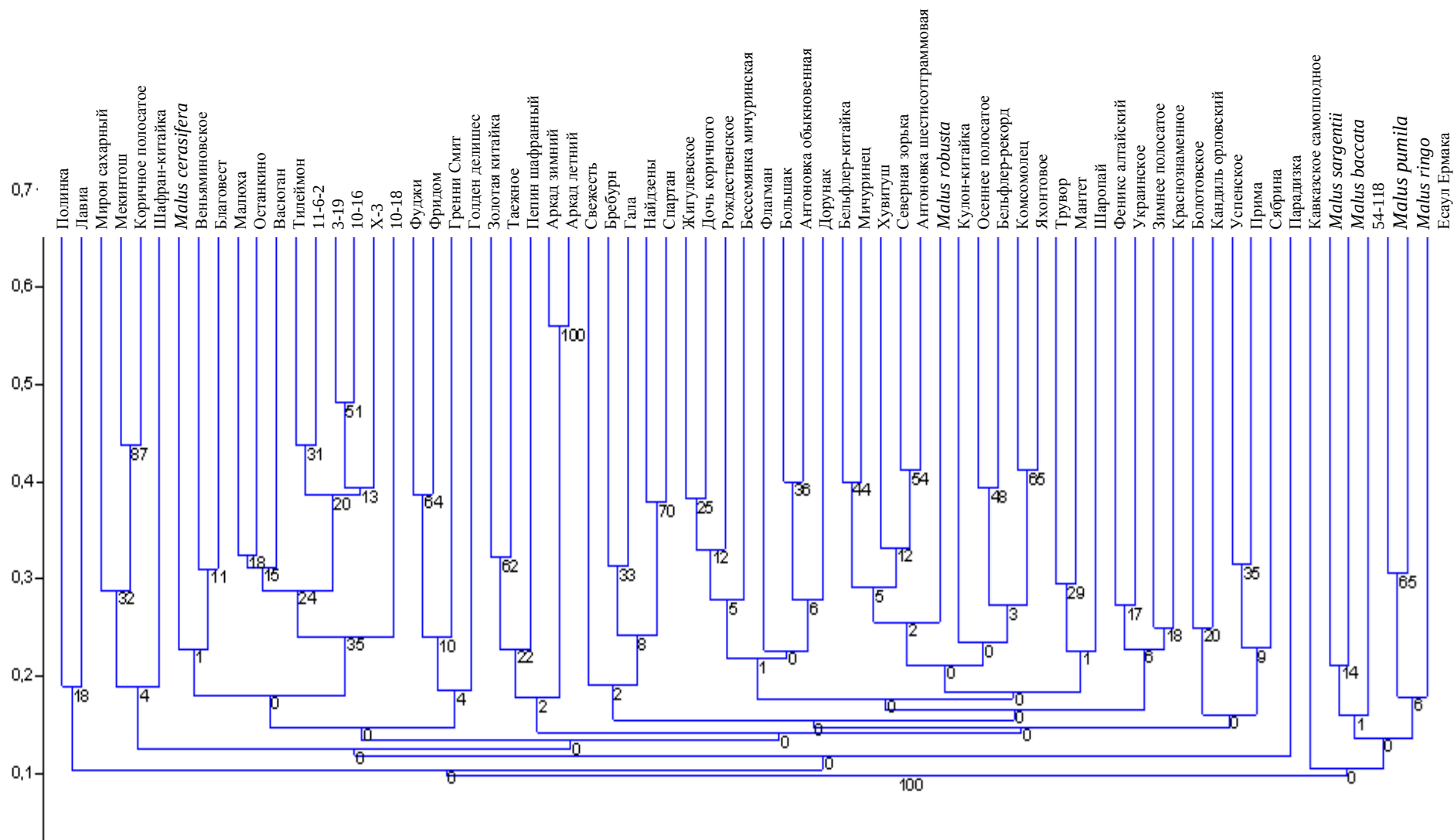


Рис. 4 Дендрогрaмма генетического сходства сортов и форм яблони на основании анализа 15 микросателлитных локусов

Как видно из дендрограммы четкое разделения на кластеры у коллекционных образцов отсутствует, что подтверждает и низкое значение индекса бутстреп. Такая кластеризация возможна, в случае если все образцы анализируемой коллекции близкородственны, либо напротив генетически настолько далеки друг от друга, что данная система маркеров не способна адекватно отразить генетические расстояния между ними (Thormann et al. 1994; Powell et al. 1996; Кудрявцев и др. 2004). Мы, скорее всего, имеем дело со вторым случаем, поскольку в анализируемой коллекции собраны разнообразные сорта яблони селекции различных регионов нашей страны и зарубежных стран, созданные в различное время. Изучение родословных показывает, что большинство сортов имеют различное происхождение, в котором принимали участие, как сорта отечественной, так и зарубежной селекции. Велика доля сортов полученных от свободного опыления и сортов народной селекции. В происхождении значительной части исследуемых образцов принимали участие дикие виды рода *Malus*. Такие скрещивания характерны, в частности, для сортов селекции И.В. Мичурина, благодаря чему были получены такие сорта как Золотая китайка, Таежное, Бельфлер-китайка. В частности, такой сорт как Парадизка мичуринская был получен И. В. Мичуриным от скрещивания китайской сливолистной яблони (*M. prumifolia* W.) с яблоней *M. paradisiaca* Med.

Межвидовая гибридизация, лежащая в основе сортов, созданных И.В. Мичуриным, делает эту коллекцию генетически уникальной, о чем косвенно свидетельствует большое количество редких (и уникальных) SSR аллелей, выявленных в этой группе сортов.

Уникальность мичуринских сортов в целом подтверждается и оценкой их генетического сходства с зарубежными сортами, которое проводили, используя метод главных координат на основе анализа 15 микросателлитных локусов (рис. 5).

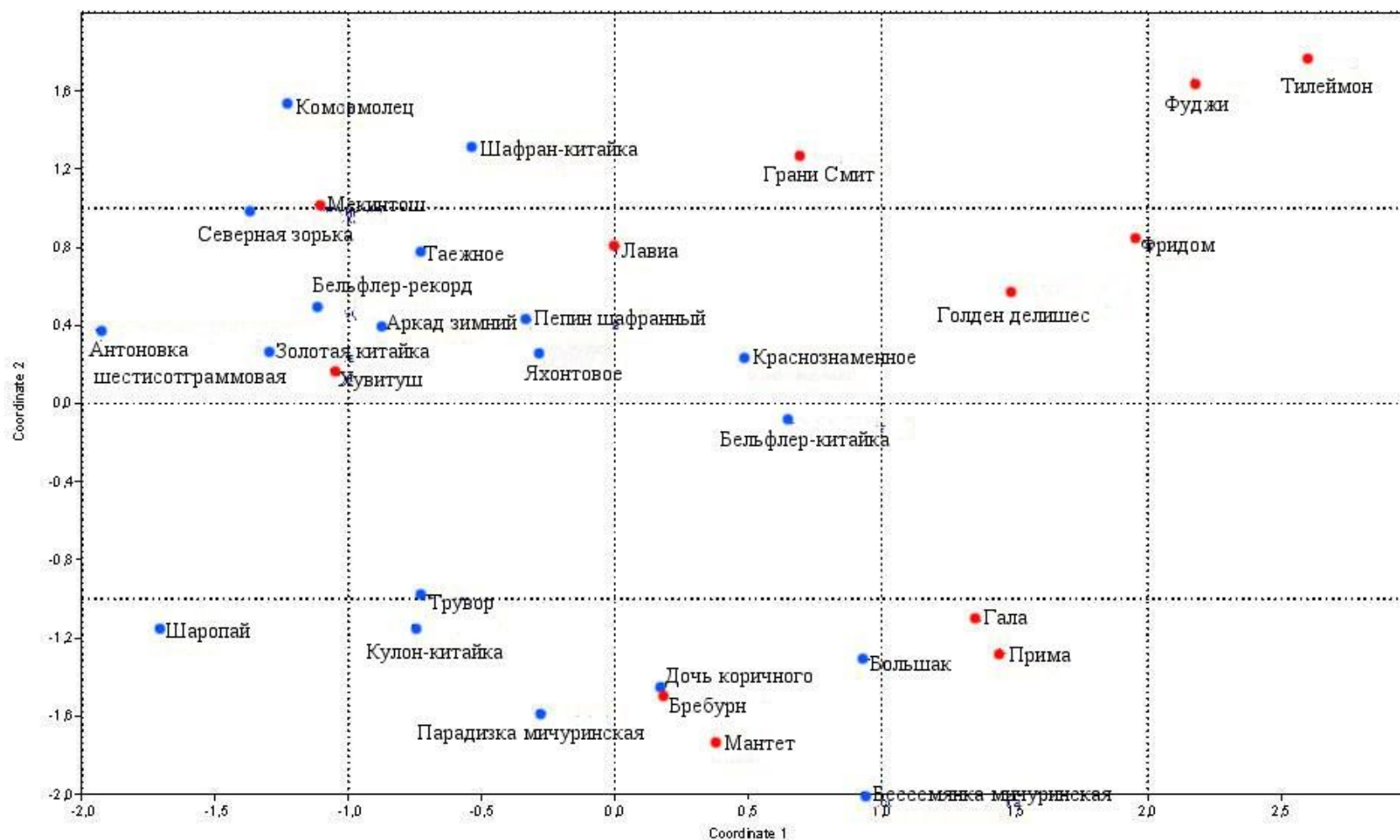


Рис. 5 Расположение сортов селекции И.В. Мичурина и зарубежных сортов в главных координатах на основе анализа 15 микросателлитных локусов генома

- - зарубежные сорта
- - сорта селекции И.В. Мичурина

Анализ распределения образцов в плоте показывает, что эти две группы не имеют четкого разграничения (как и все коллекционные образцы в целом). Однако хорошо видно, что большинство мичуринских сортов располагаются в левой нижней половине плота, а зарубежные сорта – в правой верхней.. Исключение составляет сорт Бребурн, который по состоянию микросателлитных локусов оказался очень похож на сорт Дочь коричневого. Анализ родословной не позволяет выявить родство этих сортов, так, как происхождение сорта Бребурн неизвестно, а сорт Дочь коричневого получен от скрещивания сорта народной селекции Коричное полосатое и дикорастущего вида яблони *Malus prumifolia*. Возможно, такое сходство оказалось случайным, возможно есть какое-то рациональное объяснение, но для его получения требуются дополнительные анализы.

Таким образом, анализ нашей коллекции показал, что разнообразие яблони по микросателлитным локусам высоко и эти маркеры вполне могут быть использованы для генетической паспортизации сортов. Другим положительным моментом применения данных маркеров является то, что с их помощью возможно искать в коллекции уникальные генотипы, несущие редкие аллели по микросателлитным локусам и, соответственно, с высокой степенью вероятности и редкие аллели по локусам сцепленных генов. Такие генотипы могут оказаться перспективными в селекции. Данные маркеры позволяют оценить генетическое разнообразие коллекции в целом и даже в, некоторой степени, выявить различия в пулах генофондов имеющих разное происхождение. Однако они не очень удобны при изучении родословных яблони, поскольку общая структура полученного филогенетического древа оказывается достаточно «рыхлой» и с определенной степенью достоверности можно говорить только о родственных связях некоторых пар сортов.

3.1.1 Использование микросателлитных маркеров для генетической паспортизации сортов яблони

Анализ микросателлитных локусов позволил получить индивидуальные профили их аллельных состояний. Каждый сорт имеет свой уникальный профиль, на основании которого может быть составлен генетический паспорт.

В таблице 7 представлено аллельное разнообразие по 15 микросателлитным локусам у 71 анализируемого сорта яблони.

Таблица 7 Аллельное разнообразие по 15 микросателлитным локусам у сортов и форм яблони

Сорт/форма	Локусы							
	CH01f03b	CH02c02b	CH02g04	CH03a04	CH03d01	CH03d07	CH03d08	CH03d11
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Благовест	<i>i1; l1</i>	<i>g2</i>	<i>n3</i>	<i>k4</i>	<i>i5</i>	<i>d6</i>	<i>i7</i>	<i>g8</i>
Веньяминовское	<i>l1</i>	<i>g2</i>	<i>o3</i>	<i>p4</i>	<i>i5</i>	<i>d6</i>	<i>e7</i>	<i>n8</i>
Успенское	<i>a1; l1</i>	<i>d2</i>	<i>j3; m3</i>	<i>p4</i>	<i>h5</i>	<i>c6; p6</i>	<i>i7</i>	<i>n8</i>
Болотовское	<i>a1; l1</i>	<i>j2</i>	<i>o3</i>	<i>e4; m4</i>	<i>h5</i>	<i>c6; p6</i>	<i>e7; p7</i>	<i>g8; i8</i>
Свежесть	<i>l1</i>	<i>f2; h2</i>	<i>o3</i>	<i>q4</i>	<i>a5</i>	<i>g6; u6</i>	<i>e7; h7</i>	<i>g8; j8</i>
Кандиль орловский	<i>l1</i>	<i>d2</i>	<i>o3</i>	<i>q4</i>	<i>a5</i>	<i>g6; l6</i>	<i>e7; n7</i>	<i>n8</i>
Жигулевское	<i>f1; n1</i>	<i>d2</i>	<i>n3</i>	<i>q4</i>	<i>c5</i>	<i>c6; h6</i>	<i>d7; o7</i>	<i>g8</i>
Бребурн	<i>i1; n1</i>	<i>f2</i>	<i>m3</i>	<i>d4</i>	-	<i>u6</i>	<i>d7; i7</i>	<i>g8; i8</i>
Гала	<i>l1</i>	<i>f2; h2</i>	<i>j3</i>	<i>r4</i>	<i>h5</i>	<i>s6</i>	<i>d7; i7</i>	<i>g8</i>
Прима	<i>a1; i1</i>	<i>h2</i>	<i>j3</i>	<i>m4</i>	<i>h5</i>	<i>s6</i>	<i>i7</i>	<i>l8; n8</i>
Рождественское	<i>g1; l1</i>	<i>d2; g2</i>	<i>m3</i>	<i>p4</i>	<i>b5</i>	<i>e6; k6</i>	<i>e7; i7</i>	<i>g8; i8</i>
Флагман	<i>a1; i1</i>	<i>d2; g2</i>	<i>m3</i>	<i>p4</i>	<i>h5</i>	<i>e6; s6</i>	<i>e7; k7</i>	<i>g8</i>
Найдзены	<i>l1</i>	<i>d2</i>	<i>n3</i>	<i>m4; o4</i>	<i>g5</i>	<i>g6; u6</i>	<i>e7; k7</i>	<i>g8; m8</i>
Спартан	<i>l1; n1</i>	<i>d2; f2</i>	<i>n3</i>	<i>o4; r4</i>	<i>f5; h5</i>	<i>g6; u6</i>	<i>j7</i>	<i>l8</i>
Золотая китайка	<i>g1; i1</i>	<i>d2</i>	<i>n3</i>	<i>c4; e4</i>	<i>h5</i>	<i>g6; u6</i>	<i>d7; n7</i>	<i>b8; c8</i>
Пепин шафранный	<i>i1; l1</i>	<i>d2</i>	<i>f3; p3</i>	<i>h4; j4</i>	<i>i5</i>	<i>j6</i>	<i>f7</i>	<i>f8; g8</i>
Бессемянка мичуринская	<i>l1</i>	<i>a2; j2</i>	<i>b3; n3</i>	<i>k4; p4</i>	<i>c5; i5</i>	<i>c1; s1</i>	<i>i5</i>	<i>g8; i8</i>
Парадизка	<i>a1; i1</i>	<i>h2; j2</i>	<i>b3</i>	<i>l4; o4</i>	<i>j5</i>	<i>b1; s1</i>	<i>j7; f7</i>	<i>f8</i>
Аркад зимний	<i>h1</i>	<i>d2</i>	<i>f3; n3</i>	<i>g4</i>	<i>j5</i>	<i>b6</i>	<i>j7</i>	<i>g8; i8</i>
Аркад летний	<i>g1; h1</i>	<i>d2</i>	<i>f3; n3</i>	<i>f4</i>	<i>h5</i>	<i>e6</i>	<i>j7</i>	<i>g8; i8</i>
Бельфлер китайка	<i>a1; l1</i>	<i>d2</i>	<i>o3</i>	<i>g4</i>	<i>h5</i>	<i>m6</i>	<i>e7; j7</i>	<i>g8</i>
Большак	<i>a1; l1</i>	<i>d2</i>	<i>n3</i>	<i>f4; m4</i>	<i>h5</i>	<i>e6</i>	<i>a7; i7</i>	<i>g8</i>
Дорунак	<i>b1</i>	<i>d2; g2</i>	<i>n3</i>	<i>r4</i>	<i>c5; h5</i>	<i>c6; i6</i>	<i>a7; d7</i>	<i>g8</i>
Сябрина	<i>a1; l1</i>	<i>d2</i>	<i>l3</i>	<i>j4; m4</i>	<i>c5; h5</i>	<i>f6; p6</i>	<i>h7</i>	<i>l8; m8</i>
Антоновка обыкновенная	<i>a1</i>	<i>d2</i>	<i>m3</i>	<i>f4; m4</i>	<i>c5</i>	<i>p6</i>	<i>a7; k7</i>	<i>g8</i>
Трувор	<i>c1</i>	<i>j2</i>	<i>j3</i>	<i>f4; p4</i>	<i>i5</i>	<i>p6</i>	<i>e7; o7</i>	<i>l8</i>
Дочь коричневого	<i>a1; l1</i>	<i>d2</i>	<i>m3</i>	<i>f4; p4</i>	<i>c5</i>	<i>c6</i>	<i>i7</i>	<i>g8</i>

Таблица 7 (продолжение)

