

На правах рукописи

ШАМШИН ИВАН НИКОЛАЕВИЧ

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

Специальности:

03.02.07 – Генетика

06.01.05 – селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2014

Диссертационная работа выполнена во Всероссийском научно-исследовательском институте генетики и селекции плодовых растений им. И.В. Мичурина

Научные руководители: доктор биологических наук
Кудрявцев Александр Михайлович
зам. директора Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН
академик, доктор сельскохозяйственных наук
Савельев Николай Иванович
директор Всероссийского НИИ генетики и селекции плодовых растений им. Н.И. Мичурина
доктор биологических наук

Официальные оппоненты: **Матвеева Татьяна Валерьевна**
доцент кафедры генетики и биотехнологии
Санкт-Петербургского государственного университета

кандидат биологических наук
Бурляева Марина Олеговна
старший научный сотрудник
отдела ГР зернобобовых культур
Всероссийского НИИ растениеводства
имени Н.И. Вавилова

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур

Защита диссертации состоится «10» декабря 2014 г. в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д 006.041.01 при Всероссийском научно-исследовательском институте растениеводства им. Н.И. Вавилова по адресу: 190000, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 44; факс (812) 571-87-28; email: v.gavrilova@vir.nw.ru

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства им. Н.И. Вавилова и на сайте: <http://vir.nw.ru>

Автореферат размещен на сайтах ВАК и ВИР «10» октября 2014 г и разослан «10» ноября 2014 г.

Отзывы на автореферат в двух экземплярах, заверенные гербовой печатью, просим направлять ученому секретарю диссертационного совета.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Вера Алексеевна Гаврилова

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследований. Яблоня является одной из важнейших плодовых культур. В России ее насаждения занимают более 70% всех площадей садов. Разнообразиие 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.

Цель и задачи исследований. Целью работы было изучение генетического полиморфизма сортов и форм яблони из коллекции ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина на основе анализа микросателлитных последовательностей генома и целевых аллелей генов устойчивости к парше, а также генов, контролирующих продолжительную сохранность плодов.

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.

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 секвенирования в коллекции сортов ВНИИГиСПР идентифицированы генотипы, обладающие моногенной устойчивостью к парше, контролируемую геном *Vf*.

Практическая значимость исследований.

Идентифицированы генисточники гена контролирующего моногенную устойчивость к парше у яблони.

Выявлены генотипы, несущие целевые аллели генов продолжительной сохранности плодов. В частности выделены сорта, содержащие аллели генов *Md-ACO1* и *Md-ACSI*, 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.

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 конфе-

рениция «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.М04.11.00).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 6 в рецензируемых ВАК изданиях, 1 методические рекомендации.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 117 страницах компьютерного текста, состоит из введения, 5 глав, выводов, практических рекомендаций для селекции, списка литературы (141 наименование, в том числе 93 зарубежных автора), двух приложений, содержит 14 таблиц и 12 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2 ОБЪЕКТЫ, МЕТОДИКА И УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Биологическими объектами исследования послужили сорта и гибридные формы яблони из коллекции ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина. Всего проанализировано 72 генотипа. 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. Так же использовали методику Д. Пучоа (Puchoa, 2004) адаптированную для работы с растительным материалом с высоким содержанием фенольных соединений.

Для идентификации гена *Vf* использовали ПЦР с праймером *VfC* (Afuni-an et al., 2004). Идентификацию генов, вовлеченных в биосинтез этилена, проводили, используя праймеры *Md-ACO1* и *Md-ACS1* (Costa, 2005). Ген, вовлеченный в синтез экспансина в плодах яблони, идентифицировали с помощью праймера *MD-Exp7* (Costa, 2008). Анализ генетического полиморфизма сортов и гибридных форм яблони проводили с использованием 15 микросателлитных праймеров (Gianfranceschi, 1998). Все используемые в работе праймеры были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия, Москва). Амплификацию проводили в приборе GeneAmp 9700 производства фирмы «Applied Biosystems» или ДТ-96 фирмы «ДНК-технология».

