

УДК 634.11:631.524.86

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПАСПОРТИЗАЦИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ КОЛЛЕКЦИИ ЯБЛОНИ В БЕЛАРУСИ

**Зоя Аркадьевна Козловская, Ирина Станиславовна Леонович,
Татьяна Александровна Гашенко, Юлия Георгиевна Кондратенко**

Республиканское научно-производственное дочернее унитарное предприятие «Институт плодородства», аг. Самохваловичи, Минский район, Беларусь
belhort@it.org.by

Разработаны паспорта 105 образцов яблони различного генетического и географического происхождения из национальной коллекции генетических ресурсов плодовых, ягодных, орехоплодных культур и винограда РУП «Институт плодородства». Положено начало созданию базы молекулярно-генетических (ДНК) паспортов плодовых культур в Беларуси.

Ключевые слова: *яблоня; национальная коллекция; SSR-маркеры; генетические паспорта; Беларусь.*

Введение

Меняющиеся условия окружающей среды и возникновение ряда биотических и абиотических стрессовых факторов, обусловленные хозяйственной деятельностью человека, оказывают существенное влияние на генотип и метаболизм сортов, что приводит к их "старению" и перерождению, а также непосредственной гибели многолетних плодовых и ягодных культур. В этой связи имеется необходимость сохранения существующего генофонда, являющегося важнейшим источником адаптивно значимых и хозяйственно ценных признаков для селекции, служит банком генетического разнообразия и страховым фондом. Республика Беларусь на основе Договора о сотрудничестве в области сбора, сохранения и использования генетических ресурсов культурных растений осуществляет долгосрочное научное партнерство с ведущими селекционными центрами и международными генетическими банками по обмену генофондом и информацией с 84 зарубежными учреждениями.

Поскольку в настоящее время прикладные достижения молекулярно-биологических и гено-инженерных исследований во многом определяют технологический прогресс современного общества, где исходным материалом для таких работ служит ДНК, то во многих странах мира и в Республике Беларусь созданы специализированные банки ДНК, представляющие собой новое направление, развивающееся как самостоятельная область исследования со многими специфическими компонентами. В последние годы в развитии банков ДНК появилась тенденция к их интеграции, объединению специализированных банков ДНК в консорциумы и сети, что позволяет проводить исследования с участием научно-исследовательских центров разных стран.

Генетическая паспортизация представляет собой метод получения генетически детерминированных характеристик с помощью морфологических или молекулярных маркеров. Описание морфологических характеристик селекционного материала – элемент классического генетического анализа и селекционного скрининга, его можно считать первым этапом генетической паспортизации. Второй этап связан с разработкой и использованием биохимических и молекулярно-генетических маркеров, так как прямое секвенирование геномов невозможно из-за дороговизны.

Базовая коллекция яблони РУП «Институт плодородства» на конец 2016 г. насчитывала 1441 паспортизированный по морфологическим признакам образец, с

присвоенными национальными номерами. За последние 6 лет коллекция пополнилась 240 новыми образцами, расширяясь за счет интенсивного обмена новыми образцами между институтом и селекционными учреждениями стран СНГ.

На сегодняшний день микросателлитные ДНК-маркеры являются наиболее распространенным типом ДНК-маркерных систем, используемых при работе с генетическими ресурсами растений – определении структуры коллекций и степени генетического сходства, а также идентификация и ДНК-паспортизации образцов [1-6].

Целью исследований являлось создание базы молекулярно-генетических паспортов коллекционных образцов отечественных и зарубежных сортов яблони для контроля процесса включения нового образца в коллекцию во избежание предотвращения дублирования, выяснения с использованием молекулярных маркеров внутривидовых связей, анализа родства видов и генотипов.