Сорт/форма	Локусы							
	CH01f03b	CH02c02b	CH02g04	CH03a04	CH03d01	CH03d07	CH03d08	CH03d11
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Кавказское самоплодное	<i>g1; m1</i>	<i>b2; i2</i>	<i>f3; m3</i>	<i>a4; j4</i>	<i>a5; h5</i>	<i>d6; g6</i>	<i>d7; h7</i>	<i>k8; n8</i>
Кулон-китайка	<i>c1; i1</i>	<i>i2; g2</i>	<i>j3</i>	<i>f4; m4</i>	<i>c5</i>	<i>d6</i>	<i>e7</i>	<i>g8; i8</i>
Шаропай	<i>a1; i1</i>	<i>b2; j2</i>	<i>n3</i>	<i>f4; o4</i>	<i>c5</i>	<i>d6; t6</i>	<i>d7; p7</i>	<i>g8</i>
Феникс алтайский	<i>a1; i1</i>	<i>g2; h2</i>	<i>m3</i>	<i>l4; r4</i>	<i>h5</i>	<i>d6</i>	<i>j7; o7</i>	<i>g8</i>
Мантет	<i>a1; l1</i>	<i>i2; j2</i>	<i>j3</i>	<i>j4; r4</i>	<i>c5</i>	<i>p6</i>	<i>e7; h7</i>	<i>g8; i8</i>
Зимнее полосатое	<i>d1; h1</i>	<i>g2; h2</i>	<i>m3; r3</i>	<i>m4; r4</i>	<i>h5</i>	<i>d6</i>	<i>e7; j7</i>	<i>g8</i>
Полинка	<i>a1; c1</i>	<i>d2</i>	<i>k3</i>	<i>m4</i>	<i>a5</i>	<i>d6; h6</i>	<i>k7; o7</i>	<i>k8; p8</i>
Лавиа	<i>k1</i>	<i>d2</i>	<i>k3; q3</i>	<i>g4; m4</i>	<i>a5</i>	<i>h6</i>	<i>j7; m7</i>	<i>g8</i>
Хувитус	<i>a1; l1</i>	<i>d2</i>	<i>q3</i>	<i>g4</i>	<i>c5</i>	<i>h6</i>	<i>a7; h7</i>	<i>g8; i8</i>
<i>Malus sargentii</i>	<i>g1; o1</i>	<i>e2; g2</i>	<i>l3</i>	<i>b4; i4</i>	<i>g5</i>	<i>a6; k6</i>	<i>n7; o7</i>	<i>n8; p8</i>
<i>Malus pumila</i>	<i>g1; j1</i>	<i>b2; d2</i>	<i>i3</i>	<i>a4; d4</i>	<i>h5</i>	<i>a6; f6</i>	<i>b7; l7</i>	<i>d8; f8</i>
Есаул Ермака	<i>e1; l1</i>	<i>j2</i>	<i>m3</i>	<i>m4</i>	-	<i>a6</i>	<i>l7</i>	<i>c8; g8</i>
<i>Malus ringo</i>	<i>e1; l1</i>	<i>d2; g2</i>	<i>k3</i>	<i>a4; r4</i>	<i>h5</i>	<i>a6; t6</i>	<i>b7; h7</i>	<i>c8; d8</i>
Украинское	<i>j1</i>	<i>g2; h2</i>	<i>m3</i>	<i>g4; j4</i>	<i>d5</i>	<i>d6</i>	<i>h7</i>	<i>g8; j8</i>
Мирон сахарный	<i>c1</i>	<i>b2</i>	<i>m3</i>	<i>g4; m4</i>	<i>c5</i>	<i>d6; q6</i>	<i>e7; p7</i>	<i>f8; g8</i>
Краснознаменное	<i>i1; l1</i>	<i>g2; h2</i>	<i>m3</i>	<i>j4; s4</i>	<i>i5</i>	<i>d6; h6</i>	<i>j7</i>	<i>g8</i>
Шафран-китайка	<i>i1</i>	<i>b2</i>	<i>f3</i>	<i>g4</i>	<i>i5</i>	<i>b6</i>	<i>e7; m7</i>	<i>l8; p8</i>
Осеннее полосатое	<i>i1; o1</i>	<i>d2</i>	<i>g3</i>	<i>j4; p4</i>	<i>i5</i>	<i>d6; j6</i>	<i>e7; j7</i>	<i>g8</i>
Таежное	<i>a1; q1</i>	<i>d2</i>	<i>g3</i>	<i>i4; q4</i>	<i>c5</i>	<i>b6</i>	<i>f7</i>	<i>c8; f8</i>
Северная зорька	<i>a1</i>	<i>e2; g2</i>	<i>f3</i>	<i>g4; p4</i>	<i>c5</i>	-	<i>b7; j7</i>	<i>g8</i>
Комсомолец	<i>c1; i1</i>	<i>d2; f2</i>	<i>r3</i>	<i>m4; s4</i>	<i>i5</i>	<i>d6; i6</i>	<i>e7; m7</i>	<i>e8; g8</i>
Бельфлер-рекорд	<i>i1; l1</i>	<i>h2</i>	<i>n3</i>	<i>s4</i>	<i>i5</i>	<i>d6; t6</i>	<i>e7</i>	<i>g8; i8</i>
Яхонтовое	<i>i1; l1</i>	<i>d2</i>	<i>r3</i>	<i>m4; s4</i>	<i>h5</i>	<i>t6</i>	<i>b7; p7</i>	<i>g8; i8</i>
<i>Malus cerasifera</i>	<i>q1; l1</i>	<i>g2; h2</i>	<i>n3</i>	<i>d8; f8</i>	<i>d5; g5</i>	<i>a6; e6</i>	<i>b7</i>	<i>a8; c8</i>
<i>Malus robusta</i>	<i>p1; i1</i>	<i>d2</i>	<i>n3</i>	<i>f4</i>	<i>i5</i>	<i>a6; p6</i>	<i>e7</i>	<i>g8</i>
Мичуринец	<i>a1; l1</i>	<i>d2</i>	<i>n3</i>	<i>g4</i>	<i>g5</i>	<i>h6; r6</i>	<i>h7; j7</i>	<i>g8</i>
54-118	<i>q1; l1</i>	<i>c2</i>	<i>n3</i>	<i>d4</i>	<i>d5; g5</i>	<i>d6</i>	<i>k7; n7</i>	<i>g8; i8</i>
<i>Malus baccata</i>	<i>q1</i>	<i>g2</i>	<i>a3</i>	<i>g4</i>	<i>i5</i>	<i>a6</i>	<i>l7</i>	<i>c8</i>

Таблица 7 (продолжение)

Сорт/форма	Локусы							
	CH01f03b	CH02c02b	CH02g04	CH03a04	CH03d01	CH03d07	CH03d08	CH03d11
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Антоновка шестисотграммовая	<i>a1; i1</i>	<i>d2; e2</i>	<i>m3</i>	<i>c4; i4</i>	<i>i5</i>	<i>d6; h6</i>	<i>e7; j7</i>	<i>e8; g8</i>
Фуджи	<i>l1; n1</i>	<i>d2; g2</i>	<i>o3</i>	<i>b4; c4</i>	<i>h5</i>	<i>r6</i>	<i>c7; e7</i>	<i>g8</i>
Грэнни Смит	<i>i1; n1</i>	<i>d2; g2</i>	<i>r3</i>	<i>r4</i>	<i>i5</i>	<i>f6; r6</i>	<i>i7</i>	<i>e8; g8</i>
Фридом	<i>l1</i>	<i>d2; g2</i>	<i>o3</i>	<i>o4</i>	<i>f5</i>	<i>d6</i>	<i>i7</i>	<i>g8</i>
Мекинтош	<i>c1</i>	<i>a2; j2</i>	<i>c3; m3</i>	<i>g4</i>	<i>f5</i>	<i>d6; r6</i>	<i>n7; o7</i>	<i>p8</i>
Коричное полосатое	<i>c1; i1</i>	<i>a2</i>	<i>e3; n3</i>	<i>g4; i4</i>	<i>h5</i>	<i>d6; r6</i>	<i>l7; o7</i>	<i>p8</i>
Малюха	<i>i1; l1</i>	<i>g2; h2</i>	<i>h3</i>	<i>m4</i>	<i>a5; f5</i>	<i>r6</i>	<i>e7; o7</i>	<i>l8; o8</i>
Тилеймон	<i>l1</i>	<i>g2; h2</i>	<i>o3</i>	<i>j4; s4</i>	<i>h5</i>	<i>d6; r6</i>	<i>c7; i7</i>	<i>l8; o8</i>
11-6-2	<i>l1</i>	<i>g2; h2</i>	<i>j3</i>	<i>j4</i>	<i>f5</i>	<i>d6; r6</i>	<i>h7; i7</i>	<i>l8; o8</i>
Васюган	<i>i1</i>	<i>b2; d2</i>	<i>d3</i>	<i>m4</i>	<i>h5</i>	<i>h6; r6</i>	<i>e7; i7</i>	<i>l8; o8</i>
3-19	<i>c1; l1</i>	<i>g2; h2</i>	<i>n3</i>	<i>j4</i>	<i>f5; h5</i>	<i>r6</i>	<i>h7; i7</i>	<i>l8; o8</i>
х-3	<i>i1; l1</i>	<i>g2; h2</i>	<i>n3</i>	<i>g4</i>	<i>e5</i>	<i>r6</i>	<i>e7; i7</i>	<i>l8; o8</i>
10-16	<i>l1</i>	<i>g2; h2</i>	<i>o3</i>	<i>j4</i>	<i>c5</i>	<i>e6</i>	<i>h7</i>	<i>l8; o8</i>
Останкино	<i>l1</i>	<i>d2; h2</i>	<i>o3</i>	<i>o4</i>	<i>c5; i5</i>	<i>d6; r6</i>	<i>e7; k7</i>	<i>l8; o8</i>
10-18	<i>i1; l1</i>	<i>e2; g2</i>	<i>n3</i>	<i>l4</i>	<i>i5</i>	<i>o6</i>	<i>i7</i>	<i>o8</i>
Голден делишес	<i>a1; l1</i>	<i>g2; h2</i>	<i>h3</i>	<i>s4</i>	<i>i5</i>	<i>e6</i>	<i>g7</i>	<i>h8</i>

Таблица 7 (продолжение)

Сорт/форма	Локусы						
	CH03d12	CH04c07	CH04e03	CH05g03	CH05g08	COL	Md-Exp7
1	2	3	4	5	6	7	8
Благовест	<i>g9</i>	<i>e10; g10</i>	<i>k11</i>	<i>g12</i>	<i>a13; h13</i>	<i>c14; e14</i>	<i>b15; d15</i>
Веньяминовское	<i>g9</i>	<i>c10; h10</i>	<i>l11</i>	<i>a12; h12</i>	<i>a13; g13</i>	<i>e14</i>	<i>b15; d15</i>
Успенское	<i>n9</i>	<i>g10</i>	<i>f11; p11</i>	<i>g12; j12</i>	<i>a13; g13</i>	<i>c14; e14</i>	<i>c15; e15</i>
Болотовское	<i>b9; g9</i>	<i>g10; m10</i>	<i>g11; k11</i>	<i>h12</i>	<i>g13</i>	<i>c14</i>	<i>b15</i>
Свежесть	<i>f9</i>	<i>e10; k10</i>	<i>i11</i>	<i>a12; g12</i>	<i>h13</i>	<i>e14</i>	<i>b15</i>
Кандиль орловский	<i>e9</i>	<i>c10; m10</i>	<i>c11; k11</i>	<i>h12</i>	<i>g13; k13</i>	<i>c14</i>	<i>a15; c15</i>
Жигулевское	<i>f9; g9</i>	<i>g10</i>	<i>k11; n11</i>	<i>g12; o12</i>	<i>g13; j13</i>	<i>c14</i>	<i>e15; h15</i>
Бребурн	<i>g9</i>	<i>h10; m10</i>	<i>n11</i>	<i>h12</i>	<i>g13</i>	<i>c14; e14</i>	<i>b15; d15; e15</i>
Гала	<i>e9</i>	<i>a10; m10</i>	<i>n11</i>	<i>j12</i>	<i>g13; h13</i>	<i>d14</i>	<i>b15; d15; e15</i>
Прима	<i>i9; n9</i>	<i>e10; f10</i>	<i>e11; m11</i>	<i>h12; j12</i>	<i>a13; g13</i>	<i>c14</i>	<i>b15; d15; e15</i>
Рождественское	<i>f9</i>	<i>f10; h10</i>	<i>g11; k11</i>	<i>g12</i>	<i>g13; h13</i>	<i>c14</i>	<i>b15</i>
Флагман	<i>f9; l9</i>	<i>f10</i>	<i>l11</i>	<i>g12</i>	<i>e13</i>	<i>c14; e14</i>	<i>a15</i>
Найдзены	<i>e9; g9</i>	<i>g10</i>	<i>c11; l11</i>	<i>g12</i>	<i>g13; j13</i>	<i>e14; j14</i>	<i>b15; d15; e15</i>
Спартан	<i>e9; f9</i>	<i>f10; m10</i>	<i>l11</i>	<i>h12</i>	<i>g13; h13</i>	<i>e14; j14</i>	<i>b15; d15; e15</i>
Золотая китайка	<i>o9</i>	<i>g10</i>	<i>k11</i>	<i>h12</i>	<i>g13; h13</i>	<i>e14</i>	<i>a15; b15; h15</i>
Пепин шафранный	<i>f9</i>	<i>c10</i>	<i>k11</i>	<i>h12; n12</i>	<i>e13; h13</i>	<i>c14; f14</i>	<i>a15; b15; h15</i>
Бессемянка мичуринская	<i>f9; l9</i>	<i>e10; f10</i>	<i>n11</i>	<i>g12</i>	<i>g13; h13</i>	<i>c14</i>	<i>b15; e15; i15; j15</i>
Парадизка	<i>d9</i>	<i>d10; e10</i>	<i>c11</i>	<i>h12</i>	<i>c13; g13</i>	<i>e14</i>	<i>b15; e15; i15; j15</i>
Аркад зимний	<i>j9</i>	<i>g10</i>	<i>f11</i>	<i>h12</i>	<i>j13</i>	<i>h14; j14</i>	<i>a15; b15; e15</i>
Аркад летний	<i>j9</i>	<i>g10</i>	<i>f11; k11</i>	<i>h12</i>	<i>j13</i>	<i>e14</i>	<i>a15; e15</i>
Бельфлер китайка	<i>g9</i>	<i>f10</i>	<i>k11</i>	<i>g12</i>	<i>g13</i>	<i>c14; e14</i>	<i>b15; c15</i>
Большак	<i>c9; n9</i>	<i>m10</i>	<i>k11; n11</i>	<i>g12</i>	<i>f13</i>	<i>e14</i>	<i>b15; c15</i>
Дорунак	<i>c9; f9</i>	<i>b10; e10</i>	<i>i11</i>	<i>g12</i>	<i>e13; k13</i>	<i>e14</i>	<i>a15; b15; h15</i>
Сябрина	<i>c9; n9</i>	<i>b10; e10</i>	<i>f11; i11</i>	<i>h12; j12</i>	<i>g13; i13</i>	<i>c14; i14</i>	<i>a15; b15; h15</i>
Антоновка обыкновенная	<i>c9</i>	<i>b10; m10</i>	<i>k11</i>	<i>g12</i>	<i>g13; j13</i>	<i>e14</i>	<i>a15; b15; h15</i>
Трувор	<i>k9</i>	<i>h10; k10</i>	<i>k11; n11</i>	<i>a12; i12</i>	<i>g13</i>	<i>e14</i>	<i>a15; b15; h15</i>
Дочь коричневого	<i>g9</i>	<i>b10; h10</i>	<i>k11; n11</i>	<i>g12</i>	<i>j13</i>	<i>c14; e14</i>	<i>b15; e15; h15</i>

Таблица 7 (продолжение)

Сорт/форма	Локусы						
	CH03d12	CH04c07	CH04e03	Ch05g03	CH05g08	COL	Md-Exp7
1	2	3	4	5	6	7	8
Кавказское самоплодное	d9; n9	h10; k10	a11; o11	h12	j13	e14	a15; d15; i15; k15
Кулон-китайка	g9; p9	b10; g10	c11; m11	g12	g13; h13	e14	b15; c15
Шаропай	i9; k9	e10; h10	i11; n11	h12	b13; g13	e14	a15; b15; h15
Феникс алтайский	n9	k10	l11	i12; g12	g13; j13	c14; h14	a15; b15; h15
Мантет	g9; n9	e10; h10	k11; n11	g12	g13	e14; i14	b15; c15
Зимнее полосатое	f9	g10; i10	k11	f12; i12	b13; k13	e14; i14	b15; i15; j15
Полинка	g9; k9	b10; k10	i11	i12	c13; k13	c14; e14	a15; c15
Лавиа	g9	f10	m11	c12	f13	c14; i14	a15; c15
Хувитус	g9	h10; i10	i11	h12	g13; k13	e14	a15; b15; h15
<i>Malus sargentii</i>	g9	f10	e11; i11	d12; l12	g13; h13	e14; i14	a15; b15; h15
<i>Malus pumila</i>	i9	g10	g11	h12	e13	a14; e14	a15; d15; k15
Есаул Ермака	h9	g10; l10	j11	a12; l12	g13	e14; i14	d15; k15
Яблоня Ринго	o9	g10	i11	a12; b12	e13; l13	a14; e14	k15
Украинское	g9	l10	e11; k11	m12	g13	e14	a15; b15; h15
Мирон сахарный	g9	f10	j11	a12; i12	g13	d14	a15; b15; h15
Краснознаменное	d9; g9	e10; m10	k11	h12	i13	d14	b15; c15
Шафран-китайка	g9; j9	g10	g11; n11	e12; i12	f13	d14	b15; c15; h15
Осеннее полосатое	g9; j9	g10; j10	j11	h12; o12	h13	d14	a15; b15; h15
Таежное	e9	g10	i11; k11	h12; k12	d13	d14; e14	a15; b15; h15
Северная зорька	g9	g10	i11	h12	g13; h13	b14	a15; b15; h15
Комсомолец	g9	g10	k11	i12; m12	g13; i13	d14	a15; b15; h15
Бельфлер-рекорд	j9	g10	j11	h12	g13	d14	a15; b15; h15
Яхонтовое	g9	e10; g10	h11	i12; m12	g13; i13	e14	a15; b15; c15; e15
<i>Malus cerasifera</i>	g9; i9	g10	g11; l11	a12; g12	g13; h13	c14	d15; j15
<i>Malus robusta</i>	m9	g10	i11	g12	g13; k13	c14	b15; d15; h15
Мичуринец	g9	b10; f10	i11	i12; k12	g13; k13	c14	b15; c15
54-118	a9; i9	g10	b11; c11	g12	a13; e13	e14	a15; b15; h15
<i>Malus baccata</i>	j9	g10	g11	j12	c13; d13;	d14; e14	a15; b15