Разделение продуктов амплификации с праймерами *VfC*, *Md-ACO1* и *Md-ACS1* проводили путем электрофореза в 2% агарозном геле.

Разделение продуктов амплификации с микросателлитными праймерами проводили путем электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в камере для вертикального электрофореза Sequi-gen GT system (BIO-RAD). Проявляли

гель, используя метод окрашивания нитратом серебра (Benbouza et al., 2006). Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали маркер молекулярной массы 10bp DNA ladder (Invitrogen) (0,05 г/л).

Статистический анализ данных микросателлитного анализа был проведен с использованием программы Past 4.8. В статистический анализ были включены только четкие, воспроизводимые фрагменты.

Показатель генетического разнообразия рассчитывали по Нею:

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

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).

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 программы MEGA5.0 и Chromas 4.0.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Оценка генетического разнообразия яблони с использованием анализа микросателлитов

Выбранные микросателлитные 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.

Всего было выявлено 217 SSR-фрагментов 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.

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. Из 36 выделенных образцов, для которых идентифицированы уникальные аллели, присутствуют только 5 сортов зарубежной селекции.

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(рис. 1).

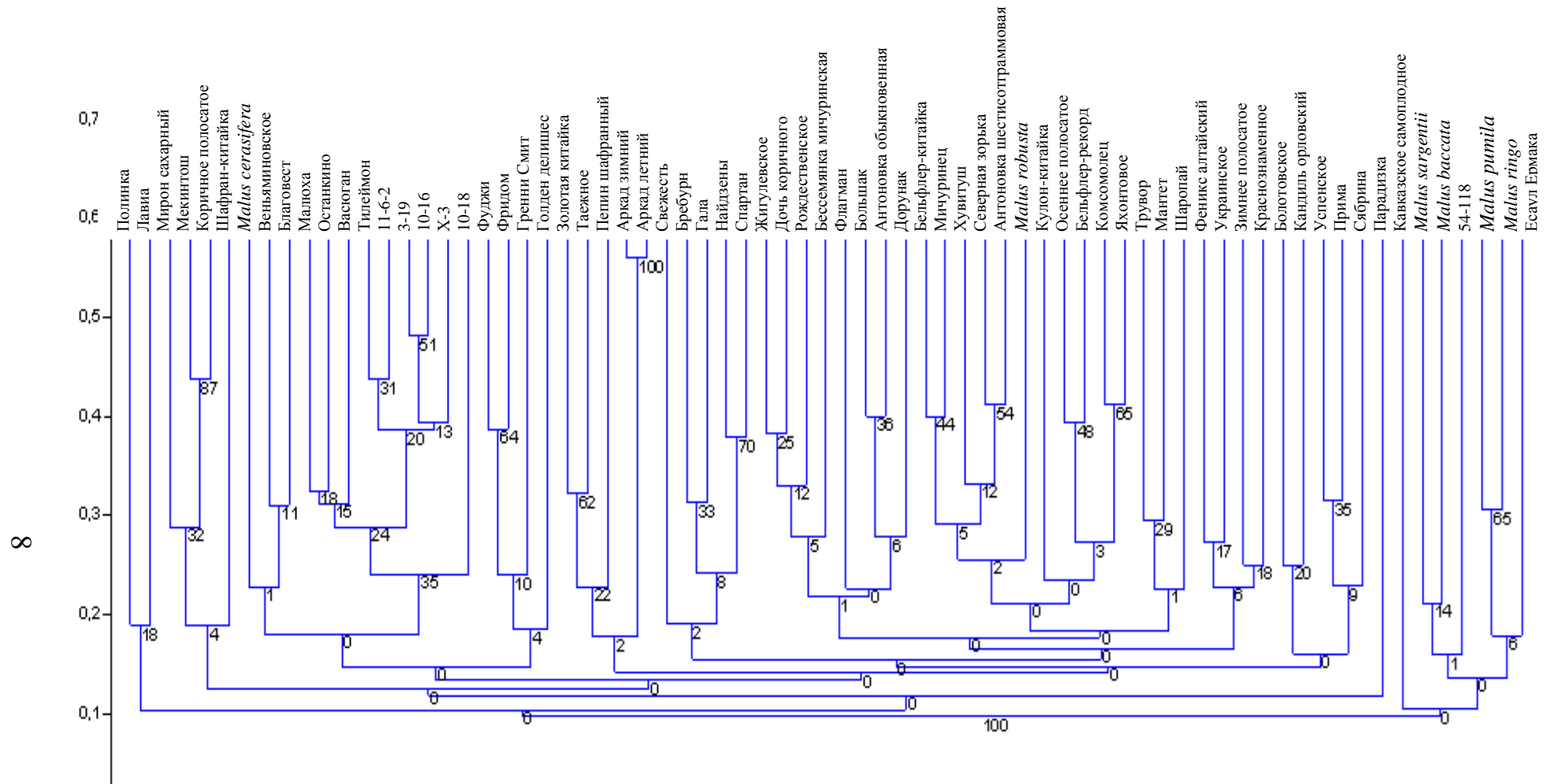


Рис. 1 Дендрограмма генетического сходства сортов и форм яблони на основании анализа 15 микросателлитных локусов

Из дендрограммы видно, что четкое разделения на кластеры у коллекционных образцов отсутствует, что подтверждает и низкое значение индекса бутстреп. Вероятно, это связано с большим разнообразием коллекционных образцов, поскольку в анализируемой коллекции собраны разнообразные сорта яблони селекции различных регионов нашей страны и зарубежных стран, созданные в различное время.

Велика доля сортов полученных от свободного опыления и сортов народной селекции. В происхождение значительной части исследуемых образцов принимали участие дикие виды рода *Malus*. Такие скрещивания характерны, в частности, для сортов селекции И.В. Мичурина.

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. 2).