Объекты и методы исследования

Биологическим объектом исследования являлись 105 образцов яблони из национальной коллекции генетических ресурсов плодовых, ягодных, орехоплодных культур и винограда РУП «Институт пловодства»: 39 сортов белорусской селекции – Алеся, Антей, Банановое, Белорусский синап, Белорусское летнее, Белорусское малиновое, Белорусское сладкое, Вербное, Весялина, Дарунак, Дыямент, Елена, Заславское, Имант, Коваленковское, Коробовка крупноплодная, Красавица, Лошицкое, Лучезарное, Минское, Нававица, Надзейны, Новинка осени, Новое сладкое, Память Вавилова, Память Коваленко, Память Пашкевича, Память Сикоры, Память Сюзаровой, Пепин литовский улучшенный, Поспех, Ребристое, Сакавица, Сеянец Лавфама, Серуэл, Стойкое, Сябрына, Чаравница, Щедрое; 9 сортов народной селекции – Антоновка обыкновенная, Бабушкино, Белый налив, Боровинка, Папировка, Пепинка литовская, Черное дерево, Чулановка, Штрейфлинг; 38 сортов зарубежной селекции – Заря Алатау, Имрус, Коштеля, Медуница, Мелба, Мечта, Народное, Память Исаева, Пепинка золотистая, Синап орловский, Слава победителям, Старт, Теллисааре, Утро, Auksis, Discovery, Dolgo, Fiesta, Florina, Freedom, Golden Delicious, Haralson, Idared, James Grieve, Jay Darling, Jenewa, Jonagold de Costa, Kent, Lawfam, Liberty, McIntosh, Melba, Pinova, Redfree, Red silver, Sawa, Welsy, Witos; 19 отборных видовых форм, в том числе 7 белорусской селекции – Креб ГК-1 (форма *M. siversii* f. *Niedzwetzkyana*), 98-13/75 (*M. × domestica*), 99-31-83 [Белорусское малиновое × (Prima × 85-12/88)], *M. sieboldii* × Spartan, *M. sieboldii* 9/26, *M. sieboldii* 25/177, *M. silvestris* и 12 интродуцированных – BM41497, X1924 ($F_n M. × floribunda$ 821), SR0523 ($F_n M. × atrosanguinea$), R12740-7A (*M. orientalis*), *M. baccata*, *M. cerasifera*, *M. coronaria*, *M. floribunda* k2362, *M. ioensis* 2352, *M. sieboldii*, *M. prunifolia*, *M. robusta*.

Молекулярно-генетические паспорта коллекционных образцов яблони составляли в соответствии с «Методическими рекомендациями по идентификации и паспортизации сортов яблони и груши на основе ДНК-маркеров» [7] с выполнением предварительной оптимизации ряда параметров, таких как температура отжига праймеров, длительность циклов отжига праймеров и элогнации, общее количество циклов, концентрация праймеров.

Препараты ДНК выделяли из листового материала отдельного растения с помощью набора Genomic DNA Purification Kit фирмы Thermo Fisher Scientific. Выделение проводили согласно рекомендованному протоколу. Пробы растворяли в 100 мкл бидистиллированной воды и хранили при температуре -20°C. Для проверки концентрации ДНК в выделенных пробах использовали спектрофотометр Implen P330. Для проведения ПЦР образцы разводили до концентрации 20 мкг/мкл.

В связи с высокой степенью полиморфизма SSR-маркеров был использован относительно небольшой набор микросателлитных маркеров – 6, являющийся достаточным для оценки уровня полиморфизма в исследуемой выборке генотипов [8] используя их в мультиплексных наборах.

Реакционная смесь для амплификации содержала: 6,25 мкл Quick-Load TAQ 2X Master Mix», 10 мкМ каждого праймера, ДНК-матрицу (20 мкг/мкл) – 0,5 мкл, смесь доводили до объема 12,5 мкл milliQ водой.

Режим амплификации (амплификатор C1000 Touch Thermal Cycler BioRad) с праймерами был следующий: 3 минуты при 94°C – начальная денатурация, далее 35 циклов: 15 секунд денатурация при 94°C, 30 секунд отжиг праймеров при 50-60°C (температуру отжига праймеров подбирали индивидуально через градиент), 30 секунд синтез при 72°C; последний цикл синтеза 5 минут при 72°C. Для подтверждения наличия продуктов амплификации предварительно визуализировали в агарозном геле.

В качестве внешнего стандарта при отработке экспериментальных параметров ПЦР использовали ДНК сорта Discovery, а внутреннего стандарта – GenomeLab DNA Size Standard Kit - 600 (Beckman Coulter). Сорт Discovery выбран как стандарт, так как он был включен во многие генетические исследования [1, 2, 7, 8].