Таблица 7 (продолжение)

Сорт/форма	Локусы						
	CH03d12	CH04c07	CH04e03	Ch05g03	CH05g08	COL	Md-Exp7
1	2	3	4	5	6	7	8
Антоновка шестисотграммовая	<i>g9</i>	<i>b10; h10</i>	<i>i11</i>	<i>g12</i>	<i>g13; h13</i>	<i>d14; e14</i>	<i>a15; b15; h15</i>
Фуджи	<i>e9</i>	<i>f10; j10</i>	<i>i11</i>	<i>a12; i12</i>	<i>e13</i>	<i>b14</i>	<i>b15; e15</i>
Грэнни Смит	<i>e9</i>	<i>f10; i10</i>	<i>i11</i>	<i>j12</i>	<i>g13; l13</i>	<i>c14; f14</i>	<i>a15; b15; h15</i>
Фридом	<i>h9</i>	<i>e10; f10</i>	<i>i11</i>	<i>a12; i12</i>	<i>a13; g13</i>	<i>d14</i>	<i>b15; c15; e15</i>
Мекинтош	<i>b9; g9</i>	<i>d10</i>	<i>i11</i>	<i>f12</i>	<i>g13</i>	<i>d14</i>	<i>a15; b15; h15</i>
Коричное полосатое	<i>b9; f9</i>	<i>d10; i10</i>	<i>m11</i>	<i>d12; h12</i>	<i>g13; h13</i>	<i>d14</i>	<i>a15; b15; h15</i>
Малюха	<i>g9</i>	<i>f10; h10</i>	<i>j11</i>	<i>h12; o12</i>	<i>b13; c13</i>	<i>g14</i>	<i>b15; c15; f15</i>
Тилеймон	<i>g9</i>	<i>e10; i10</i>	<i>d11; j11</i>	<i>a12; i12</i>	<i>e13</i>	<i>g14</i>	<i>b15; c15; f15</i>
11-6-2	<i>g9</i>	<i>e10</i>	<i>d11; m11</i>	<i>h12</i>	<i>e13</i>	<i>g14</i>	<i>b15</i>
Васюган	<i>g9</i>	<i>e10; h10</i>	<i>k11</i>	<i>e12; h12</i>	<i>e13; h13</i>	<i>g14</i>	<i>b15; c15; h15</i>
3-19	<i>g9</i>	<i>g10</i>	<i>i11</i>	<i>i12</i>	<i>e13; h13</i>	<i>e14; g14</i>	<i>b15; e15</i>
х-3	<i>g9</i>	<i>e10; l10</i>	<i>m11</i>	<i>h12</i>	<i>g13</i>	<i>e14; g14</i>	<i>b15</i>
10-16	<i>g9</i>	<i>e10; f10</i>	<i>e11; m11</i>	<i>h12; i12</i>	<i>g13; h13</i>	<i>e14; g14</i>	<i>b15</i>
Останкино	<i>g9; o9</i>	<i>e10; l10</i>	<i>j11</i>	<i>h12</i>	<i>h13; k13</i>	<i>b14; g14</i>	<i>b15; c15; d15; h15</i>
10-18	<i>l9; o9</i>	<i>g10</i>	<i>j11; n11</i>	<i>i12</i>	<i>g13</i>	<i>e14; g14</i>	<i>b15; d15</i>
Голден делишес	<i>h9</i>	<i>b10; i10</i>	<i>i11</i>	<i>a12; l12</i>	<i>g13</i>	<i>b14; i14</i>	<i>b15; c15</i>

Для создания генетических паспортов сортов и форм яблони необходимо отобрать локусы, которые показывают высокую эффективность в выявлении внутривидового полиморфизма и идентификации генотипов.

На основании анализа 15 микросателлитных локусов определен диагностический набор наиболее информативных, позволяющих идентифицировать генотипы, взятые для анализа. Минимальным количеством маркеров для определения сортовой специфичности является 11: CH03d12, CH03d07, CH02c02b, CH01f03b, CH03d08, CH05g08, CH02g04, CH04e07, CH03d11, CH03d01, CH03a04. Установлено, что данного количества праймеров достаточно для однозначной идентификации любого сорта в коллекции.

Для создания генетических паспортов на основе SSR-анализа целесообразно результаты амплификации с выбранными парами праймеров записать в виде таблицы, в которую заносят название сорта, название микросателлита и размер амплифицируемого фрагмента. Целесообразно также, в паспорте указывать происхождение сорта, оригинатора и год внесения в госреестр, что позволяет получить полную информацию о сорте. В качестве примера приведен образец паспорта, разработанного для сорта яблони Антоновка обыкновенная.

Генетический паспорт сорта яблони Антоновка обыкновенная

Оригинатор	ГНУ Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства
Год внесения в Госреестр	1947
Происхождение	Сорт народной селекции

Сорт	Микросателлит	Аллель (размер, п.н.)
Антоновка обыкновенная	CH03d12	<i>c</i> 9 (108)
	CH03d07	<i>p</i> 6 (217)
	CH02c02b	<i>d</i> 2 (109)
	CH01f03b	<i>a</i> 1 (140)
	CH03d08	<i>a</i> 7 (123); <i>k</i> 7 (147)
	CH05g08	<i>g</i> 13 (178); <i>j</i> 13 (192)
	CH02g04	<i>m</i> 3 (198)
	CH04c07	<i>m</i> 10(138); <i>b</i> 10(98)
	CH03d11	<i>g</i> 8 (120)
	CH03d01	<i>c</i> 5 (114)
	CH03a04	<i>m</i> 4 (112); <i>f</i> 4 (98)

При проведении ПЦР с микросателлитными праймерами амплифицируются аллели имеющие размер в определенном интервале, характерном для каждой праймерной пары. Данную особенность возможно использовать для проведения мультиплексной ПЦР, что значительно сократит время проведения анализа. Необходимо подобрать несколько пар праймеров с которыми амплифицируются аллели, резко отличающиеся друг от друга по количеству пар нуклеотидов. Полученная в результате разделения продуктов реакции электрофореграмма позволяет вести анализ сразу по нескольким локусам. На рисунке 4 изображены результаты мультиплексной ПЦР с праймерами CH03a04 и CH04f10.

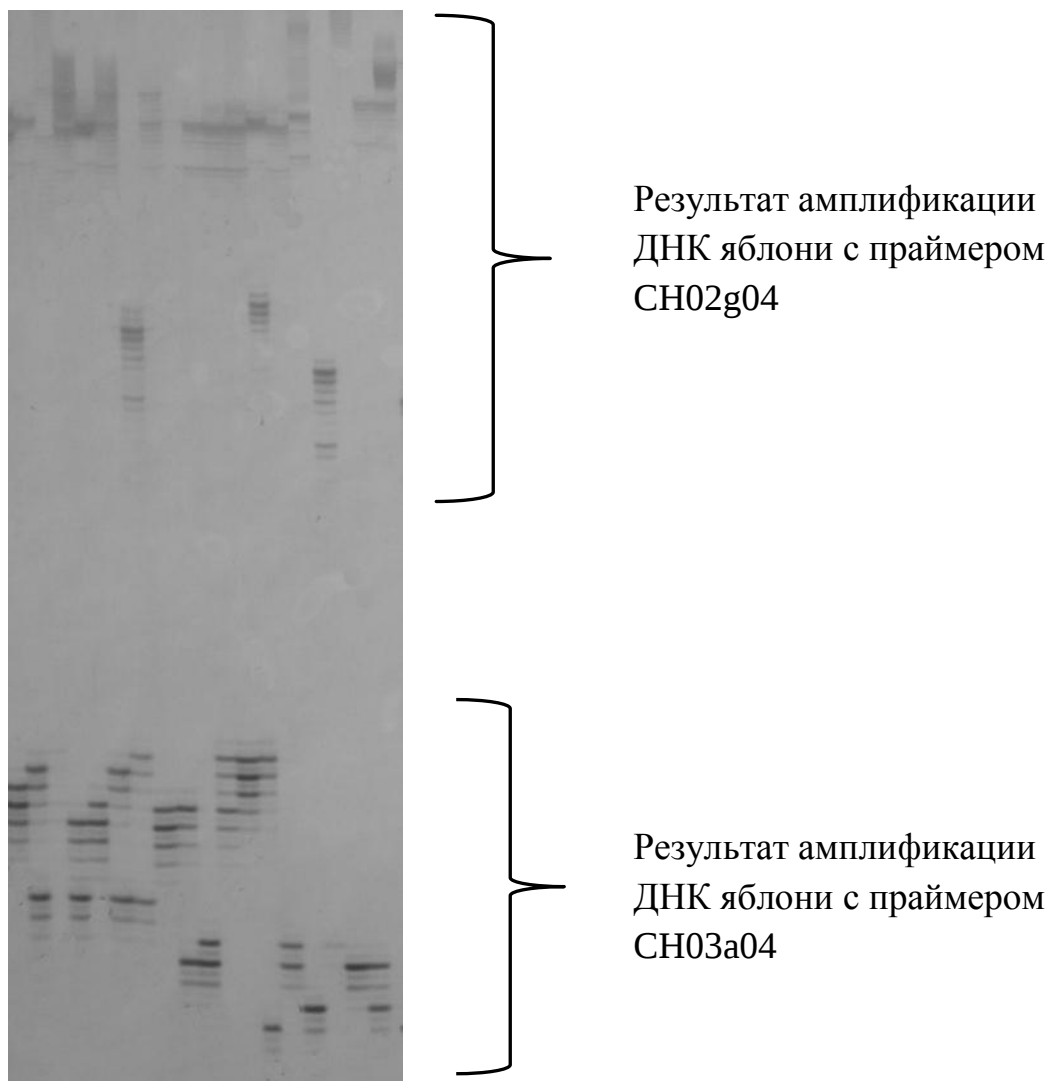


Рисунок 6 Результат разделения продуктов мультиплексной ПЦР с праймерами CH02g04 и CH03a04

Таким образом, установлено, что микросателлитные маркеры являются высокополиморфными и обладают сортоспецифичностью. На основе анализа SSR-локусов возможно создание генетических паспортов сортов и форм яблони. Проведенная работа позволила выявить возможность проведения мультиплексной ПЦР для одновременного анализа нескольких локусов.

3.2 Распространение гена устойчивости к парше (*Vf*) у сортов и форм яблони на основании данных ДНК-маркирования

Гены *Vf* представляют большой кластер генов, локализованных на первой хромосоме яблони. Устойчивость к поражению *Venturia inaequalis* характеризуется наличием гена *Vfa4*, отличающегося от остальных делецией на одном из участков. Для выявления распространения гена в анализируемой коллекции сортов и форм яблони применяли STS-маркер *VfC* разработанный Afunian M.R. (Afunian et al., 2004).

Идентификацию проводили с использованием следующей последовательности праймеров:

VfC1F (5'GGTTTCCAAAGTCCAATTCC3')

VfC2R (5'CGTTAGCATTTTGAGTTGAC3')

При проведении реакции с праймерами *VfC1* и *VfC2* амплифицируются три фрагмента, которые соответствуют участкам генов *Vfa1*, *Vfa2* и *Vfa4* размерами 646, 484 и 286 п.н. соответственно (рисунок 8). Эти гены гомологичны генам *HcrVf1*, *HcrVf2*, и *HcrVf4*, выявленным у сорта Флорина (Afunian et al., 2004). Большинство исследований показывают, что непосредственно геном *Vf*, ответственным за устойчивость к заболеванию паршой, является ген *Vfa4* (Vinatzer et al., 1998; Xu&Korban, 2002; Afunian et al., 2004).

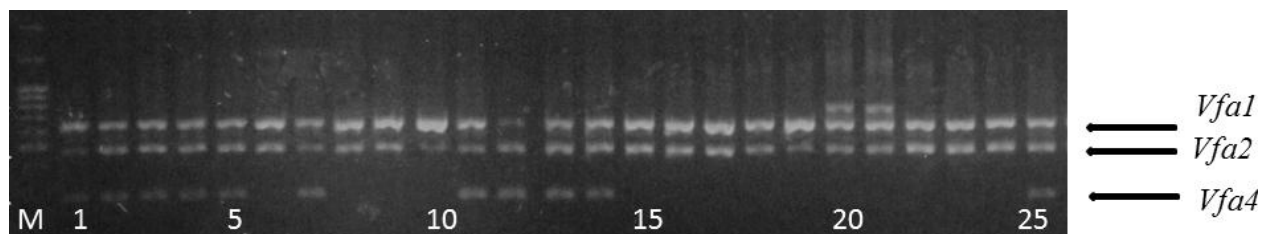


Рис. 8 Идентификация гена *Vf* у сортов и форм яблони с использованием маркера *VfC*

М- маркер молекулярного веса; 1 – Благовест; 2 – Веняминовское; 3 – Былина; 4 – Успенское; 5 – Болотовское; 6 – Свежесть; 7 - Кандиль орловский; 8 – Жигулевское; 9 – Бребурн; 10 – Гала; 11 – Прима; 12 – Рождественское; 13 – Флагман; 14 – Надзейны; 15 – Спартан; 16 - Золотая китайка; 17 - Пепин шафранный; 18 - Бессемянка мичуринская; 19 - Парадизка мичуринская; 20 - Аркад зимний; 21 - Аркад Летний Желтый; 22 - Бельфлер-китайка; 23 – Большак; 24 – Дорунак; 25 – Сябрина

Фрагменты генов *Vfa1*, *Vfa2* присутствуют у всех исследуемых образцов. Данные гены экспрессируются только в молодых листьях. Во взрослом состоянии в листьях экспрессируется лишь ген *Vfa4* (Afunian et al., 2004). Наличие фрагмента гена *Vfa4* идентифицировано у 13 из 72 анализируемых генотипов (табл.8).

Таблица 8. Результат амплификации с праймерами VFC1 и VFC2 (1 наличие фрагмента гена; 0- его отсутствие)

№	Название сорта	<i>Vfa1</i> (646 п. н.)	<i>Vfa2</i> (484 п. н.)	<i>Vfa4</i> (286 п. н.)
1	2	3	4	5
1	Благовест	1	1	1
2	Веняминовское	1	1	1
3	Былина	1	1	1
4	Успенское	1	1	1
5	Болотовское	1	1	1
6	Свежесть	1	1	0
7	Кандиль орловский	1	1	1
8	Жигулевское	1	1	0
9	Бребурн	1	1	0
10	Гала	1	1	0
11	Прима	1	1	1
12	Рождественское	1	1	1
13	Флагман	1	1	1
14	Надзейны	1	1	1

Таблица 8 (продолжение)

1	2	3	4	5
15	Спартан	1	1	0
16	Золотая китайка	1	1	0
17	Пепин шафранный	1	1	0
18	Бессемянка мичуринская	1	1	0
19	Парадизка мичуринская	1	1	0
20	Аркад зимний	1	1	0
21	Аркад Летний Желтый	1	1	0
22	Бельфлер-китайка	1	1	0
23	Большак	1	1	0
24	Дорунак	1	1	0
25	Сябрина	1	1	1
26	Антоновка обыкновенная	1	1	0
27	Malus baccata	1	1	0
28	Трувор	1	1	0
29	Дочь коричневого	1	1	0
30	Кавказское самоплодное	1	1	0
31	Кулон-китайка	1	1	0
32	Шаропай	1	1	0
33	Феникс алтайский	1	1	0
34	Мантет	1	1	0
35	Зимнее Полосатое	1	1	0
36	Полинка	1	1	0
37	Лавиа	1	1	0
38	Хувитуш	1	1	0
39	Malus sargentii	1	1	0
40	Malus pumila	1	1	0
41	Есаул Ермака	1	1	0
42	Malus ringo	1	1	0
43	Украинское	1	1	0
44	Мирон сахарный	1	1	0
45	Краснознаменное	1	1	0
46	Шафран-китайка	1	1	0
47	Осеннее полосатое	1	1	0
48	Таежное	1	1	0
49	Северная зорька	1	1	0
50	Комсомолец	1	1	0
51	Бельфлер-рекорд	1	1	0
52	Яхонтовое	1	1	0
53	Malus cerasifera	1	1	0
54	Malus robusta	1	1	0
55	Мичуринец	1	1	0
56	54-118	1	1	0
57	Антоновка шестисотграммовая	1	1	0

Таблица 8 (продолжение)

1	2	3	4	5
58	Фуджи	1	1	0
59	Гренни Смит	1	1	0
60	Фридом	1	1	1
61	Мекинтош	1	1	0
62	Коричное полосатое	1	1	0
63	Малюха	1	1	0
64	Тилеймон	1	1	0
65	‘11-6-2	1	1	0
66	Васюган	1	1	0
67	‘3-19	1	1	1
68	Х-3	1	1	0
69	‘10-16	1	1	0
70	Останкино	1	1	0
71	‘10-18	1	1	0
72	Голден делишес	1	1	0

Таковыми сортами являются: Благовест, Веняминовское, Кандиль орловский, Былина, Успенское, Болотовское, Прима, Рождественское, Флагман, Надзейны, Сябрина, Фридом и сортовая форма 3-19.

Анализ родословной этих сортов показывает, что все они являются производными доноров гена *Vf*, которыми являются: сорт Прима, доноры иммунитета 1924 (IV поколение от яблони обильноцветущей) и ВМ41497 (табл.3). При этом из 13 идентифицированных сортов 7 сортов российской селекции. Интересен факт, что сорта Благовест, Успенское имеют происхождение из одной общей комбинации скрещивания Прима × Бессемянка мичуринская. Сорт Флагман в своей родословной также имеет одной из родительских форм сорт Скала, полученный из той же комбинации.

Сорт Прима имеет сложное происхождение, в котором принимала участие форма *Malus. Floribunda* 821, первоначальный источник гена *Vf*. Данный сорт наиболее часто используют в селекционных программах для создания иммунных сортов. Однако, «продуктивность» комбинации Прима × Бессемянка мичуринская, вероятно связана с присутствием второго сорта. Сорт Бессемянка мичуринская является стародавним сортом селекции И.В. Мичурина. Как отмечают большинство авторов, данный сорт обладает

полигенной устойчивостью к заболеванию (Савельев, 2009), что способствует, при скрещивании его с донорами моногенной устойчивости, получению потомства, обладающего комплексом генов устойчивости. Такие формы наиболее интересны для изучения, так как открывают возможность выявления новых механизмов устойчивости.