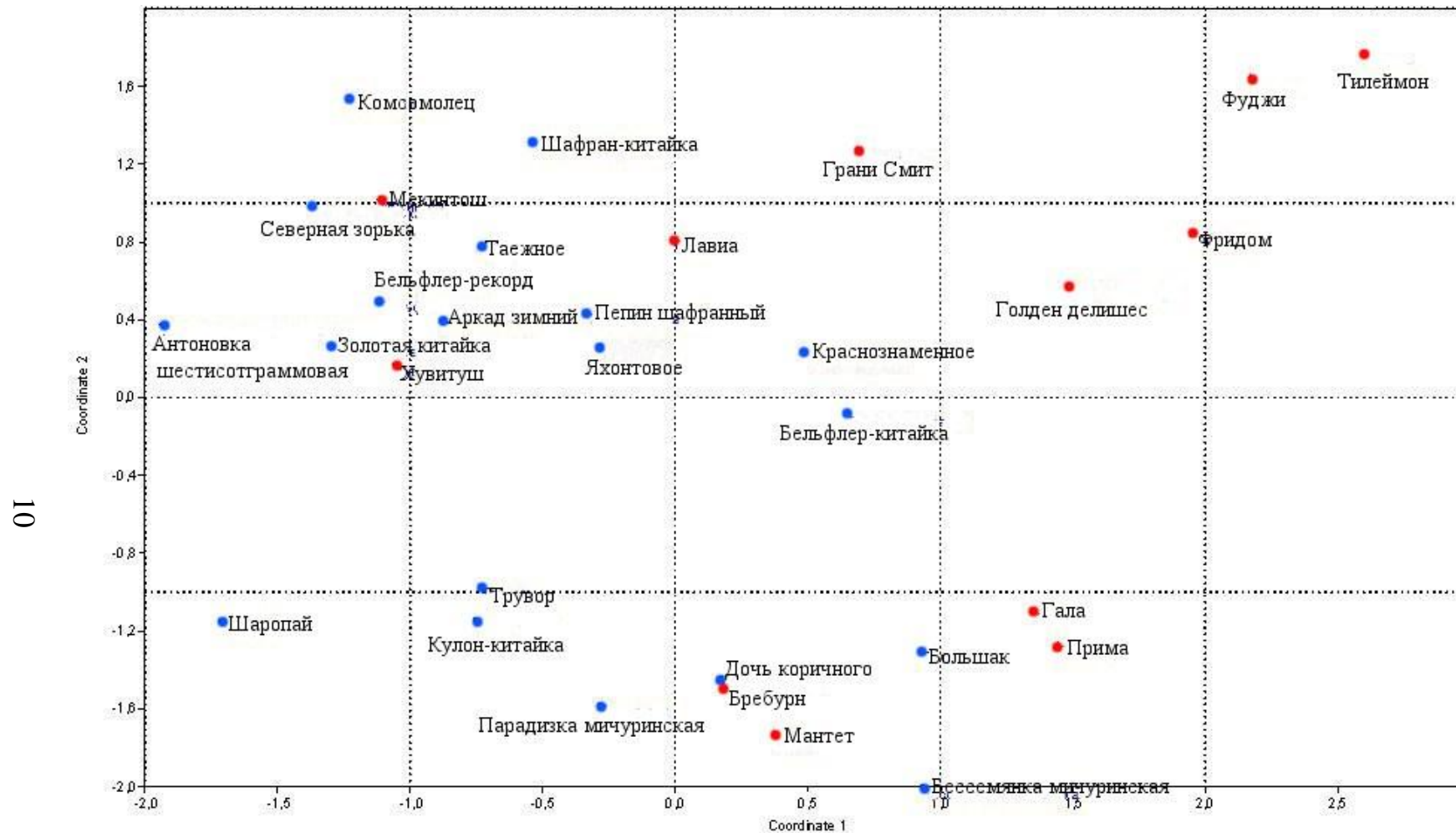


Рис. 2 Расположение сортов селекции И.В. Мичурина и зарубежных сортов в главных координатах на основе анализа 15 микросателлитных локусов генома

- - 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 дерева 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.

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 для определения сортовой специфичности является 11 праймерных пар: CH03d12, CH03d07, CH02c02b, CH01f03b, CH03d08, CH05g08, CH02g04, CH04e07, CH03d11, CH03d01, CH03a04. Установлено, что данного количество 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>c9</i> (108)
	CH03d07	<i>p6</i> (217)
	CH02c02b	<i>d2</i> (109)
	CH01f03b	<i>a1</i> (140)
	CH03d08	<i>a7</i> (123); <i>k7</i> (147)
	CH05g08	<i>g13</i> (178); <i>j13</i> (192)
	CH02g04	<i>m3</i> (198)
	CH04c07	<i>m10</i> (138); <i>b10</i> (98)
	CH03d11	<i>g8</i> (120)
	CH03d01	<i>c5</i> (114)
CH03a04	<i>m4</i> (112); <i>f4</i> (98)	

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

Для выявления распространения гена в анализируемой коллекции сортов и форм яблони применяли STS-маркер *VfC* разработанный Afunian M.R. (Afunian et al., 2004).

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

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. Такими сортами являются: Благовест, Веньяминовское, Кандиль орловский, Былина, Успенское, Болотовское, Прима, Рождественское, Флагман, Надзейны, Сябина, Фридом и сортовая форма 3-19.

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. Секвенированные последовательности были выровнены и приведены на рисунке 3. Приведен поиск аналогичных последовательностей в базе данных NCBI. Секвенированный фрагмент *Vfa4* совпадает на 99% с последовательностью гена *HcrVf3Malus floribunda* расположенной в генбанке под номером AJ297741. Это подтверждает, что амплифицируемый у части образцов фрагмент размером 286 п.н. является участком гена *Vf*.