Результаты и обсуждение

Продукты амплификации отличаются по длине на несколько нуклеотидов, поэтому для их разделения выбран наиболее точный метод электрофореза в секвенирующем акриламидном геле с помощью системы генетического анализа.

Использованный метод SSR-маркеров, позволяет проводить анализ любых органов растений, на различных стадиях онтогенеза, основанный на определении длин фрагментов амплификации (длины аллеля) отдельного локуса для каждого сорта. Длина фрагментов соответствует длине аллелей исследуемых образцов.

С помощью сформированного набора SSR маркеров были получены уникальные молекулярно-генетические формулы сортов яблони (таблица).

В результате выполнения фрагментного анализа продуктов амплификации на автоматическом генетическом анализаторе были получены четкие, воспроизводимые результаты. Каждый сорт содержит уникальный набор аллелей, позволяющий отличить его от других сортов. Следует отметить, что такой тип анализа полиморфизма микросателлитных локусов позволяет получить данные об их размере с точностью от одного до четырех нуклеотидов. Это дает возможность сопоставления результатов, полученных в разное время на разном оборудовании, при создании базы данных и практическом применении методов паспортизации. Полученная информация является наиболее точной для составления ДНК-паспортов, содержащих информацию о номере микросателлитного маркера и его аллельном состоянии у конкретного генотипа.

Таблица

Молекулярно-генетические паспорта некоторых сортов яблони национальной коллекции РУП «Институт плодородства»

Образец	Длина аллелей в SSR-локусах, п.н.					
	CH01c06	CH02c02b	CH02b12	CH04h02	CH03d12	SdSSR
Discovery	157, 169	75, 124	126, 139	175, 183, 194, 214	134, 145	181
Сябрына	159	110	140, 142	175, 190	122, 145	175
Дьямент	159	114	140	173	100, 122	175
Красавіта	159	115, 124	141	175, 192, 199	145	-
Нававіта	159, 184	110	128, 136	173, 181, 201, 265	121, 155	209
Сакавіта	159, 161	110	126, 136	175, 181, 201	119, 145	209

Старт	157	115	140, 142	175, 177, 195, 226	113, 134	209
Долго	156, 158	74, 112	128, 130	169, 177, 183, 213	121	161, 184
Штрейфлинг	158	110	129, 137	187, 193	119, 130	174, 182
Haralson	158	114	126, 140	175, 183, 190, 214	114, 144	183
Liberty	156, 183	114	127, 140	163, 181, 200	119, 121	179, 202

Выводы

В результате исследований разработаны паспорта 105 образцов яблони различного генетического и географического происхождения из национальной коллекции генетических ресурсов плодовых, ягодных, орехоплодных культур и винограда РУП «Институт плодоводства» – 39 сортов белорусской селекции, 9 сортов народной, 38 сортов зарубежной селекции и 19 отборных форм, в том числе белорусской селекции – 7. Положено начало созданию базы ДНК-паспортов, позволяющей проводить поиск новых и исключать дублирующие образцы коллекции.

Список литературы

1. Creating a saturated reference map for the apple (*Malus domestica* Borkh.) genome / R. Liebhard, B. Koller, L. Gianfranceschi, C. Gessler // Theor. Appl. Genet. – 2003. – Vol. 106. – P. 1497-1508.
2. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus domestica* Borkh.) / R. Liebhard, L. Gianfranceschi, B. Koller, C.D. Ryder, R. Tarchini, E.V. De Weg, C. Gessler // Molecular Breeding. – 2002. – Vol. 10. – P. 217-241.
3. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus domestica* Borkh. core subset collection / S.C. Hokanson, A.K. Szewc-McFadden, W.F. Lamboy, J.R. McFerson // Theor. Appl. Genet. – 1998. – Vol. 97. – P. 671-683.
4. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus×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. – Vol. 2. – P. 202-224.
5. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple / L. Gianfranceschi, N. Seglias, R. Tarchini, M. Komjanc, C. Gessler // Theor Appl Genet. – 1998. – Vol. 96. – P. 1069-1076.
6. Thomas M.R., Scott N.S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphism when analysed as sequence-tagged sites (STSs) // Theor. Appl. Genet. – 1993. – Vol. 86. – P. 985-990.
7. Урбанович О.Ю., Козловская З.А., Картель Н.А. Методическими рекомендациями по идентификации и паспортизации сортов яблони и груши на основе ДНК-маркеров; МСХП Республики Беларусь, НАН Беларуси, ГНУ "Институт генетики и цитологии НАН Беларуси", РУП "Институт плодоводства". – Минск : Право и экономика, 2011. – 31 с.
8. Урбанович О.Ю., Козловская З.А., Картель Н.А. Паспортизация сортов яблони на основе SSR-маркеров // Доклады НАН Беларуси. – 2008. – Т. 52. – № 5. – С. 72-78.