Некоторые зарубежные исследователи (Gessler, Blaise, 1994; Vivianiet. al, 1996) считают, что устойчивость к парше может усиливать гомозиготность по гену *Vf*. При этом возможен отбор наибольшего количества сеянцев без симптомов поражения. В анализируемой нами коллекции сортов и форм яблони имеется достаточное количество сортов с моногенной устойчивостью к парше ген *Vf* в которых находится в доминантном гетерозиготном состоянии. Целесообразно проведение скрещивания двух таких генотипов. Так возможны следующие комбинации скрещивания: Кандиль орловский × Былина, Успенское × Кандиль орловский, Веняминовское × Болотовское. Важную роль тут могут сыграть методы маркер-опосредованной селекции. Традиционные методы отбора требуют значительных затрат времени и средств на обработку большого количества гибридного материала. Использование методов молекулярного анализа значительно сократит сроки получения новых ценных генотипов. Для получения доминантных гомозиготных форм по гену *Vf* возможно использование следующей схемы с применением молекулярных маркеров.

1. Получение гибридных семян от скрещивания двух гетерозиготных форм.
2. Посадка и проращивание семян до стадии 2-3 листочков в закрытом грунте.
3. Получение образцов ДНК гибридных сеянцев.
4. Молекулярный анализ с использованием маркера *VfC*
5. Отбор гибридных форм, несущих в своем генотипе ген *Vf*.
6. Высаживание всего лишь трети сеянцев в открытый грунт.
7. Получение черенков гибридных форм для прививки в крону.

8. Прививка в крону.
9. Получение пыльцы гибридных форм.
10. Скрещивание с генотипами не обладающими моногенной устойчивостью к парше, обусловленную геном *Vf*.
11. Анализ гибридного потомства с использованием молекулярного маркера *VfC*.
12. Отбор генотипов, дающих 100% устойчивого потомства.

Использование метода маркер-опосредованной селекции позволяет не проводить анализ гибридного потомства с использованием искусственного заражения или полевой оценки, что сокращает время отбора практически в 2 раза и экономит значительные средства при обработке сеянцев, а также облегчает работу селекционера, так как снижается количество необходимых прививок.

Известно, что формы с геном *Vf* устойчивы к 5 вирулентным расам парши *Venturia inaequalis*. (Савельев, 2009). Но, в начале девяностых годов прошлого века учеными Германии и Франции (Lespinasse, 1994; Parisiet. al, 1993) идентифицирована новая шестая раса парши, которая способна преодолевать устойчивость у сортов и форм яблони с геном *Vf*. Есть мнение, что существует и 7 раса парши. Предполагают также наличие у клона *M. floribunda* 821 независимо от гена *Vf* второго доминантного гена *Vfh*, который индуцирует гиперчувствительную реакцию (Савельев, 2009). Поэтому целесообразно вести отбор генотипов, которые несут несколько генов устойчивости. Пирамидирование генов затруднено при использовании традиционных методов селекции. Идентификация нескольких генов резистентности потребует огромного количества времени и затрат, в частности на поддержание культуры различных рас парши. И здесь также следует активно прибегать к методу молекулярных маркеров. Использование генотипов из анализируемой коллекции позволяет планировать скрещивание используя доноры различных генов устойчивости. Так, к примеру, возможно

включение в селекционную работу сорта Голден делишес, который обладает доминантным геном *Vg*, контролирующей устойчивость к 7 расе парши (Савельев, 2009). Кроме того необходимо вести работу с генотипами имеющими полигенную структуру устойчивости, что позволит вывести селекцию на устойчивость к парше на новый уровень.

3.2.1 Секвенирование фрагментов генов *Vf*

Для обоснования достоверности проведенных исследований по идентификации гена *Vf* в анализируемых коллекционных образцах сортов и форм яблони амплифицированные фрагменты были секвенированы.

Для проведения сиквенса были взяты фрагменты иммунного к парше сорта яблони Успенское. Для получения образцов фрагменты вырезали из геля, очищали и амплифицировали с праймером VFC. Секвенированные последовательности были выровнены и приведены на рисунке 9.

Анализ выравнивания позволил выявить ряд вариабельных сайтов внутри исследуемых фрагментов. Обнаружены как точечные замены нуклеотидов, так и потеря участков ДНК. Крупная делеция выявлена у фрагмента гена *Vfa4* в положении 57 п.н.

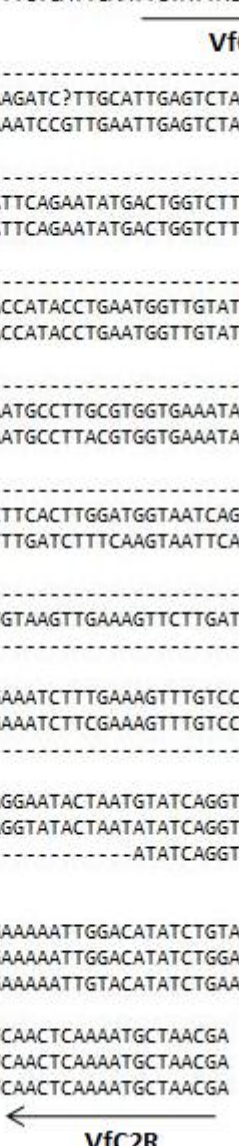
Md-Vf1	ATATCACATATTTGAGGGAAATTGATTTGTCAGAT-----	35
Md-Vf2	ATATCACATCTTTGAGGGAAATTGATTTGTCATCCAATTATATTAGTCTTGATCCGA	57
Md-Vf3	ATATCACATCTTTGAGGGAAATTGATTTGTCATTCAATTCTATTAGTCTTGATCCGA	57
		
Md-Vf1	-----	
Md-Vf2	TTCCCAAATGGCTGCTTTAACCAAAAAGATC?TTGCATTGAGTCTAGAATCCAATGA	114
Md-Vf3	TTCCCAAATTGTTGGTTTACCAAAAAATCCGTTGAATTGAGTCTAGAATCCAATCA	114
Md-Vf1	-----	
Md-Vf2	ACTTACAGGACAACCTTCCAAGCATCATTCAGAATATGACTGGTCTTAAAGTTCTTGA	171
Md-Vf3	ACTTACAGGACAACCTTCCAAGAGTATTGAGAATATGACTGGTCTTACAACCTTTAA	171
Md-Vf1	-----	
Md-Vf2	TCTCGGATGGAACGACTTCAATTCTACCATACTGAATGGTTGTATAGCTTGAACAA	228
Md-Vf3	TCTCGGGGGGAACGAATTCAATTCTACCATACTGAATGGTTGTATAGCTTGAACAA	228
Md-Vf1	-----	
Md-Vf2	TCTCGAGTCTTTACTTCTTTCTTACAATGCCTTGCCTGGTGAAATATCGAGTTCCAT	285
Md-Vf3	TCTCGAGTCTTTACTTCTTTTGGCAATGCCTTACGTGGTGAAATATCGAGTTCCAT	285
Md-Vf1	-----	
Md-Vf2	TGGAACATGACATCCCTTGTCAATCTTCACTTGGATGGTAATCAGTTGGAAGGGAA	342
Md-Vf3	TGGAACCTTAAAGTTTAAGGCACCTTGTATCTTTCAAGTAATTCA-----	331
Md-Vf1	-----AA	37
Md-Vf2	AATCCCAAATTCCTTGGGACATCTTTGTAAGTTGAAAGTTCTTGATCTGTCAAASAA	399
Md-Vf3	-----	331
Md-Vf1	CAATTTACGGTTCAAAGACCATCCGAAATCTTTGAAAGTTTGTCCAGATGTGGTCC	95
Md-Vf2	CCATTTACGGTTGGAAGACCATCCGAAATCTTCGAAAGTTTGTCCAAATGTGGTCC	456
Md-Vf3	-----	331
Md-Vf1	AGATGGAATAAAGTCATTGTCGTTGAGGAATACTAATGTATCAGGTCCCATTCCAAT	152
Md-Vf2	AGATGGAATAAAGTCATTGTCATTGAGGTATACTAATATATCAGGTCCCATTCCAAT	513
Md-Vf3	-----ATATCAGGTCCCATTCCAAT	351
Md-Vf1	GTCAGTAGGAAATATGTCAAGCTTAGAAAAATTGGACATATCTGTAAATCAGTTTA	209
Md-Vf2	GTCAGTAGGAAATCTGTCAAGCTTAGAAAAATTGGACATATCTGGAAATCATTTTA	570
Md-Vf3	GTCAGTAGGAAATCTATCAAGCTTAGAAAAATTGTACATATCTGAAATCATTTTA	408
Md-Vf1	ATGGAACCTTTCACAGAAGTTATTGGTCAACTCAAAATGCTAACGA	254
Md-Vf2	ATGGAACCTTTCACAGAAGTTATTGGTCAACTCAAAATGCTAACGA	615
Md-Vf3	ATGGAACCTTTCACAGAAGTTATTGGTCAACTCAAAATGCTAACGA	463

Рисунок 9 Выравнивание нуклеотидных последовательностей амплифицируемых фрагментов: Md-Vf1 – *Vfa4*, Md-Vf2 – *Vfa1*, Md-Vf3 – *Vfa2* и. Стрелками обозначены места отжига праймеров.

Был проведен поиск аналогичных последовательностей в базе данных NCBI. Секвенированный фрагмент *Vfa4* совпадает на 99% с последовательностью гена *HcrVf3 Malus floribunda* расположенной в

генбанке под номером AJ297741. Это подтверждает, что амплифицируемый у части образцов фрагмент размером 286 п.н. является участком гена *Vf*.

Вариабельность семейства генов *Vf* возможно использовать для дальнейшей работы. Так, для селекции одним из важных моментов является идентификация гомозиготных форм по генам хозяйственно-значимых признаков. При использовании гомозигот при скрещивании, в качестве родительских форм, возможно получение 100% потомства с селектируемым признаком.

На основе полученных в результате секвенирования фрагментов генов *Vf* целесообразна разработка метода, позволяющего идентифицировать гомозиготные генотипы по гену *Vf*. Создание данного метода возможно при использовании ПЦР в реальном времени. Этот метод позволяет измерять количество данной молекулы ДНК при амплификации с использованием ДНК-зондов (TaqMan). Эти зонды имеют места посадки внутри амплифицируемой области. Для идентификации гомозиготной формы по гену *Vf* необходимо выявить его различия относительно других генов данного семейства. Так как фрагмент гена *Vfa4* отличается от фрагментов генов *Vfa1* и *Vfa2*, амплифицируемых у всех генотипов яблони, делецией в положении 57 п.н., то возможно создание двух ПЦР-зондов с различным типом флуоресцентных меток для различающихся участков, что позволит детектировать амплификацию с гена *Vfa2* и гена *Vfa4*.

Определение наличия гомозиготного генотипа в исследуемых образцах основано на анализе первоначального количества продуктов амплификации. Если в генотипе присутствуют обе доминантные формы аллеля гена *Vfa4*, то старт реакции начинается с двух одинаковых участков гена, что способствует увеличению продукта реакции.

Таким образом, проанализирована уникальная коллекция сортов и форм яблони. Проведенные исследования позволили идентифицировать источники гена *Vf* в анализируемых генотипах. Предложены методы ускорения селекционного процесса по созданию резистентных генотипов. Анализ

нуклеотидной структуры амплифицированных фрагментов дает возможность для дальнейшей разработки методов выявления доминантных гомозигот с использованием ПЦР в реальном времени с целью ускорения селекционного процесса по созданию новых форм иммунных к парше сортов яблони.

3.3 Идентификация аллелей генов влияющих на длительность хранения плодов в коллекции сортов и форм яблони

3.3.1 Идентификация аллелей генов, вовлеченных в биосинтез этилена в плодах у сортов и форм яблони

Для анализа аллельного состояния генов *Md-ACS1* и *Md-ACO1* в генплазме сортов и форм яблони была проведена амплификация геномной ДНК с праймерами *Md-ACS1* и *Md-ACO1*. Размер целевых амплифицируемых фрагментов для изучаемых генов следующий: аллель *Md-ACS1-1* – 489 пар нуклеотидов, *Md-ACS1-2* – 655 пар нуклеотидов, *Md-ACO1-1* – 525 пар нуклеотидов, *Md-ACO1-2* – 587 пар нуклеотидов.

На рисунках 10 и 11 представлены результаты электрофоретического разделения продуктов ПЦР исследуемых сортов и форм яблони.

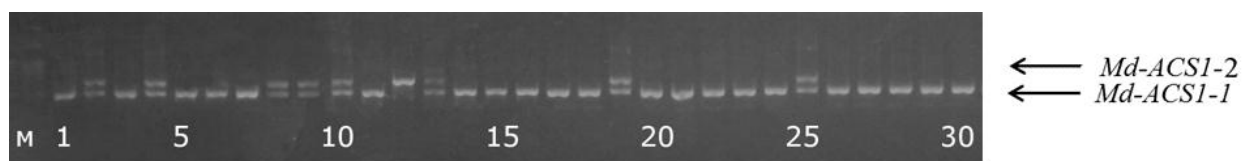


Рис.10. ПЦР-идентификация аллелей гена *Md-ACS1* у сортов и форм яблони

М- маркер; 1 – Благовест; 2 – Веняминовское; 3 – Былина; 4 – Успенское; 5 – Болотовское; 6 – Свежесть; 7 - Кандиль орловский; 8 – Рождественское;; 9 – Флагман; 10 – Жигулевское 11 – Бребурн; 12 – Гала; 13 –Прима; 14 – Надзейны; 15 – Спартан; 16 - Золотая китайка; 17 - Пепин шафранный; 18 - Бессемянка мичуринская; 19 - Парадизка мичуринская; 20 - Аркад зимний; 21 - Аркад летний желтый; 22 - Бельфлер-китайка; 23 – Большак; 24 – Дорунак; 25 – Сябина. 26 - Антоновка обыкновенная; 27 - *Malus baccata*; 28 – Трувор; 29 - Дочь коричневого; 30 - Кавказское самоплодное



Рис.11. ПЦР-идентификация аллелей гена *Md-ACO1* у сортов и форм яблони
 М- маркер молекулярного веса; 1 – Благовест; 2 – Веняминовское; 3 – Былина; 4 – Успенское; 5 – Болотовское; 6 – Свежесть; 7 - Кандиль орловский; 8 – Рождественское; 9 – Бребурн; 10 – Гала; 11 – Прима; 12 – Жигулевское; 13 – Флагман; 14 – Надзейны; 15 – Спартан; 16 - Золотая китайка; 17 - Пепин шафранный; 18 - Бессемянка мичуринская; 19 - Парадизка мичуринская; 20 - Аркад зимний; 21 - Аркад Летний Желтый; 22 - Бельфлер-китайка; 23 – Большак; 24 – Дорунак; 25 – Сябрина; 26 - Антоновка обыкновенная; 27 - *Malus baccata*; 28 – Трувор; 29 - Дочь коричневого; 30 - Кавказское самоплодное.

При анализе коллекционных образцов яблони по локусу *Md-ACS1* были идентифицированы три аллельных варианта. В исследуемых сортах и формах выделены гетерозиготные образцы, а также гомозиготные по первому и по второму аллелю. Всего в исследуемых образцах выявлено 16 гетерозиготных сортов по данному локусу, 2 сорта, гомозиготных по аллелю 2 и 56 сортов, гомозиготных по аллелю 1.

Анализ аллельного полиморфизма по гену *Md-ACO1* выявил, что у большинства сортов и форм яблони в исследуемой коллекции присутствуют обе аллельные формы данного гена. Обобщенный результат анализа полиморфизма генов, вовлеченных в биосинтез этилена в плодах яблони, представлен в таблице 9.

Таблица 9. Аллельное разнообразие генов *Md-ACS1* и *Md-ACO1* сортов и форм яблони
(1 – наличие аллеля; 0 – его отсутствие)

№ п/п	Сорт	<i>Md-ACS1</i>		<i>Md-ACO1</i>	
		<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACS1-2</i>	<i>Md-ACO1-1</i>	<i>Md-ACO1-2</i>
1	2	3	4	5	6
1	Благовест	1	0	1	1
2	Веньяминовское	1	1	1	1
3	Былина	1	0	1	1
4	Успенское	1	1	1	1
5	Болотовское	1	0	1	1
6	Свежесть	1	0	1	1
7	Кандиль орловский	1	0	1	1
8	Рождественское	1	1	0	1
9	Флагман	1	1	0	1
10	Жигулевское	1	1	1	1
11	Бребурн	1	0	1	1
12	Гала	0	1	1	1
13	Прима	1	1	1	1
14	Надзейны	1	0	1	1
15	Спартан	1	0	1	1
16	Золотая китайка	1	0	1	1
17	Пепин шафранный	1	0	1	1
18	Бессемянка мичуринская	1	0	1	1
19	Парадизка мичуринская	1	1	1	1
20	Аркад зимний	1	0	1	1
21	Аркад летний желтый	1	0	1	1
22	Бельфлер-китайка	1	0	1	1
23	Большак	1	0	1	1
24	Дорунак	1	0	1	1
25	Сябрина	1	1	1	1
26	Антоновка обыкновенная	1	0	1	1
27	<i>Malus baccata</i>	1	0	1	0
28	Трувор	1	0	1	1
29	Дочь коричневого	1	0	1	1
30	Кавказское самоплодное	1	0	1	1
31	Кулон-китайка	1	0	1	1
32	Шаропай	1	0	1	1
33	Феникс алтайский	1	0	1	1
34	Мантет	1	1	1	1
35	Зимнее полосатое	1	1	1	1
36	Полинка	1	0	1	1
37	Лавиа	1	0	1	1
38	Хувитуш	1	1	1	1
39	<i>Malus sargentii</i>	1	0	1	1
40	<i>Malus pumila</i>	1	0	1	0
41	Есаул Ермака	1	0	1	1
42	Яблоня Ринго	1	0	1	0
43	Украинское	1	0	1	1
44	Мирон сахарный	1	0	1	1
45	Краснознаменное	1	0	1	1
46	Шафран-китайка	1	0	1	1
47	Осеннее полосатое	1	0	1	1

Таблица 9 (продолжение)

1	2	3	4	5	6
48	Таежное	1	0	1	1
49	Северная зорька	1	0	1	1
50	Комсомолец	1	0	1	1
51	Бельфлер-рекорд	1	0	1	1
52	Мичуринец	1	0	1	1
53	Яхонтовое	1	0		
54	<i>Malus cerasifera</i>	1	0	1	1
55	<i>Malus robusta</i>	1	0	1	1
56	54-118	1	0	1	1
57	Антоновка шестисотграммовая	1	0	1	1
58	Фуджи	0	1	1	0
59	Гренни Смит	1	1	1	1
60	Фридом	1	1	1	1
61	Мекинтош	1	0	1	1
62	Коричное полосатое	1	0	1	1
63	Малюха	1	1	1	1
64	Тилеймон	1	1	1	1
65	11-6-2	1	0	1	1
66	Васюган	1	1	1	1
67	3-19	1	0	1	1
68	Х-3	1	0	1	1
69	10-16	1	0	1	1
70	Останкино	1	0	1	1
71	10-18	1	0	1	1
72	Голден делишес	1	1	1	1

В анализируемой коллекции аллель *Md-ACS1-2* чаще встречается в сортах зарубежной селекции. Так, из 72 растений данный аллель идентифицирован у 6 сортов российской селекции и 8 сортов селекции зарубежных стран. При этом два из них (Гала, Фуджи) являются гомозиготными формами по данному аллелю.