Md-Vf1	ATATCACATATTTGAGGGAAATTGATTTGTCAGAT-----	35
Md-Vf2	ATATCACATCTTTGAGGGAAATTGATTTGTCATCCAATTATATTAGTCTTGATCCGA	57
Md-Vf3	ATATCACATCTTTGAGGGAAATTGATTTGTCATTCAATTCATTAGTCTTGATCCGA	57
	-----> VfC1F	
Md-Vf1	-----	
Md-Vf2	TTCCCAAATGGCTGCTTTAACCAGAAAGATC?TTGCATTGAGTCTAGAATCCAATGA	114
Md-Vf3	TTCCCAAATGTTGGTTTACCCAAAAAATCCGTTGAATTGAGTCTAGAATCCAATCA	114
Md-Vf1	-----	
Md-Vf2	ACTTACAGGACAACCTTCCAAGCATCATTCAGAATATGACTGGTCTTAAAGTTCTTGA	171
Md-Vf3	ACTTACAGGACAACCTTCCAAGAAATTCAGAATATGACTGGTCTTACAACCTTAA	171
Md-Vf1	-----	
Md-Vf2	TCTCGGATGGAACGACTTCAATTCACCATACCTGAATGGTTGTATAGCTTGAACAA	228
Md-Vf3	TCTCGGGGGGAACGAATTCATTCACCATACCTGAATGGTTGTATAGCTTGAACAA	228
Md-Vf1	-----	
Md-Vf2	TCTCGAGTCTTTACTTCTTCTTACAATGCCTTGCCTGGTGAATATCGAGTCCAT	285
Md-Vf3	TCTCGAGTCTTACTTCTTTTGGCAATGCCTTACGTGGTGAATATCGAGTCCAT	285
Md-Vf1	-----	
Md-Vf2	TGGAAACATGACATCCCTTGTCATCTTCACTTGGATGGTAATCAGTTGGAAGGGAA	342
Md-Vf3	TGGAAACCTTAAAGTTTAAAGGCACTTTGATCTTTCAAGTAATTCA-----	331
Md-Vf1	-----AA	37
Md-Vf2	AATCCCAAATTCCTTGGGACATCTTTGTAAGTTGAAAGTTCTTGATCTGTCAAASAA	399
Md-Vf3	-----	331
Md-Vf1	CAATTTACGGTTCAAAGACCATCCGAAATCTTTGAAAGTTTGTCCAGATGTGGTCC	95
Md-Vf2	CCATTTACGGTTTCAAGACCATCCGAAATCTTCAAGTTTGTCCAAATGTGGTCC	456
Md-Vf3	-----	331
Md-Vf1	AGATGGAATAAAGTCATTGTCGTTGAGGAATACTAATGTATCAGGTCCCATTCCAAT	152
Md-Vf2	AGATGGAATAAAGTCATTGTCATTGAGGTATACTAATATATCAGGTCCCATTCCAAT	513
Md-Vf3	-----ATATCAGGTCCCATTCCAAT	351
Md-Vf1	GTCACTAGGAAATATGTCAAGCTTAGAAAAATTGGACATATCTGTAATCAGTTTA	209
Md-Vf2	GTCACTAGGAAATCTGTCAAGCTTAGAAAAATTGGACATATCTGGAAATCATTTTA	570
Md-Vf3	GTCACTAGGAAATCTATCAAGCTTAGAAAAATTGTACATATCTGAAATCATTTTA	408
Md-Vf1	ATGGAACCTTTCACAGAAGTTATTGGTCAACTCAAAATGCTAACGA	254
Md-Vf2	ATGGAACCTTTCACAGAAGTTATTGGTCAACTCAAAATGCTAACGA	615
Md-Vf3	ATGGAACCTTTCACAGAAGTTATTGGTCAACTCAAAATGCTAACGA	463
	-----< VfC2R	

Рисунок 3 Выравнивание нуклеотидных последовательностей амплифицируемых фрагментов: Md-Vf1 – *Vfa4*, Md-Vf2 – *Vfa1*, Md-Vf3 – *Vfa2* и. Стрелками обозначены места отжига праймеров.