Kazlouskaya Z.A., Leanovich I.S., Hashenka T.A., Kandratsenak Yu.G. Molecular-genetic passportization of national apple collection in Belarus // Woks of the State Nikit. Botan. Gard. – 2017. – Vol.144. – Part I. – P. 134-138.

There were developed 105 DNA-passports of apple accessions of different genetic and geographical origin of the national collection of genetic resources of fruit, berry, nut crops and grapes of the RUE "Institute

for Fruit Growing". There is established the basis for creating a database of molecular-genetic passports of fruit crops in Belarus.

Key words: *apple; national collection; SSR markers; genetic passports; Belarus.*

УДК 634.25.551.58(477.75)

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ ПЕРСИКА В СТЕПНОМ КРЫМУ

Татьяна Анатольевна Лацко

ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН»
с. Новый сад, Симферопольский р-н, Республика Крым, Россия
cr_way@mail.ru

В статье проведен анализ влияния некоторых экологических факторов на урожайность двух сортов персика за многолетний период в степном Крыму. Исследования выполнены полевыми и лабораторными методами. Наибольшая корреляция выявлена между годовой суммой осадков и урожайностью сортов Посол Мира и Освежающий, 0,5 и 0,23 соответственно. Обнаружена значительная отрицательная корреляция (–0,44) между урожайностью и среднесуточной температурой воздуха в период закладки генеративных зачатков в предшествующий год. По всем корреляционным показателям сорт Посол Мира проявлял большую зависимость от анализируемых экологических факторов, чем Освежающий, что говорит также о его более высокой требовательности к агротехнике выращивания.

Ключевые слова: *корреляция; персик; сорт; урожайность; фенологические фазы.*

Введение

Подбор сортов для закладки персиковых садов в значительной степени зависит как от коммерческой привлекательности самого сорта, так и от знания агроклиматической характеристики потенциальных зон выращивания многолетних насаждений. В связи с нестабильностью некоторых экологических факторов, а также с глобальными климатическими переменами, отмечаемыми учеными, важны исследования, позволяющие спрогнозировать экономический эффект выращивания тех или иных сортов плодовых и орехоплодных культур в заданных условиях. Важно также знать, как поведет себя один фактор, при изменении другого, т.е. необходимо создать модели сортов. На первых этапах моделирования сортов необходимо изучение связей между некоторыми хозяйственно-ценными параметрами сортов и экологическими факторами. Целью наших исследований было выявить взаимосвязи между некоторыми экологическими факторами (температура воздуха и осадки) и урожайностью сортов персика в степной зоне Крыма. В рамках создания онтогенетических моделей районированных сортов плодовых культур для прогнозирования их продуктивности такие исследования важны и актуальны.

Объекты и методы исследований

Работа выполнялась в течение 1991 – 2016 гг. в лаборатории степного садоводства НБС-ННЦ. Климат здесь жаркий, засушливый, с короткой и довольно мягкой зимой. Весна характеризуется нестабильностью температур, весенними возвратными заморозками. Почвы плодородные, представленные малогумусным южным черноземом [1]. Агротехнические мероприятия осуществлялись согласно технологии, принятой в данной зоне. В целом, агро-экологические условия этой части Крыма благоприятны для выращивания косточковых культур, в частности персика. Объектом исследования были