Анализ аллельного разнообразия гена *Md-ACS1* позволил выявить закономерность распределения аллельных вариантов гена у сортов и форм яблони. Интересным является факт отсутствия аллеля 1 в стародавних сортах отечественной селекции, сортах народной селекции и диких видах яблони. Аллельный вариант 2 данного гена появляется у сортов селекции зарубежных стран и современных российских сортов, в родословной которых присутствуют зарубежные сорта (табл.10).

Изучение происхождения сортов зарубежной селекции, анализируемых в работе, показало, что у большинства из них среди родительских форм присутствует сорт Голден делишес (табл. 11). Это позволяет предположить, что дефектный аллель *Md-ACS1-2*, обуславливающий сниженный уровень биосинтеза этилена в плодах яблони, впервые появилась в результате селекционной работы в зарубежных сортах или в результате мутации у одного из диких видов яблони. Данный факт требует дальнейшего изучения аллельного разнообразия гена *Md-ACS1* с привлечением для анализа большего количества сортов зарубежной селекции и диких видов рода *Malus*.

Таблица 10. Аллельное разнообразие гена *Md-ACS1* у сортов и форм яблони различных периодов селекции

Время происхождения	<i>Md-ACS1-1</i>		<i>Md-ACS1-2</i>		<i>Md-ACS1-1</i> <i>Md-ACS1-2</i>	
	Отечественные сорта	Зарубежные сорта	Отечественные сорта	Зарубежные сорта	Отечественные сорта	Зарубежные сорта
1	2	3	4	5	6	7
Стародавние сорта	Золотая китайка	Мекинтош		Гала	Зимнее полосатое	Прима
	Пепин шафранный			Фуджи	Парадизка мичуринская	Хувитуш
	Бессемянка мичуринская					Гренни Смит
	Аркад зимний					Фридом
	Аркад Летний Желтый					Тилеймон
	Бельфлер-китайка					Голден делишес
	Большак					
	Антоновка обыкновенная					
	Трувор					
	Дочь коричневого					
	Кавказское самоплодное					
	Кулон-китайка					
	Шаропай					
	Феникс алтайский					
	Полинка					
	Есаул Ермака					
	Мирон сахарный					

Таблица 10 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7
	Краснознаменное					
	Шафран-китайка					
	Осеннее полосатое					
	Таежное					
	Северная зорька					
	Комсомолец					
	Бельфлер-рекорд					
	Яхонтовое					
	54-118					
	Антоновка шестисотграммовая					
	Коричное полосатое					
Современные сорта	Благовест	Дорунак				Сябрина
	Былина					
	Болотовское					
	Свежесть					
	Кандиль орловский					
	Останкино					
	Х-3					
	Рождественское					
Виды рода <i>Malus</i>	<i>Malus baccata</i>					
	<i>Malus sargentii</i>					
	<i>Malus pumila</i>					
	<i>Malus ringo</i>					
	<i>Malus cerasifera</i>					
	<i>Malus robusta</i>					

Таблица 11. Происхождение зарубежных сортов яблони

Сорт	Происхождение
Голден делишес	Сеянец неизвестного происхождения
Прима	14-510 (F2 26829- 2-2 × Голден Делишес) × NY 123249
Грэнни Смит	Является гибридом европейской дикой яблони и местной австралийской разновидности яблонь.
Фуджи	Ред делишес и Вирджиния Раллс Генетт
Фридом	NY 18492 (Мекаун х Антоновка) × NY 49821 (Голден Делишес × F2 26829-2-2)
Тилеймон	Важак × Голден Делишес
Сябрина	Лобо× Прима
Гала	Киддс Оранж Ред × Голден Делишес

Для гена *Md-ACO1* наиболее распространена комбинация аллелей *Md-ACO1-1* и *Md-ACO1-2*. Однако среди изучаемых генотипов выявлены гомозиготные формы по аллелю *Md-ACO1-2*. Такими сортами являются сорта Флагман и Рождественское. Наибольший интерес представляют сорта и формы яблони, несущие аллель *Md-ACO1-1*, ответственный за сниженный уровень синтеза продукта данного гена. В анализируемой коллекции данный аллель в гомозиготном состоянии идентифицирован у диких видов яблони – Яблоня ягодная, Яблоня низкая и Яблоня Ринго. Среди сортов аллель *Md-ACO1-1* отмечен у сорта зарубежной селекции Фуджи.

Сочетание гомозиготных форм по аллелю *Md-ACO1-1* и аллелю *Md-ACS1-2*, обуславливающее низкий уровень синтеза этилена, в анализируемых генотипах выявлено лишь у сорта Фуджи. Такая комбинация аллелей является редкой в мировой коллекции сортов яблони и отмечена рядом авторов только для сорта Фуджи (Супрун, 2013, Costa et al., 2005, 2008, Oraguzie et al., 2004, Harada et al., 2000).

В сортах отечественной селекции сочетание аллелей, ответственных за наиболее низкий уровень синтеза этилена в плодах, не отмечено. Поэтому целесообразным является проведение селекционной работы по

созданию сортов яблони, сочетающих в своем генотипе аллели *Md-ACO1-1* и *Md-ACS1-2* и способных сохранять свои товарные качества продолжительный период времени. Результаты проведенного анализа позволили идентифицировать носителей данных аллельных форм генов, которые возможно использовать в скрещиваниях при создании сортов с длительным сроком хранения. Так, носителями аллеля 2 гена *Md-ACS1* в гомозиготном состоянии являются сорта западной селекции Гала и Фуджи. Идентифицированы также гомозиготы по аллелю 1 гена *Md-ACO1*, которыми являются дикорастущие виды яблони (*Malus baccata*, *Malus pumila* и *Malus ringo*). Необходимо привлечение данных генотипов в качестве родительских форм при скрещивании. Целесообразно использование в качестве доноров аллеля 2 гена *Md-ACS1* сортов западной селекции, либо гетерозиготные формы российских сортов. В качестве доноров аллеля *Md-ACO1-1* возможно привлечение диких видов яблони.

3.3.2 Аллельное разнообразие генов, вовлеченных в биосинтез экспансина у сортов и форм яблони

Аллельное разнообразие гена *MD-Exp7* оценивали с использованием микросателлитного праймера MD-Exp7^{SSR}. В результате проведенной амплификации выявлено 3 аллельных варианта гена: *MD-Exp7-1*, *MD-Exp7-2* и *MD-Exp7-3*. Размер аллелей: *MD-Exp7-1* – 198 п.н., *MD-Exp7-2* – 202 п.н., *MD-Exp7-3* – 214 п.н. На рисунках 12 представлены результаты электрофоретического разделения продуктов ПЦР исследуемых сортов и форм яблони.

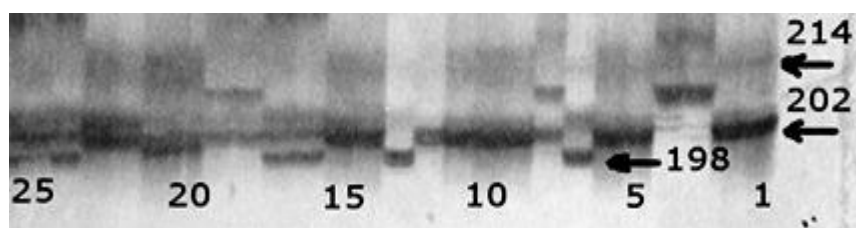


Рис. 12. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК яблони с праймером MD-Exp7^{SSR}

1 – Благовест, 2 – Веняминовское, 3 – Былина, 4 – Успенское, 5 – Болотовское, 6 – Свежесть, 7 - Кандиль орловский, 8 – Жигулевское, 9 – Бребурн, 10 – Гала, 11 – Прима, 12 – Рождественское, 13 – Флагман, 14 – Спартан, 15 - Золотая китайка, 16 - Пеппин шафранный, 17 - Бессемянка мичуринская, 18 - Парадизка мичуринская, 19 - Аркад зимний, 20 - Аркад Летний Желтый, 21 - Бельфлер-китайка, 22 – Большак, 23 – Дорунак, 24 – Сябина, 25 - Антоновка обыкновенная, 198 п.н. - MD-Exp7-1, 202 п.н. - MD-Exp7-2, 214 п.н. - MD-Exp7-3.

Результат анализа амплификации показал распределение аллельных комбинаций по генотипам (табл. 12).

Таблица 12. Распределение аллельных вариантов гена *MD-Exp7* в генотипах сортов и форм яблони
(1 – наличие аллеля; 0 – его отсутствие)

№	Название сорта	<i>MD-Exp7-1</i>	<i>MD-Exp7-2</i>	<i>MD-Exp7-3</i>
1	2	3	4	5
1	Благовест	0	1	0
2	Веняминовское	0	1	0
3	Былина	0	0	1
4	Успенское	0	0	1
5	Болотовское	0	1	0
6	Свежесть	0	1	0
7	Кандиль орловский	1	0	0
8	Жигулевское	0	1	0
9	Бребурн	0	1	1
10	Гала	0	1	1
11	Прима	0	1	1
12	Рождественское	0	1	0
13	Флагман	1	0	0
14	Найдзены	0	1	1
15	Спартан	0	1	1
16	Золотая китайка	1	1	0
17	Пепин шафранный	1	1	0
18	Бессемянка мичуринская	0	1	0
19	Парадизка	0	1	0
20	Аркад зимний	1	1	1
21	Аркад летний	1	1	1
22	Бельфлер китайка	0	1	0
23	Комсомолец	1	1	0
24	Большак	0	1	0
25	Дорунак	1	1	1
26	Сябрина	0	1	0
27	Антоновка обыкновенная	1	1	0
28	Трувор	1	1	0
29	Дочь коричневого	0	1	0
30	Кавказское самоплодное	1	0	0
31	Кулон-китайка	0	1	0
32	Шаропай	1	1	0
33	Феникс алтайский	1	1	0
34	Мантет	0	1	0
35	Зимнее полосатое	0	1	0
36	Полинка	1	0	0
37	Лавиа	1	0	0
38	Хувитуш	1	1	0
39	Яблоня Саржента	1	1	0

Таблица 12 (продолжение)

1	2	3	4	5
41	Есаул Ермака	1	0	0
42	Яблоня Ринго	0	0	0
43	Украинское	1	1	0
44	Мирон сахарный	1	1	0
45	Краснознаменное	0	1	0
46	Шафран-китайка	0	1	0
47	Осеннее полосатое	1	1	0
48	Таежное	1	1	0
49	Северная зорька	1	1	0
50	Бельфлер-рекорд	1	1	0
51	Яхонтовое	1	1	1
52	Яблоня церазифера	1	0	0
53	Яблоня робуста	0	1	0
54	Мичуринец	0	1	0
55	54-118	1	0	1
56	Яблоня ягодная	1	0	0
57	Антоновка шестисотграммовая	1	0	0
58	Фуджи	0	1	1
59	Гренни Смит	1	1	0
60	Фридом	0	1	1
61	Мекинтош	1	1	0
62	Коричное полосатое	1	1	0
63	Малюха	0	1	0
64	Тилеймон	0	1	0
65	11-6-2	0	1	0
66	Васюган	1	1	0
67	3-19	0	1	1
68	х-3	0	1	0
69	10-16	0	1	0
70	Останкино	1	1	0
71	10-18	0	1	0
72	Голден делишес	0	1	0

Анализируемые сорта яблони содержат различные комбинации аллелей гена *MD-Exp7*. Среди исследуемых образцов выявлены гетерозиготные формы, а также гомозиготные формы по каждому из трех аллелей.

Культурные сорта яблони разделяют на три группы в зависимости от сочетания аллельных форм гена *MD-Exp7* (Costa et. al., 2008). Для каждой из этих групп характерен различный уровень биосинтеза экспансина. В анализируемой коллекции сортов и форм яблони комбинация

MD-Exp7-1/MD-Exp7-2, обуславливающая наиболее низкий уровень выявлена у 19 генотипов.

Ко второй группе сортов со средним уровнем синтеза этилена принадлежат сорта с комбинацией аллелей *MD-Exp7-2/MD-Exp7-2*. В анализируемой коллекции идентифицировано 24 генотипа гомозиготных по второму аллелю.

В третью группу в которую входят сорта и формы яблони с повышенным уровнем синтеза экспансина объединены генотипы для которых характерно сочетание аллелей *MD-Exp7-2/MD-Exp7-3*. Всего таких образцов выявлено восемь.

Анализ полученных результатов показал, что аллель 1 гена *MD-Exp7*, обуславливающий сниженный уровень синтеза белка экспансина, характерен для диких видов яблони, а также сортов, родительскими формами которых являлись дикие виды. Исключение составляют сорта Васюган и Останкино, не имеющие среди родителей диких видов. Аллель 3 данного гена идентифицирован у сортов зарубежной селекции и сортов отечественной селекции: Аркад летний желтый, Аркад зимний и Яхонтовое, яблоневого подвоя 54-118 и гибридной формы 3-19. У сортов отечественной селекции в родословной присутствует дикорастущий вид яблони – *Malus niedzwetzkyana*. Это позволяет предположить, что данный вид является донором аллели 3.

Выделены генотипы, сочетающие все три аллельных формы гена. Такими сортами являются стародавние сорта Аркад летний желтый, Аркад зимний и Яхонтовое.

Сравнение сроков созревания, по литературным данным (Седов, 2005, Савельев, 1999), и комбинации аллелей показало, что для сортов с комбинацией *MD-Exp7-1/MD-Exp7-2*, ответственной за сниженный уровень синтеза экспансина, характерны сорта с осенним и зимним сроками созревания. Исключение составляют летние сорта Золотая китайка и Мирон сахарный, плоды которых обладают малым сроком хранения и

быстро теряют твердость. Данные сорта требуют дальнейшего изучения генотипа и филогении.

Целесообразно привлечение выделенных генотипов со сниженным уровне синтеза экспансина для создания сортов, сохраняющих твердость и товарные качества продолжительный период времени. Использование в селекции таких сортов как Антоновка обыкновенная, Трувор, Шаропай, Феникс алтайский, Хувитус, Украинское, Осеннее полосатое, Таежное, Северная зорька, Бельфлер-рекорд, Гренни Смит, Мекинтош, Коричное полосатое, Васюган, Останкино и вида *Malus sargentii* позволит получить ценные генотипы с длительным сроком хранения плодов.

На основании полученных ранее результатов рассмотрено соотношение аллельных вариантов генов, вовлеченных в биосинтез этилена, и гена, ответственного за синтез экспансина. Обобщенные результаты приведены в таблице 13.