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

Товарные качества плодов обуславливает их внешний вид, который зависит от сроков сохранности. Знание о наличии генетических компонентов, ответственных за лежкость, значительно повысит эффективность получения новых конкурентоспособных сортов. Ключевыми факторами сохранности плода является уровень биосинтеза этилена, который проходит в два этапа при участии ферментов АСС-синтазы и АСС-оксидазы (Yanmin Zhu&Bruce H.Barritt, 2008).

Для анализа аллельного состояния генов *Md-ACS1* и *Md-ACO1* в геноплазме сортов и форм яблони была проведена амплификация геномной ДНК с праймерами *Md-ACS1* и *Md-ACO1*.

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.

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 форм гена у сортов и форм яблони. Интересным является факт отсутствия аллеля 1 в стародавних сортах отечественной селекции, сортах народной селекции и диких видах яблони. Аллельная форма 2 данного гена появляется у сортов селекции зарубежных стран и современных российских сортов, в родословной которых присутствуют зарубежные сорта.

Изучение происхождения сортов зарубежной селекции, анализируемых в работе, показало, что родительскими формами большинства из них являются сорт Голден делишес. Это позволяет предположить, что дефектный аллель

Md-ACS1-2, обуславливающая 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.

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 – *Malus baccata*, *Malus pumila* и *Malus ringo*. Среди сортов аллель *Md-ACO1-1* отмечен у сорта зарубежной селекции Фуджи.

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 дикие виды яблони (*Malus baccata*, *Malus pumila* и *Malus ringo*).

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

Одним из важных компонентов длительной лежкости плода является его способность длительное время сохранять высокую плотность мякоти. Смягчение фруктов – процесс, происходящий из-за деполимеризации различных классов полисахаридов. Экспансин – белок, участвующий в нарушении нековалентных связей между матрицей гемицеллюлозы и целлюлозы микрофибрилл. Для гена, вовлеченного в биосинтез экспансина у яблони, был разработан микросателлитный маркер, который позволяет идентифицировать аллельные состояния гена *MD-Exp7*.

Аллельное разнообразие гена *MD-Exp7* оценивали с использованием микросателлитного праймера *MD-Exp7^{SSR}*. В результате проведенной ампли-

фикации выявлено 3 аллельных формы гена: *MD-Exp7-1*, *MD-Exp7-2* и *MD-Exp7-3*.

Анализируемые сорта яблони содержат различные комбинации аллелей гена *MD-Exp7*.

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 биосинтеза экспансина 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 уровне 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*, обуславливающую 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 дикий вид яблони – Яблоня Недзвецкого. Это позволяет предположить, что данный вид является генисточником аллели 3.

Выделены генотипы, сочетающие все три аллельных формы гена. Таковыми 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.

На основании полученных ранее результатов рассмотрено соотношение аллельных форм генов вовлеченных в биосинтез этилена и гена ответственного за синтез экспансина. Анализ показывает, что соотношение аллельных форм *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 Хувитус и Грэнни Смит. Такое сочетание аллелей говорит о сниженном уровне синтеза продуктов данных генов, что обуславливает продолжительные сроки хранения плодов данных сортов яблоны.

4 Применение методов маркер-опосредованной селекции для получения новых генотипов яблоны

Оценка коллекции сортов и форм яблоны 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 яблоны 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 селективируемым генам и выявления доноров с комплексом важных признаков. Так, проведя анализ сортов и форм яблони из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института генетики и селекции плодовых растений им. И.В. Мичурина установлено, что исследуемые генотипы содержат большое количество уникальных микросателлитных локусов генома, что делает ее высокополиморфной 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.