Таблица 13. Аллельное разнообразие генов, обуславливающих длительное хранение плодов у сортов и форм яблони

№ п/п	Сорт	<i>Md-ACS1</i>	<i>Md-ACO1</i>	<i>MD-Exp7</i>
1	2	3	4	5
1	Благовест	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>
2	Веньяминовское	<i>Md-ACS1-1/ Md-ACS1-2</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>
3	Былина	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-3</i>
4	Успенское	<i>Md-ACS1-1/ Md-ACS1-2</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-3</i>
5	Болотовское	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>
6	Свежесть	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>
7	Кандиль орловский	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1</i>
8	Рождественское	<i>Md-ACS1-1/ Md-ACS1-2</i>	<i>Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>
9	Флагман	<i>Md-ACS1-1/ Md-ACS1-2</i>	<i>Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1</i>
10	Жигулевское	<i>Md-ACS1-1/ Md-ACS1-2</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>
11	Бребурн	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-2/ MD-Exp7-3</i>
12	Гала	<i>Md-ACS1-2</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-2/ MD-Exp7-3</i>
13	Прима	<i>Md-ACS1-1/ Md-ACS1-2</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-2/ MD-Exp7-3</i>
14	Надзейны	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-2/ MD-Exp7-3</i>
15	Спарган	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-2 MD-Exp7-3</i>
16	Золотая китайка	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1/ MD-Exp7-2</i>
17	Пепин шафранный	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1/ MD-Exp7-2</i>
18	Бессемянка мичуринская	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>
19	Парадизка мичуринская	<i>Md-ACS1-1/ Md-ACS1-2</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>
20	Аркад зимний	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1/ MD-Exp7-2/ MD-Exp7-3</i>
21	Аркад летний желтый	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1/ MD-Exp7-2/ MD-Exp7-3</i>
22	Бельфлер-китайка	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>
23	Большак	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>
24	Дорунак	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1/ MD-Exp7-2/ MD-Exp7-3</i>
25	Сябрина	<i>Md-ACS1-1/ Md-ACS1-2</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>
26	Антоновка обыкновенная	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1/ MD-Exp7-2</i>
27	<i>Malus baccata</i>	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1</i>	<i>MD-Exp7-1</i>

Таблица 13 (продолжение)

1	2	3	4	5
28	Трувор	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1/ MD-Exp7-2</i>
29	Дочь коричнеого	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>
31	Кулон-китайка	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>
32	Шаропай	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1/ MD-Exp7-2</i>
33	Феникс алтайский	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1/ MD-Exp7-2</i>
34	Мантет	<i>Md-ACS1-1/ Md-ACS1-2</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>
35	Зимнее полосатое	<i>Md-ACS1-1/ Md-ACS1-2</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>
36	Полинка	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1</i>
37	Лавиа	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1</i>
38	Хувитус	<i>Md-ACS1-1/ Md-ACS1-2</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1/ MD-Exp7-2</i>
39	<i>Malus sargentii</i>	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1/ MD-Exp7-2</i>
40	<i>Malus pumila</i>	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1</i>	
41	Есаул Ермака	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1</i>
42	<i>Malus ringo</i>	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1</i>	
43	Украинское	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1/ MD-Exp7-2</i>
44	Мирон сахарный	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1/ MD-Exp7-2</i>
45	Краснознаменное	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>
46	Шафран-китайка	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>
47	Осеннее полосатое	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1/ MD-Exp7-2</i>
48	Таежное	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1/ MD-Exp7-2</i>
49	Северная зорька	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1/ MD-Exp7-2</i>
50	Комсомолец	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1/ MD-Exp7-2</i>
51	Бельфлер-рекорд	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1/ MD-Exp7-2</i>
52	Мичуринец	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>
53	Яхонтовое	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1/ MD-Exp7-2/ MD-Exp7-3</i>
54	<i>Malus cerasifera</i>	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1</i>
55	<i>Malus robusta</i>	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>
56	54-118	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1/ MD-Exp7-3</i>
57	Антоновка шестисотграммовая	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACO1-1/ Md-ACO1-2</i>	<i>MD-Exp7-1</i>
58	Фуджи	<i>Md-ACS1-2</i>	<i>Md-ACO1-1</i>	<i>MD-Exp7-2/ MD-Exp7-3</i>

Таблица 13 (продолжение)

1	2	3	4	5
59	Грэнни Смит	<i>Md-ACS1-1/ Md-ACS1-2</i>	<i>Md-ACOl-1/ Md-ACOl-2</i>	<i>MD-Exp7-1/ MD-Exp7-2</i>
60	Фридом	<i>Md-ACS1-1/ Md-ACS1-2</i>	<i>Md-ACOl-1/ Md-ACOl-2</i>	<i>MD-Exp7-2/ MD-Exp7-3</i>
61	Мекинтош	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACOl-1/ Md-ACOl-2</i>	<i>MD-Exp7-1/ MD-Exp7-2</i>
62	Коричное полосатое	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACOl-1/ Md-ACOl-2</i>	<i>MD-Exp7-1/ MD-Exp7-2</i>
63	Малюха	<i>Md-ACS1-1/ Md-ACS1-2</i>	<i>Md-ACOl-1/ Md-ACOl-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>
64	Тилеймон	<i>Md-ACS1-1/ Md-ACS1-2</i>	<i>Md-ACOl-1/ Md-ACOl-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>
65	11-6-2	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACOl-1/ Md-ACOl-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>
66	Васюган	<i>Md-ACS1-1/ Md-ACS1-2</i>	<i>Md-ACOl-1/ Md-ACOl-2</i>	<i>MD-Exp7-1/ MD-Exp7-2</i>
67	3-19	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACOl-1/ Md-ACOl-2</i>	<i>MD-Exp7-2/ MD-Exp7-3</i>
68	X-3	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACOl-1/ Md-ACOl-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>
69	10-16	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACOl-1/ Md-ACOl-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>
70	Останкино	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACOl-1/ Md-ACOl-2</i>	<i>MD-Exp7-1/ MD-Exp7-2</i>
71	10-18	<i>Md-ACS1-1</i>	<i>Md-ACOl-1/ Md-ACOl-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>
72	Голден делишес	<i>Md-ACS1-1/ Md-ACS1-2</i>	<i>Md-ACOl-1/ Md-ACOl-2</i>	<i>MD-Exp7-2</i>

Анализ данной таблицы показывает, что соотношение аллельных вариантов *Md-ACS1-2* и *Md-ACO1-1* генов синтеза этилена и аллелей *MD-Exp7-1/MD-Exp7-2* гена, контролирующего биосинтез экспансина, отмечены у сортов Хувитуш и Грэнни Смит. Такое сочетание аллелей говорит о сниженном уровне синтеза продуктов данных генов, что обуславливает продолжительные сроки хранения плодов данных сортов яблони.

Таким образом, проведенный анализ коллекционных образцов сортов и форм яблони позволил выявить закономерности распределения аллелей генов, контролирующих продолжительные сроки хранения плодов. Определены носители ценных генотипов для привлечения их в селекционный процесс.

ГЛАВА IV Применение методов маркер-опосредованной селекции для получения новых генотипов яблони

Оценка коллекции сортов и форм яблони ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина с использованием молекулярных маркеров позволила выявить ее уникальность и идентифицировать генисточки ценных хозяйственных признаков. В результате проделанной работы выявлены аспекты, которые затруднено оценить с использованием традиционных методов селекции. Применение методов маркер-опосредованной селекции открывает новые возможности отбора уникальных генотипов и значительно экономит время. При этом возможна оценка комплекса признаков, а также гомо- и гетерозиготности организма по селектируемому гену.

Появление новых методов в биологии и, в частности в молекулярной биологии, требует переосмысления подхода к каноническим принципам селекционной работы. Целесообразно применение оценки новых генотипов на уровне ДНК. Поэтому на практике оценка гибридных форм должна проходить по измененным схемам. Так, принцип маркер-опосредованной селекции для отбора ценных генотипов по комплексу признаков яблони можно разделить на несколько этапов.

1. Подбор перспективных родительских форм для скрещивания.
2. Проведение скрещивания.
3. Отбор гибридных семян.
4. Высадка семян в закрытом грунте (возможно даже зимой в первый год анализа).
5. Проращивание семян до стадии 2-3 листьев.
6. Экстрагирование ДНК из гибридных сеянцев.
7. Проведение ПЦР-анализа для идентификации маркеров генов хозяйственно-значимых признаков.
8. Отбор ценных генотипов.
9. Высадка сеянцев в открытый грунт для дальнейшего изучения.

Все стадии проведения анализа могут занимать 1-2 года, начиная со сбора семян и заканчивая получением результатов. При этом отбор генотипов позволяет идентифицировать признаки, которые затруднительно определить по фенотипу или до его проявления необходимо ждать до состояния взрослого растения.

Принцип маркерного подхода к селекции очень удобен при анализе больших генетических коллекций. Здесь есть возможность оценки разнообразия по селектируемым генам и выявления доноров с комплексом важных признаков. Так, проведенный анализ сортов и форм яблони из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института генетики и селекции плодовых растений им. И.В. Мичурина позволил установить, что исследуемые генотипы содержат большое количество уникальных микросателлитных локусов генома, что и представляет интерес для селекционной работы. Выделены генисточники таких признаков как сниженный уровень биосинтеза этилена и экспансина в плодах, моногенная устойчивость к парше. Результаты такого анализа могут быть основой при выборе родительских форм для скрещиваний. В таблице 14 представлены возможные комбинации для скрещиваний, которые были выбраны в результате молекулярно-генетического анализа коллекции сортов и форм яблони ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина.

Таблица 14 Предполагаемые комбинации скрещивания на основе анализа коллекции сортов и форм яблони с использованием молекулярных маркеров

Селектируемый признак	Гены, идентифицированные у родительских форм	Родительские формы	Комбинация скрещивания
Моногенная устойчивость к парше (ген <i>Vf</i>)	Ген <i>Vf</i>	Кандиль орловский	Кандиль орловский × Успенское
	Ген <i>Vf</i>	Успенское	
	Ген <i>Vf</i>	Веньяминовское	Веньяминовское × Бессемянка мичуринская
	-	Бессемянка мичуринская	
Продолжительный период хранения плодов	<i>Md-ACO1-1</i> <i>Md-ACS1-2</i>	Фуджи	Фуджи × Бессемянка мичуринская
	<i>Md-ACS1-1</i> <i>Md-ACO1-1</i> <i>Md-ACO1-2</i>	Бессемянка мичуринская	
	<i>Md-ACS1-2</i>	Гала	
	<i>Md-ACS1-1</i> <i>Md-ACS1-2</i> <i>Md-ACO1-1</i> <i>Md-ACO1-2</i>	Успенское	Гала × Успенское
	<i>MD-Exp7-1/MD-Exp7-2</i>	Золотая китайка	
	<i>MD-Exp7-1/MD-Exp7-2</i>	Мекинтош	Золотая китайка × Мекинтош Хувитус × Грэнни Смит
	<i>Md-ACS1-2</i> <i>Md-ACO1-1</i> <i>MD-Exp7-1/MD-Exp7-2</i>	Хувитус	
	<i>Md-ACS1-2</i> <i>Md-ACO1-1</i> <i>MD-Exp7-1/MD-Exp7-2</i>	Грэнни Смит	

Использование данных комбинаций в селекционной работе позволит получить гибридные формы, которые могут сочетать в своем генотипе несколько генов ценных признаков. Дальнейшая работа с выделенными формами, возможно, позволит получить новый сорт, сочетающий комплекс генов хозяйственно-ценных признаков.

Применение методов маркер-опосредованной селекции невозможно без использования методов классической селекции, так как контроль многих

признаков осуществляется полигенно, однако, это позволит сократить время проведения отбора в два раза и снизит затраты при обработке и содержании гибридных сеянцев.

ГЛАВА V Экономическая эффективность использования методов ДНК-технологии

Снабжение населения плодами основной породы в Средней полосе России круглогодично требует наличие сортов с различными сроками созревания. Создание позднеспелых сортов, способных длительный срок храниться, затруднено. Гибридное потомство оказывается обычно более раннеспелым, чем родители. Такое отличие увеличивается с привлечением в скрещивания позднеспелых форм. При этом у гибридов плоды могут созревать на два и более месяца раньше, чем у родителей. Поэтому для получения сеянцев, с поздними сроками созревания и высокими качествами плодов необходимо очень большое потомство (Седов, 2011).

В нашей работе коллекция сортов яблони была проанализирована на распространение в ней генов, ответственных за продолжительную сохранность плода. Использование данного метода целесообразно для анализа гибридного потомства, полученного от скрещивания сортов с генами контролирующими лежкость.

Использование методов маркер-опосредованной селекции для оценки гибридного потомства позволяет сократить финансовые расходы и время отбора в сравнении с традиционными методами селекции.

Для сравнения двух методов анализа был произведен расчет экономической эффективности. Для сравнения была взята стандартная методика проведения ПЦР-анализа, использованная при выполнении работы. В качестве традиционного метода отбора гибридных форм яблони по степени сохранности плодов выбран ускоренный метод получения урожая путем прививки в крону однолетних побегов. Временные затраты рассчитывались от момента посева семян в почву.

Таким образом, сравнительная оценка методов отбора гибридных форм по степени лежкости плодов показала, что использование методов молекулярного анализа является экономически выгодным. Уровень рентабельности при этом достигает 431,4%.

Выводы

1. Анализ микросателлитных локусов у образцов сортов и форм яблони из коллекции ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина показал высокую полиморфность и сортоспецифичность данного типа маркеров. С их помощью идентифицирован 31 генотип отечественной селекции, в которых присутствуют уникальные аллели по микросателлитным локусам.

2. На основе анализа 11 микросателлитных локусов генома (CH03d12, CH03d07, CH02c02b, CH01f03b, CH03d08, CH05g08, CH02g04, CH04e07, CH03d11, CH03d01, CH03a04) возможно идентифицировать различия между двумя сортами. Этого достаточно для создания генетических паспортов сортов и форм яблони.

3. Идентифицированы сорта несущие ген *Vf*, ответственный за моногенную устойчивость к заболеванию паршой: Благовест, Веняминовское, Былина, Успенское, Болотовское, Прима, Рождественское, Флагман, Надзейны, Сябрина, Фридом и сортовой форме 3-19.

4. Установлено, что аллель *Md-ACS1-2*, обуславливающий сниженный уровень биосинтеза этилена в плодах, распространен у зарубежных сортов и производных от них сортов отечественной селекции. У дикорастущих видов яблони – *Malus baccata*, *Malus pumila* и *Malus ringo* идентифицирован аллель *Md-ACO1-1*, ответственный за продолжительную сохранность плодов.

5. По результатам ДНК-типирования выделены генотипы, являющиеся генисточниками гена *MD-Exp7*, контролирующего уровень биосинтеза экспансина, белка ответственного за степень плотности плодов – сорта Пепин шафранный, Аркад зимний, Дорунак, Антоновка обыкновенная, Шаропай, Хувитус, Украинское, Мирон сахарный, Мекинтош, Коричное полосатое, Таежное, Северная зорька, Бельфлер-рекорд, Яхонтовое, Осеннее полосатое, Васюган, Останкино и вид *Malus sargentii*. Для данных сортов характерна комбинация двух аллельных вариантов гена *MD-Exp7*: *MD-Exp7-1/MD-Exp7-2*.

6. Расчет экономической эффективности показал высокий уровень рентабельности (431,4%) использования молекулярно-генетического анализа гибридного потомства в сравнении с традиционными методами при селекции на признак продолжительности хранения плодов.

Практические рекомендации для селекции.

1. На основании генетического типирования и анализа нуклеотидной последовательности гена устойчивости к парше рекомендовать для селекции в качестве исходных форм для создания сортов с моногенной устойчивостью к парше сорта Благовест, Веняминовское, Былина, Успенское, Болотовское, Прима, Рождественское, Флагман, Надзейны, Сябрина, Фридом и сортовую форму 3-19.

2. Для селекции рекомендовать в качестве доноров генов продолжительной сохранности плодов источники гена *Md-ACO1* виды – *Malus baccata*, *Malus pumila* и *Malus ringo*.

3. Рекомендовать для планирования схем скрещивания при проведения селекционной работы в качестве генисточников гена длительной лежкости плодов яблони (ген *Md-ACS1*) сорта Гала и Фуджи.

4. Рекомендовать при планировании схем гибридизации для создания сортов с низкой степенью размягчения плодов генисточники гена биосинтеза экспансина (*MD-Exp7*) сорта Пепин шафранный, Аркад зимний, Дорунак, Антоновка обыкновенная, Шаропай, Хувитус, Украинское, Мирон сахарный, Мекинтош, Коричное полосатое, Таежное, Северная зорька, Бельфлер-рекорд, Яхонтовое, Осеннее полосатое, Васюган, Останкино и вид *Malus sargentii*.

Список использованной литературы

1. Беспалова Л.А. Применение молекулярных маркеров в селекции пшеницы в краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко / Л.А. Беспалова, А.В. Васильев, И.Б. Аблова, В.А. Филобок, Ж.Н. Худокормова, Р.О. Давоян, Э.Р. Давоян, Г.И. Карлов, А.А. Соловьев, М.Г. Дивашук, Н.К. Майер, М.В. Дудников, Н.В. Мироненко, О.А. Баранова // Вавиловский журнал генетики и селекции – 2012. – Т. 16 – № 1 – С.37-43.
2. Бирюк Е.Н. Полиморфизм пероксидазы у сортов яблони в различных условиях холодового стресса / Е.Н.Бирюк, З.А.Козловская // Плодоводство – 2002.Т. 14. – С. 14-22.
3. Володин, В.И. Электрофоретический состав альбуминов семян гибридов гороха и вики в F₂ [Текст] / В.И. Володин, О.И.Гуринович, А.И. Костромичева, В.И. Измалкова//Бюллетень научно-технической информации ВНИИЗБК, Орёл, 1978 – с.31-36.
4. Гостимский С.А. Использование молекулярных маркеров для анализа генома растений / С.А. Гостимский, З.Г. Кокаева, В.К. Боброва // Генетика. – 1999. – Т. 35 – № 11 – С. 1538-1549.
5. Джигадло Е.Н. Оценка генетического полиморфизма сортов и гибридов вишни и черешни с помощью ДНК-маркеров (метод.рекомендации) / Е.Н. Джигадло, Javier Plasencia, Claudia Olechko-Lytкова. – Орел: ВНИИСПК, 2010. – 36 с
6. Драгович, А.Ю. Маркирование глиадинкодирующими генами пшеницы адаптивно-значимых ассоциаций генов / А.Ю. Драгович, А.В.Фисенко // Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития. 3-й Съезд ВОГиС. – М.: Академиздат, 2004. Т.1. С. 424
7. Жданов В.В. Поражаемость сортов и сеянцев яблони расой 5 возбудителя парши *Venturia inaequalis* / В.В. Жданов // Селекция и сорторазведение садовых культур. – Орел: НИИСПК, 1992. – С. 51-57.
8. Журавлев Ю.Н. ПЦР-генетическое типирование женьшеня с использованием произвольных праймеров / Ю.Н. Журавлев, М.М.

Козыренко, Е.В. Артюкова, Г.Д. Реунова, Т.И. Музарок, Г.Б. Еляков // Доклад Академии Наук. – М., 1996. – Т. 349. – №1. – С. 111-114.

9. Кичина В.В. Яблони колонновидного типа / В.В. Кичина. – М.: ВСТИСП, 2006. – 161 с.

10. Ковеза О.В. Выявление и картирование полиморфных RAPD-маркеров генома гороха (*Pisum sativum* L.) / О.В. Ковеза, З.Г. Кокаева, Ф.А. Коновалов, С.А. Гостимский // Генетика. – 2005. – Т. 41 – №3 – с. 341-348.

11. Конарев, А.В. Использование молекулярных маркеров в решении проблем генетических ресурсов растений и селекции / А.В. Конарев // Аграрная Россия Научно-производственный журнал. – 2006. – №6 – с.4-22.

12. Конарев, В. Г. Белки растений как генетические маркеры [Текст] /В.Г. Конарев / – М.: Колос, 1983. – 320с.

13. Конарев, В.Г. Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян [Текст] / Под ред. Конарева В.Г.; ВИР СПб., 2000. – 186 с.

14. Конарев, А.В. Адаптивный характер молекулярного полиморфизма и его использование в решении проблем генетических ресурсов растений и селекции [Текст] /А.В. Конарев //Аграрная Россия. – 2002. - №3. - С.4-11.

15. Конарев, В.Г. Молекулярно-биологические исследования генофонда растений в ВИРе (1967-2007гг.). [Текст] / В.Г. Конарев. – Издание 2-е дополненное (составители: Сидорова В.В., Конарев А.В.) – СПб.: ВИР, 2007. – 134с.

16. Коничев, А.С. Биохимия и молекулярная биология: словарь терминов / А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. – М.: Дрофа, 2008. – 359 с.

17. Коновалов Ф.А. Картирование и молекулярно-генетический анализ генов гороха / Ф.А. Коновалов // дисс. к.биол.н. – М., 2006. – С. 150.