5 Экономическая эффективность использования методов ДНК-технологии.

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. Оценка методов молекулярной диагностики и стандартных методов приведена в таблице 1.

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 посадки семян в почву.

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 (SN03d12, SN03d07, SN02c02b, SN01f03b, SN03d08, SN05g08, SN02g04, SN04e07, SN03d11, SN03d01, SN03a04) 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, Сябина, 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 проведении селекционной работы в качестве генисточников гена длительной лежкости плодов яблони (ген *Md-ACSI*) 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 работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Шамшин И.Н., Савельев Н.И., Кудрявцев А.М. Применение молекулярных маркеров для идентификации генотипов яблони с геном устойчивости к парше / И.Н. Шамшин, Н.И. Савельев, А.М. Кудрявцев // Плодоводство и ягодоводство России: сб. науч. работ – 2011. – Т. 26. – С. 126-129.

2. Шамшин И.Н., Кудрявцев А.М., Савельева И.Н. Скрининг колонновидных генотипов яблони методом молекулярно-генетического анализа / И.Н. Шамшин, А.М. Кудрявцев, И.Н. Савельева // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета – 2011. – №2 Ч. 1 – С. 55-58

3. Савельев Н.И., Юшков А.Н., Шамшин И.Н. Применение метода молекулярных маркеров для изучения генетического разнообразия плодовых культур / Н.И. Савельев, А.Н. Юшков, И.Н. Шамшин // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета – 2011. – №2 Ч. 1 – С. 8-12.

4. Шамшин И.Н. Оценка разнообразия по аллелям генов, вовлеченных в контроль биосинтеза этилена у яблони, с помощью молекулярных маркеров / И.Н. Шамшин // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета – 2011. – №2 Ч. 1 – С. 76-81.

5. Шамшин И.Н., Савельев Н.И., Кудрявцев А.М. Аллельное разнообразие гена *MD-EXP 7* у сортов яблони и груши маркеров / И.Н. Шамшин, Н.И. Савельев, А.М. Кудрявцев // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета – 2012. – №4 Ч. 1 – С. 23-26.

6. Шамшин И.Н. Создание генетических паспортов сортов яблони на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов генома / И.Н. Шамшин // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета – 2013. – №6. – С. 27-31.

Публикации в других изданиях

1. Шамшин И.Н., Кудрявцев А.М., Савельев Н.И. Анализ генетического полиморфизма генома яблони с использованием микросателлитных последовательностей ДНК / И.Н. Шамшин, А.М. Кудрявцев, Н.И. Савельев // Научные труды ГНУ СКЗНИИСиВ. Методологическое обеспечение селекции садовых культур и винограда на современном этапе (Материалы научно-практического форума «Роль экологизации и биологизации в повышении эффективности производства плодовых культур, винограда и продуктов их переработки»). – Краснодар: ГНУ СКЗНИИСиВ, 2013. – Том 1. – с. 39-42.

2. Шамшин И.Н., Савельев Н.И., Кудрявцев А.М. Применение ДНК-технологий для анализа генетической коллекции яблони / И.Н. Шамшин, Н.И. Савельев, А.М. Кудрявцев // Современные сорта и технологии для интенсивных садов: материалы междунар. научн. – практ. конф., посв. 275-летию А.Т. Болотова (15-18 июля 2013 г., Орел). – Орел: ВНИИСПК, 2013. – с. 272-275.

Методические рекомендации

Шамшин И.Н., Кудрявцев А.М., Савельев Н.И. Создание генетических паспортов сортов яблони на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов генома: методика / И.Н. Шамшин, А.М. Кудрявцев, Н.И. Савельев. – Мичуринск, 2013. – 44 с.