18. Корниенко, Н.Н. Идентификация сортообразцов гороха морфотипа хамелион и определение степени внутрисортного полиморфизма по запасным белкам семян.: Автореферат. Канд.дис. Воронеж, 2006, 23с.
19. Кочиева Е.З. RAPD-маркеры генома картофеля: клонирование и использование для определения медвидовых и межсортных различий / Е.З. Кочиева, А.С. Оганисян, А.П. Рысков // Молекулярная биология. – 1999. – Т. 33. – № 5. – С. 893-897.
20. Кочиева Е.З. Использование метода RAPD анализа в определении генетического полиморфизма и филогенетических связей у представителей рода *Lycopersicon* (Tourn.) Mill. / Е.З. Кочиева, Н.Н. Рыжова, И.А. Храпалова, В.А. Пухальский // Генетика – 2002. – Т. 38 – №9 – С. 1298-1303.
21. Кудрявцев А. М. Генетика гиадина яровой твёрдой пшеницы (*Triticum durum* Desf) / А.М. Кудрявцев // Генетика. 1994. - Том 30; № 1-С. 77 - 84.
22. Кудрявцев А. М. Создание системы генетических маркёров твёрдой пшеницы (*Triticum durum* Desf) и её применение в научных исследованиях и практических разработках: Дис. д-ра биол. наук. Москва, 2007. - 303 с.
23. Кудрявцев, А.М. Маркер-опосредованная селекция растений [Текст] / А.М. Кудрявцев// Молекулярная и прикладная генетика.сборник науч. трудов том 9, Минск-2009. – С.28-33.
24. Лесневич, Л.А. Полипептиды US-глобулина в анализе подлинности сортов сахарной свёклы [Текст] / Л.А. Лесневич, В.А. Борисюк// Физиология и биохимия культурных растений. 1993. – т.25.- №2. – С.175-180.
25. Малышев С.В. Молекулярные маркеры в генетическом картировании растений / С.В. Малышев, Н.А. Картель // Молекулярная биология. – М., 1997. – Т. 31– № 62 – С. 197-208.

26. Метаковский Е.В. Изучение филогенетических связей полиплоидных пшениц путем сравнения аллельных вариантов блоков компонентов глина в электрофоретических спектрах / Е.В. Метаковский, А.М. Кудрявцев, З.А. Якобашвили, А.Ю. Новосельская // Генетика. 1990. Т.26. №2. С.272-282.
27. Новосельская, А.Ю. Селекционная неравноценность глиндинкодирующих генов лучших отечественных сортов озимой мягкой пшеницы Безостая 1 и Мироновская 808 / А.Ю. Новосельская, Е.В. Метаковский // VI Всесоюзный симпозиум «Молекулярные механизмы генетических процессов» – М., 1987. С.131-132.
28. Оганисян А.С. Маркирование видов и сортов картофеля с помощью RAPD-PCR / А.С. Оганисян, Е.З. Кочиева, А.П. Рысков // Генетика. – 1996. – Т. 32. – № 3. – С. 448-451.
29. Павловская, Н.Е. Формирование полипептидного состава белков семян гороха и фасоли в процессе созревания [Текст] / Н.Е. Павловская [и др.]// Вестн. РАСХН, 2007; N 3. - С. 39-41.
30. Пикунова А.В. Оценка генетического разнообразия исходного и селекционного материала ягодных культур с помощью молекулярных маркёров / А.В. Пикунова // дисс ... к.биол.н. – Орел, 2011. – 150 с.
31. Поморцев, А.А. Полиморфизм гордеинов ячменя северной Африки [Текст] / А.А. Поморцев, Б.А. Калабушкин, И.А. Терентьева // Генетика, 2002. – том 38. – №11 – С.1498-1510.
32. Романова О.В. Методика молекулярно-генетической идентификации косточковых культур / О.В. Романова, В.А. Высоцкий // Под общ.ред. акад. РАСХН И.М. Куликова; ГНУ ВСТИСП. – М., 2007. – 70 с.
33. Сабитов, А.Ш. Полиморфизм и селекционное значение *Ribes Rauciflorum* Turcz. (смородина малоцветковая) в условиях дальнего востока России.: Автореферат. Канд.дис. С.-П., 1994, 21с.

34. Савельев Н.И. Перспективные иммунные к парше сорта яблони: научное издание / Н.И. Савельев, Н.Н. Савельева, А.Н. Юшков. – Мичуринск-наукоград РФ, 2009. – 126 с.
35. Седов Е.Н. Устойчивость яблони к парше (сорта и селекция) / Е.Н. Седов, В.В. Жданов. – Орел: Орловское отд. Приокского кн. изд-ва, 1983. – 113 с.
36. Седов Е.Н. Помология. Том I. Яблоня / под общей редакцией академика РАСХН Е. Н. Седова. — Орел: Издательство ВНИИСПК, 2005. — 576 с., илл.
37. Седов Е.Н. Селекция яблони на полиплоидном уровне / Е.Н. Седов, Г.А. Седышева, З.М. Серова. – Орел: ВНИИСПК, 2008. – 368 с.
38. Седов Е.Н. Селекция и новые сорта яблони / Е.Н. Седов. – Орел: ВНИИСПК, 2011. – 624 с.
39. Сиволап Ю.М. Генетический полиморфизм ячменя, выявленный ПЦР с произвольными праймерами / Ю.М. Сиволап, Р.Н. Календарь // Генетика. –1995. – Т. 31. – № 10. – С. 1358-1364.
40. Сулимова, Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и область применения [Текст]/ Г.Е. Сулимова // электронный журнал лаборатории сравнительной генетики животных ИОГен им. Н.И.Вавилова, РАН, – 2004. <http://www.labsgj.by.ru>
41. Супрун И.И., Токмакова С.В. Изучение аллельного разнообразия генов синтеза этилена *Md-ACS1* и *Md-ACO1* в отечественной генплазме яблони /И.И. Супрун, С.В.Токмакова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013 – Т.17. – № 2. – С. 298-302.
42. Метлицкий О.З. Современное мировое производство плодов и ягод / О.З. Метлицкий // Плодоводство и ягодоводство. – 1998 – Т. 5. – С. 20-26.
43. Урбанович О.Ю. Анализ полиморфизма SSR-локусов видов *Malus*/О.Ю.Урбанович, З.А.Козловская, А.А. Хацкевич, Н.А.Картель // Известия национальной академии наук Беларуси. – 2010. –№1.- С. 12-16.

44. Форте А.В. Применение ДНК-маркеров для оценки генетического разнообразия гибридных сеянцев, сортов и видов яблони / А.В. Форте // дис. к.с.-х.н. – Мичуринск, 2002. – 118 с.
45. Хавкин Э.Е. Молекулярная селекция растений: ДНК-технологии создания новых сортов сельскохозяйственных культур / Э.Е. Хавкин // Сельскохозяйственная биология. – 2003. – № 3. – С. 26-41.
46. Чесноков, Ю. В. ДНК – фингерпринтинг и анализ генетического разнообразия у растений [Текст] / Ю.В. Чесноков // С.-х. биол. - 2005. – № 1. – С.20-40.
47. Чегамирза К. Молекулярно-генетическое картирование локусов качественных и количественных признаков у гороха / К. Чегамирза // дисс ... к.биол.н. – М., 2004 – С. 150.
48. Afunian M.R. Hunter Linkage of *Vfa4* in *Malus x domestica* and *Malus floribunda* with *Vf* resistance to the apple scab pathogen *Venturia inaequalis* / M.R. Afunian, P.H. Goodwin and D.M. // Plant Pathology. – 2004. – V. 53. – P. 461-467.
49. Arcade A. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese Irach / A. Arcade, F. Anselin, Rampant P. Faivre, M.C. Lesage, L.E. Purques, D. Prat // Theor Appl Genet. – 2000. – V. 100. – P. 299-307.
50. Baumbusch L.O. Efficient protocols for CAPS-based mapping in Arabidopsis / L.O. Baumbusch, I.K. Sundal, D.W. Hughes, G.A. Galau & K.S. Jakobsen // Plant Mol. Biol. Rep. – 2001 – V. 19. – P. 137-149.
51. Bhat K.V. DNA profiling of banana and plantain cultivars using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers / K.V. Bhat, R.L. Jarret, R.S. Rana // Electrophoresis. – 1995. – V. 16. – № 9. – P. 1736-1745.
52. Bornet B. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat(ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting / B.

Bornet, M. Branchard // Plant Molecular Biology Reporter. – 2001. – V. 19. – P. 209–215.

53. Brauner S. STS markers for comparative mapping in legumes / S. Brauner, R.L. Murphy, J.G. Walling, J. Przyborowski, N.F. Weeden // J. Amer. Soc. Hort. Sci. – 2002. – V. 127. – № 4. – P. 616-622.

54. Caetano-Anolles G. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers / G. Caetano-Anolles // PCR Methods and Applications. – 1993. – V. 4. – P. 85-94.

55. Causse M.A. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population / M.A. Causse, T.M. Fulton, Y.G. Cho, S.N. Ahn, J. Chunwongse, K. Wu, J. Xiao, Z. Yu, P.C. Ronald, S.E. Harrington // Genetics. – 1994. – V. 138. – № 4. – P. 1251-1274.

56. Celton J.-M. Construction of a dense genetic linkage map for apple rootstocks using SSRs developed from Malus ESTs and Pyrus genomic sequences / J.-M. Celton, D.S. Tustin, D. Chagné, S.E. Gardiner // Tree Genetics & Genomes – 2009. – V. 5. – P. 93–107.

57. Chang C. Restriction fragment length polymorphism linkage map for *Arabidopsis thaliana* / C. Chang, J.L. Bowman, A.W. DeJohn, E.S. Lander, E.M. Meyerowitz // Proc Natl Acad Sci. – 1988. – V. 85. – № 18.–P. 6856-6860.

58. Cheng F.S. Identification of codominant RAPD markers tightly linked to fruit skin color in apple / F.S. Cheng, N.F. Weeden, S.K. Brown // Theor.Appl.Genet. – 1996. – V. 93. – № 1/2. – P. 222-227.

59. Cheng Z. Functional rice centromeres are marked by a satellite repeat and a centromere-specific retrotransposon / Z. Cheng, F. Dong, T. Langdon, S. Ouyang, C.R. Buell, M. Gu, F.R. Blattner, J. Jiang // Plant Cell. – 2002. – V. 14. – № 8. – P. 1691-1704.

60. Cnops G. Chromosome landing at the *Arabidopsis tornado1* locus using an AFLP-based strategy / G.Cnops, den B. Boer, A. Gerats, Van M. Montagu, Van M. Lijsebettens // Mol Gen Genet. – 1996. – V. 253. – № 1-2. – P. 32-41.

61. Costa F. Map position and functional allelic diversity of *Md-Exp7*, a new putative expansin gene associated with fruit softening in apple (*Malus × domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus communis*) / F. Costa, Van W.E. de Weg, S. Stella, L. Dondini, D. Pratesi, S. Musacchi, S. Sansavini // Tree Genetics & Genomes – 2008. – V. 4. – P. 575–586.
62. Costa F. Role of the genes *Md-ACO1* and *Md-ACS1* in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh) / F. Costa, S. Stella, Van W.E. de Weg, W. Guerra, M. Cecchinell, J. Dallavia, B. Koller, S. Sansavini // Euphytica. – 2005. – V. 141. – P. 181–190.
63. Deng Z. Development and characterization of SCAR markers linked to the citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata* / Z. Deng, S. Huang, S.Y. Xiao, F.G. Gmitter, Jr. // Genome. – 1997. – V. 40. – P. 697-704.
64. Diao X. Horizontal Transfer of a Plant Transposon / X. Diao, M. Freeling, D. Lisch // PLoS Biol. – 2006. – V. 4. – № 1.–P. 5.
65. Dolatowski Jakub Molecular studies on the variability of polish semiwild Pears (*Pyrus*) using AFLP / Jakub Dolatowski, Jarosław Nowosielski // Journal of Fruit and Ornamental Plant Research. – 2004. – V. 12.
66. Ellis T.H.N. An integrated and comparative view of pea genetic and cytogenetic maps / T.H.N. Ellis, S.J. Poyser // New Phytologist. – 2002. – V. 153. – P. 17-25.
67. Galande A.A. Genetic analysis of kernel hardness in bread wheat using PCR-based markers / A.A. Galande, R. Tiwari, J.S.S. Ammiraju, D.K. Santra, M.D. Lagu, V.S. Rao, V.S. Gupta, B.K. Misra, S. Nagarajan, P.K. Ranjekar // Theor. Appl. Genet. – 2001. – V. 103. – P. 601-606.
68. Gardiner S.E. A detailed linkage map around an apple scab resistance gene demonstrates that two disease resistance classes both carry the *Vf* gene / S.E. Gardiner, H.C.M. Bassett, D.A.M. Noiton, V.G. Bus, M.E. Hofstee, A.G. White, R.D. Ball, R.L.S. Forster, E.H.A. Rikkerink // Theor. Appl. Genet. – 1996. – V. 93. – P. 485-493.

69. Gessler C., Blaise P. Differential resistance in apple against scab and its use in breeding and in orchard planting strategies to control the disease / C. Gessler, P. Blaise // Progress in Temperate Fruit Breeding. – Kluwer Acad. Publ., 1994. – P. 99-104.
70. Gianfranceschi L. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple / L. Gianfranceschi, N. Seglias, R. Tarchini, M. Komjanc, C. Gessler // Tree Genetics & Genomes. – 1998. – V. 96. – P. 1069-1076.
71. Giese H. Distribution of RAPD markers on a linkage map of barley / H. Giese, A.G. Holm-Jensen, H. Mathiassen, B. Kjær, S.K. Rasmussen, H. Bay, J. Jensen // Hereditas. – 1994. – V. 120. – P. 267-273.
72. Guilford P. Microsatellites in *Malus x domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification / P. Guilford, S. Prakash, J.M. Zhu, E. Rikkerink, S. Gardiner, H. Bassett, R. Forster // Theor. Appl. Genet. – 1997. – V. 94. – P. 249-254.
73. Gyga M. Molecular markers linked to the apple scab resistance gene *Vbj* derived from *Malus baccata* jackii / M. Gyga, L. Gianfranceschi, R. Liebhard, M. Kellerhals, C. Gessler, A. Patocchi // Theor Appl Genet. – 2004. – V. 109. – P. 1702-1709.
74. Harada T. An allele of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (*Md-ACS1*) accounts for the low level of ethylene production in climacteric fruits of some apple cultivars / T. Harada, T. Sunako, Y. Wakasa, J. Soejima, T. Satoh & M. Niizeki. // Theor Appl Genet. – 2000. – V. 101. – P. 742–746.
75. Hemmat M. Molecular marker linkage map for apple / M. Hemmat, N.F. Weeden, A.G. Manganaris, D.M. Lawson // The J. of Hered. – 1994. – V. 85. – № 1. – P. 4-11.
76. Herrmann R.G. Physical and topographical mapping among Triticeae chromosomes / R.G. Herrmann, R. Martin, W. Busch, G. Wanner, U. Hohmann // Symp Soc Exp Biol. – 1996. – V. 50. – P. 25-30.

77. Hicks M. The development of RAPD and microsatellite markers in lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia*) / M. Hicks, D. Adams, S. O'Keefe, E. Macdonald, R. Hodgetts // *Genome*. – 1998. – V. 41. – P. 797-805.
78. Hokanson S.C. Microsatellite (SSR) variation in a collection of *Malus* (apple) species and hybrids / S.C. Hokanson, W.F. Lamboy, A.K. Szewc-McFadden, J.R. McFerson // *Euphytica*. – 2001. – V. 118. – P. 281-294.
79. Hokanson S.C. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* Borkh. Core subset collection / S.C. Hokanson, A.K. Szewc-McFadden, W.F. Lamboy, J.R. McFerson // *Theor. Appl. Genet.* – 1998. – V. 97. – P. 671-683.
80. Hu J. Identification of brokkoli and cauli-flower cultivars with RAPD markers / J. Hu, C.F. Quiros // *Plant Cell Rep.* – 1991. – V. 10. – P. 505-511.
81. Irzikowska L. Interval Mapping of QTLs Controlling Some Morphological Traits In Pea / L. Irzikowska, B. Wolko, W.K. Świącicki // *Cell. Mol. Biol. Lett.* – 2002. – V. 7. – №. 2A. – P. 417-422.
82. Jena K.K. Comparative RFLP mapping of a wild rice, *Oryza officinalis*, and cultivated rice, *O. sativa* / K.K. Jena, G.S. Khush, G. Kochert // *Genome*. – 1994. – V. 37. – № 3. – P. 382-389.
83. Jiang C. RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus M in asparagus / C. Jiang, K.C. Sink // *Euphytica*. – 1997. – V. 94. – P. 229-333.
84. Jones C.J. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories / C.J. Jones, K.J. Edwards, S. Castiglione, M.O. Winfiels, F. Sala, C. Van der Wiel, B.L. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Brettschneider, P. Bettini, M. Buiatti, E. Maestri, N. Marmioli, R.L. Aert, G. Volckaert, J. Rueda, A. Vazques, A. Karp // *Molecular Breeding*. – 1997. – V. 3. – P. 381-390.

85. Kenis K. Genetic linkage maps of two apple cultivars (*Malus domestica* Borkh.) based on AFLP and microsatellite markers / K. Kenis, J. Keulemans // Molecular Breeding. – 2005. – V. 15. – P. 205-219.
86. Kesseli R.V., Paran I., Michelmore R.W. “Efficient mapping of specifically targeted genomic regions and the tagging of these regions with reliable PCR-based genetic markers”. In: Proceeding of the Symposium: “Application of RAPD technology to plant breeding”. Joint Plant Breeding Symposia Series. Minneapolis, Minnesota, US: 31-36, 1992.
87. Kojima T. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers / T. Kojima, T. Nagoda, K. Noda, Y. Ogihara // Theor Appl Genet. – 1998. – V. 96. – P. 37-45.
88. Konieczny A. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers / A. Konieczny, F.M. Ausubel // Plant J. – 1993. – V. 4. – №. 2. – P. 403-410.
89. Kumar L.D. DNA profiling of disputed chilli samples (*Capsicum annum*) using ISSR-PCR and FISSRPCR marker assays / L.D. Kumar, M. Kathirvel, G.V. Rao, J. Nagaraju // Forensic Sci. Int. – 2001. – V. 116. – P. 63-8.
90. Laroche A. Development of a PCR marker for rapid identification of the *Bt-10* gene for common bunt resistance in wheat / A. Laroche, T. Demeke, D.A. Gaudet, B. Puchalski, M. Frick, R. McKenzie // Genome. – 2000. – V. 43. – P. 217-223.
91. Lespinasse V. Apple scab. Resistance and durability. New races and strategies for the future / V. Lespinasse // Progress in Temperate Fruit Breeding. – Kluwer Acad. Publ., 1994. – P. 105-106.
92. Lespinasse Y. European project D.A.R.E. Durable Apple Resistance in Europe / Y. Lespinasse, C.E. Durel // Eucarpia, Fruit Breeding Section, Newsletter. – 1999. №4. – P. 2.
93. Liebhard R. Creating a saturated reference map for the apple (*Malus domestica* Borkh.) genome / R. Liebhard, B. Koller, L. Gianfranceschi, C. Gessler // Theor Appl Genet. – 2003. – V. 106. – P. 1497-1508.

94. Liebhard R. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.) / R. Liebhard, L. Gianfranceschi, B. Koller¹, C.D. Ryder, R. Tarchini, E. Van De Weg, C. Gessler // *Molecular Breeding*. – 2002. – V. 10. – P. 217–241.
95. Lodhi M.A. A molecular marker based linkage map of *Vitis* / M.A. Lodhi, M.J. Daly, G.N. Ye // *Genome*. – 1995. – V. 38. – P. 786-794.
96. Malik H.S. Adaptive evolution of Cid, a centromerespecific histone in *Drosophila* / H.S. Malik, S. Henikoff // *Genetics*. – 2001. – V. 157. – № 3. – P. 1293-1298.
97. Manganaris A.C. Isozyme locus *Pmg-1* is tightly linked to a gene (*Vf*) for scab resistance in apple / A.C. Manganaris, F.H. Alston, N.F. Weeden, H.S. Aldwinckle, H.L. Gustafson, S.K. Brown // *J.Am.Soc.Hortic.Sci.* – 1994. – V. 119. – P. 1286-1288
98. Manzanares-Dauleux M.J. Development of pathotype specific SCAR marker in *Plasmodiophora brassicae* / M.J. Manzanares-Dauleux, P. Barret, G. Thomas // *European Journal of Plant Pathology*. – 2000. – V. 106. – P. 781-787.
99. Markussen T. Identification of PCR-based markers linked to the powdery-mildew-resistance gene *Pl1* from *Malus robusta* in cultivated apple / T. Markussen, J. Kruger, H. Schmidt, F. Dunemann // *Plant Breeding*. – 1995. – V. 114. – P. 530-534.
100. McCouch S.R. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding / S.R. McCouch, X. Chen, O. Panaud, S. Temnykh, Y. Xu, Y.G. Cho, N. Huang, T. Ishii, M. Blair // *Plant Mol Biol.* – 1997. – V. 35. – № 1-2. – P. 89-99
101. McQueen-Mason S. Disruption of Hydrogen Bonding between Wall Polymers by Proteins That Induce Plant Wall Extension / S. McQueen-Mason, D.J. Cosgrove // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1994. – V. 91. P. 6574-6578.
102. Men A.E. Identification of DNA amplification fingerprinting (DAF) markers close to the symbiosis ineffective *sym31* mutation of pea (*Pisum sativum* L.) / A.E. Men, A.Y. Borisov, S.M. Rozov, K.V. Ushakov, V.E. Tsyganov, I.A.

Tikhonovich, P.M. Gresshoff // Theor. Appl. Genet. – 1999. – V. 98. – P. 929-936.

103. Metzgar D. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA / D. Metzgar, J. Bytof, C. Wills // Genome Res. – 2000. – V. 10. – №. 1. – P. 72-80.

104. Mun J.H. Distribution of microsatellites in the genome of *Medicago truncatula*: a resource of genetic markers that integrate genetic and physical maps / J.H. Mun, D.J. Kim, H.K. Choi, J. Gish, F. Debelle, J. Mudge, R. Denny, G. Endre, O. Saurat, A.M. Dubez, G.B. Kiss, B. Roe, N.D. Young, D.R. Cook // Genetics. – 2006. – V. 172. – №. 4. – P. 2541-2555.

105. Nagaoka T. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers / T. Nagaoka, Y. Ogihara // Theor Appl Genet. – 1997. – V. 94. – P. 597-602.

106. Nagaraju J. Silkworm genomics-progress and prospects / J. Nagaraju, M.R. Goldsmith // Current Science. – 2002. – V. 83. – №. 4. – P. 415-425.

107. Nguyen H.T. and Wu X. “Molecular Marker Systems for Genetic Mapping”. In: “The Handbook of Plant Genome Mapping. Genetic and Physical Map-ping”. Eds.: Meksem K. and Kahl G. Wiley-VCH, Weinheim, 2005.

108. Paniego N. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.) / N. Paniego, M. Echaide, M. Munoz, L. Fernandez, S. Torales, P. Faccio, I. Fuxan, M. Carrera, R. Zandomeni, E.Y. Suarez, H.E. Hopp // Genome. – 2002. – V. 45. – № 1. – P. 34-43.

109. Parisi L., Lespinasse V., Guillaumes J., Kruger J. A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples With resistance due to the *Vf* gene / L. Parisi, V. Lespinasse, J. Guillaumes, J.Kruger // Phytopathology. – 1993. – Vol. 83, N 5. – P. 533-537.

110. Patocchi A. Identification by genome scanning approach (GSA) of a microsatellite tightly associated with the apple scab resistance gene *Vm* / A.

Patocchi, M. Walser, S. Tartarini, G.A.L. Broggini, F. Gennari, S. Sansavini, C. Gessler // Genome. – 2005. – V. 48. – P. 630–636.

111. Pereira-Lorenzo Santiago Evaluation of genetic identity and variation of local apple cultivars (*Malus domestica* Borkh.) from Spain using microsatellite markers / Santiago Pereira-Lorenzo, Ana Mari'a Ramos-Cabrera, Mari'a Belén Díaz-Hernández // Genet Resour Crop Evol Genomes. – 2007. – V. 54. – P. 405–420.

112. Rameau C. Genetic mapping in pea. 2. Identification of RAPD and SCAR markers linked to genes affecting plant architecture / C. Rameau, D. Denoue, F. Fraval, K. Haurogne, J. Josserand, V. Laucou, S. Batge, I.C. Murfet // Theor Appl Genet. – 1998. – V. 97. – P. 916-928.

113. Rao G.U. Mapping of yield-related QTLs in pepper in an interspecific cross of *Capsicum annuum* and *C. frutescens* / G.U. Rao, A. Ben Chaim, Y. Borovsky, I. Paran // Theor Appl Genet. – 2003. – V. 106. – № 8. – P. 1457-1466.

114. Roche P. RFLP and RAPD markers linkage to the rosy leaf curling aphid resistance gene (*Sd1*) in apple / P. Roche, F.H. Alston, C. Maliepaard // Theor. Appl. Genet. – 1997. – V. 94. – P. 528-533.

115. Schmidt T. LINEs, SINEs and repetitive DNA: non-LTR retrotransposons in plant genomes / T. Schmidt // Plant Molecular Biology. – 1999. – V. 40. – P. 903–910.

116. Sharma S. Organization and evolution of highly repeated satellite DNA sequences in plant chromosomes / S. Sharma, S.N. Raina // Cytogenet Genome Res. – 2005. – V. 109. – P. 15-26.

117. Silfverberg-Dilworth E. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome / E. Silfverberg-Dilworth, C.L. Matasci, W.E. Van de Weg, M.P. W. Van Kaauwen, M. Walser, L.P. Kodde, V. Soglio, L. Gianfranceschi, C.E. Durel, F. Costa, T. Yamamoto, B. Koller, C. Gessler, A. Patocchi // Tree Genetics & Genomes. – 2006. – V. 2. – P. 202-224.

118. Soriano J.M. Identification and mapping of the novel apple scab resistance gene *Vd3* / J.M. Soriano, S.G. Joshi, M. van Kaauwen, Y. Noordijk, R. Groenwold, B. Henken, W.E. van de Weg, H.J. Schouten // *Tree Genetics & Genomes* – 2009. – V. 5. – P. 475–482.
119. Southern E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis / E.M. Southern // *J. Mol. Biol.* – 1975. – V. 98. – № 3. – P. 503-517.
120. Sunako T. An allele of the ripening-specific 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid synthase (*ACS1*) in apple fruit with a long storage life / T. Sunako, W. Sakuraba, M. Senda, S. Akada, R. Ishikawa, M. Niizeki, T. Harada // *Plant Physiol.* – 1999. – V. 119. – P. 1297–1303.
121. Tautz D. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation / D. Tautz, M. Trick, G.A. Dover // *Nature*. – 1986. – V. 322. – № 6080. – P. 652-656.
122. The Arabidopsis Genome Initiative “Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*”. *Nature* 408: 796-815, 2000.
123. Tiwari K.R. Inheritance of powdery mildew resistance in pea / K.R. Tiwari, G.A. Penner, T.D. Warkentin // *Can. J. Plant Sci.* – 1997. – V. 77. – P. 307-310.
124. Velasco Riccardo The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.) / Riccardo Velasco, Andrey Zharkikh, Jason Affourtit // *Nature Genetics* – 2010. – V. 42. – P. 833-841.
125. Vergnaud G. Minisatellites: Mutability and Genome Architecture / G. Vergnaud, F. Denoeud // *Genome Research*. – 2000. – V. 10. – P. 899-907.
126. Vinatzer B. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of apple / B. Vinatzer, H. Zhang, S. Sansavini // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1998. – V. 42. – P. 1183-1190.
127. Viviani A., Kellerhals M., Gianfranceschi., Gessler C. Towards marker-assisted breeding of scab resistant apple cultivars / A. Viviani, M.

Kellerhals, Gianfranceschi., C.Gessler // Eucarpia Fruit breeding section newsletter. – 1996. – N 2. – P. 25-26.

128. Vos P. AFLP a new technique for DNA fingerprinting / P. Vos, R. Hogers, M. Bleeker // Nucleic Acid Res. – 1995. – V. 23. – P. 4407-4414.

129. Weeden N.F. Inheritance and reliability of RAPD markers / N.F. Weeden, G.M. Timmerman, M. Hemmat, B.E. Kneen, M.A. Lodhi // Applications of RAPD Technology to Plant Breeding. – 1993. – P. 12-17.

130. Weising K. DNA fingerprinting in plants and fungi / K. Weising, H. Nybom, K. Wolff, W. Meyer // Boca Raton: CRC Press. – 1995. – P. 322.

131. Weng C. SCAR markers in a longleaf pine $\times$ slash pine F1 family / C. Weng, T.L. Kubisiak, M. Stine // Forest Genetics. – 1998. – V. 5. – № 4. – P. 239-247.

132. Williams J.G.K. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers / J.G.K. Williams, A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Ra-falski, S.V. Tingey // Nucl. Acids Res. – 1990. – V. 18. – P. 6531-6535.

133. Wu C. A BAC- and BIBAC-based physical map of the soybean genome / C. Wu, S. Sun, P. Nimmakayala, F.A. Santos, K. Meksem, R. Springman, K. Ding, D.A. Lightfoot, H.B. Zhang // Genome Res. – 2004. – V. 14. – № 2. – P. 319-326.

134. Xu M.L. Sauration mapping of the apple scab resistance gene Vfusing AFLP markers / M.L. Xu, S.S. Korban // Theor.Appl.Genet. – 2000. – V. 101. – P. 844-851.

135. Yang H. Selection of a mutant from adventitious shoots formed in x-ray treated cherry leaves and differentiation of standard and mutant with RAPDs / H. Yang, H. Schmidt // Progress, in temperate fruit breeding: Eucarpia Fruit Breeding, sect. Meeting (Dordrecht, 30 August - 3 September) / Eds. H. Schmidt, M. Kellerhals. – Dordrecht Kluwer Academic Publishers – 1994 – P. 287-290.

136. Yang H.Y. A random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker tightly linked to the scab-resistance gene Vf in apple / H.Y. Yang, S.S. Korban, J. Kruger, H. Schmidt // J.Amer.Soc.Hort.Sci. – 1997. – V. 122. – №1. – P. 47-52.

137. Yi-Ke Tian Mapping Co, a gene controlling the columnar phenotype of apple, with molecular markers / Yi-Ke Tian, Cai-Hong Wang, Ji-Shu Zhang, Celia James & Hong-Yi Dai // *Euphytica*. – 2005. – V. 145. – P. 181–188.

138. Zeinalabedini M. Comparison of the use of morphological, protein and DNA markers in the genetic characterization of Iranian wild *Prunus* species / M. Zeinalabedini, K. Majourhat, M. Khayam-Nekoui, V. Grigoriana, M. Torchi, F. Dicenta, P. Martí'nez-Gomez.

139. Zietkiewicz E. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification / E. Zietkiewicz, A. Rafalski, D. Labuda // *Genomics*. – 1994. – V. 20. – P. 176-183.

Zijlstra C. Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR: a powerful way of enabling reliable identification of population or individuals that share common traits / C. Zijlstra // *European journal of Plant Physiology*. – 2000. – V. 106. – P. 283-290.

Краткое описание методики выделения растительной ДНК из материала с высоким содержанием полифенольных соединений (по D. Puchooa 2004):

1. Свежие молодые листья поместить в пробирки эппендорф на 1,5 мл, добавить по 500 мкл лизирующего буфера (100mM Tris pH=8.0, 20mM EDTA pH=8.0, 2M NaCl, 2% поливинилпироллидон, 5% меркаптоэтанол, 2% СТАВ, 10mM AcNH₄). Гомогенизировать ткань с помощью пестика, который после каждого образца промывают и споласкивают дистиллированной водой. Термостатировать при 60°C 20 минут.

2. Затем добавить равный объём хлороформа, хорошо перемешать фазы плавным переворачиванием – как бы рисуя рукой восьмёрку, затем отцентрифугировать 5 минут при 12 тыс. оборотов чтобы разделить фазы. В результате чего весь клеточный дербис останется внизу. Отобрать верхнюю фазу и перенести в новую пробирку. Снова добавить хлороформ и повторить процедуру.

3. К раствору добавить две трети объёма изопропанола. Отцентрифугировать пробирку при 13 тыс. оборотах 15 минут, жидкость слить.

4. Промыть осадок 100мкл буфера, содержащего TE, 75% этанол, 10mM AcNH₄. Отцентрифугировать пробирку несколько секунд. Слить буфер. Повторить процедуру трижды. Перед последним сливом буфера центрифугирование в течение двух минут. Затем необходимо отобрать остатки жидкости с помощью пипетки, не задевая осадка.

5. Осадок подсушить до исчезновения блеска.

6. Растворить осадок в 100мкл TE.

7. Добавить 50мкл 5M NaCl.

8. Добавить два объёма 70% этанола. Отцентрифугировать при 10 тыс оборотов в минуту в течение 15 минут. Жидкость слить.

9. Пункты 5-7 повторить при необходимости – осадок должен хорошо растворяться в ТЕ.

10. Промыть осадок 100 мкл 80% этанола.

11. Подсушить осадок и растворить в 20-30 мкл mQ (вода высокой очистки).

Краткое описание методики выделения растительной ДНК из материала с высоким содержанием полифенольных соединений (по А.В. Форте 2002):

1. Биомассу помещают в 1,5 мл пробирку с 400 мкл лизирующего буфера (NaCl 5м, ЭДТА (динатриевая соль) 0,5 м, SDS 10%)
2. Растирают материал до гомогенного состояния, встряхивают на вортексе.
3. Инкубируют 20 мин при 65°C пару раз, перемешав на вортексе.
4. Добавляют 200 мкл 5М ацетата калия (холодного!) и перемешивают.
5. Инкубируют пробирку на льду не менее 20 мин
6. Центрифугируют пробирку 15 мин при 12000 оборотах
7. Отбирают верхнюю фазу и перемещают ее в новую пробирку; добавляют 750 мкл фенол-хлороформенной смеси (1:1).
8. Центрифугируют пробирку 10 мин при 12000 оборотах.
9. Аккуратно, не задевая слой хлороформа, отобрать верхнюю фазу и перемещают ее в новую пробирку. Если отбор произведен не очень чисто, повторяют пункты 7-8.
10. Отбирают верхнюю фазу и перемещают ее в новую пробирку; добавляют 750 мкл смеси хлороформа с изоамиловым спиртом (24:1), перемешивают вручную (не менее 1 мин.).
11. Центрифугируют пробирку 10 мин при 12000 оборотах.
12. Аккуратно, не задевая слой хлороформа, отобрать верхнюю фазу и перемещают ее в новую пробирку. Если отбор произведен не очень чисто, повторяют пункты 7-8.
13. Добавляют во все пробирки 2 объема (около 900-1000 мкл) ледяного 96% этанола, аккуратно переворачивают пробирку несколько раз (объем этанола зависит от объема в конкретной пробирке; добавляется в 2 раза больше него).

14. Инкубирую пробирку 30 мин на -20°C .
15. Центрифугируют пробирку 15 мин при 12000 оборотах
16. Промывают осадок 3 раза холодным 70% этанолом, каждый раз центрифугируя по 5 мин при 12000 об.; после последней промывки удаляют остатки спирта пипеткой.
17. Просушивают осадок на столе или термоблоке (около 50°C) до исчезновения запаха спирта.
18. Растворяют осадок ДНК в 100 мкл MQ, добавить 4 мкл раствора РНК-азы А (10 нг/мкл), инкубировать 20 мин при 37°C .
19. Провести очистку ДНК хлористым литием.
- 19.1. К выделенной растворенной в воде ДНК добавить один объем (100 мкл) 3М хлорид лития и прогреть 20 мин. при 65°C в термостате.
- 19.2. Добавить раствор 40% ПЭГ 8000 до 10% конечной концентрации (50 мкл), подержать 20 мин на холоде и внести один объем изопропанола.
- 19.3. Центрифугировать 15 мин при 12 000 об.
- 19.4. Осадок трижды промыть 70% этанолом.
- 19.5. Подсушенную ДНК растворить в 100мкл стерильной деионизированной воды.