

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ СОВРЕМЕННЫХ СОРТОВ ЯБЛОНИ (*Malus × domestica* Borkh.) ОТЕЧЕСТВЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ*

И.И. СУПРУН¹, Я.В. УШАКОВА¹, С.В. ТОКМАКОВ¹,
Ч.Э. ДЮРЕЛЬ², К. ДЕНАНС², Е.В. УЛЬЯНОВСКАЯ¹

Микросателлитные ДНК-маркеры, основанные на анализе простых повторяющихся повторов (SSR — simple sequence repeats), признаются одной из наиболее эффективных ДНК-маркерных систем, используемых в селекции и генетике культурных растений. С помощью SSR-маркеров были построены первые наиболее насыщенные генетические карты яблони. Кроме того, выполнен широкий перечень исследований, направленных на изучение генетического разнообразия в коллекциях сортов, диких форм, межвидовых гибридов яблони. С целью изучения генетической структуры рабочей коллекции современных сортов яблони отечественной селекции был оценен полиморфизм 12 микросателлитных локусов в выборке из 31 сорта яблони селекции Северо-Кавказского зонального НИИ садоводства и виноградарства (СКЗНИИСиВ, г. Краснодар) и Всероссийского НИИ селекции плодовых культур (ВНИИСПК, г. Орел) из коллекции генетических ресурсов СКЗНИИСиВ. Использовали SSR-маркеры, рекомендованные Европейским консорциумом Fruitbreedomics для изучения генетического разнообразия яблони: SN01f03b, SN01h01, SN01h10, SN02c06, SN02d08, SN04e05, SN05f06, SN01f02, SN02c11, Ni02c07, SN02c09 и SN03d07. По данным SSR-анализа был выявлен уровень полиморфизма от 5 до 10 аллелей на локус (наибольший — по SN02c11, наименьший — по SN01f03b) при среднем значении 7,75 аллеля на локус. Суммарно по 12 проанализированным локусам идентифицировали 93 аллеля. Все изученные сорта обладали уникальным набором аллелей. Сравнение с данными о генетическом разнообразии мирового генофонда яблони позволяет утверждать, что изученная выборка современных сортов яблони отечественной селекции характеризуется высоким уровнем полиморфизма SSR-локусов. Величины ожидаемой (H_e) и наблюдаемой (H_o) гетерозиготности варьировали в пределах 0,548-0,897 для H_o и 0,602-0,827 для H_e при среднем показателе $H_o = 0,786$ и $H_e = 0,755$. Значение PIC (polymorphism information content) составило от 0,571 до 0,806. При этом по 9 локусам из 12 изученных названный показатель изменялся в пределах 0,712-0,806. Результаты UPGMA-анализа согласуются с данными по генетической разнородности сортов из изученной выборки. Построение дендрограммы позволило выделить пять основных кластеров. Распределение сортов по кластерам в большинстве случаев прямо соотносится с их генеалогией. Так, сорт Свежесть, вошедший в отдельный кластер 1, и сорта Имрус и Зимнее утро, сформировавшие кластер № 5, происходят от сортов, не представленных в родительских формах ни у одного из остальных сортов в изученной выборке. Сорта Солнышко, Строевское, Юбилей Москвы, Афродита и Старт селекции ВНИИСПК, выделенные в кластер 3, имеют одну общую родительскую форму. Сложная структура дендрита, полученная при выполнении кластеризации по результатам SSR-анализа, может быть следствием большого числа уникальных аллелей у изучаемых генотипов, что, в свою очередь, обусловлено высоким уровнем генетического разнообразия внутри выборки. В то же время факт объединения сортов с одинаковой генеалогией в одни кластеры подтверждает значительное генетическое сходство внутри групп таких сортов. Результаты исследования дают возможность оценить уровень генетического полиморфизма в изученной выборке, кроме того, данные SSR-генотипирования могут быть использованы в дальнейшем для подтверждения генеалогии сортов и гибридов при возникновении спорных вопросов, а также при сортовой идентификации.

Ключевые слова: яблоня, SSR-маркеры, генотипирование, полиморфизм, генетическое разнообразие.

Применение технологий ДНК-маркерного анализа в работе с генетическими ресурсами культурных растений позволяет значительно расширить область исследований — от оценки генетического разнообразия и вопросов паспортизации сортов до защиты авторских прав селекционеров и определения генетической чистоты селекционного материала.

ДНК-маркеры должны обладать определенными свойствами и от-

* Работа выполнялась при поддержке РФФИ (проект № 13-04-02089_a). The work was partly funded by the EU seventh Framework Programme through the FruitBreedomics Project («Integrated approach for increasing breeding efficiency in fruit tree crops»; Number 255582).

вечать ряду требований, к которым, в частности, относится высокий уровень полиморфизма, кодоминантный характер наследования, оптимальная частота встречаемости в геноме, равномерное распределение по хромосомам, легкая оценка параметров маркера, высокая воспроизводимость, возможность автоматизации оценки и легкого обмена данными между лабораториями (1). Микросателлитные ДНК-маркеры, основанные на анализе простых повторяющихся повторов (SSR — simple sequence repeat), в полной мере соответствуют этим требованиям и на сегодняшний день признаются одной из наиболее эффективных ДНК-маркерных систем, используемых в селекции и генетике культурных растений, в том числе яблони (2-4).

С помощью SSR-маркеров были построены первые наиболее полные генетические карты яблони. Так, С. Maliepaard с соавт. (5), используя мультиаллельные маркеры, в том числе SSR, на основе гибридной популяции, созданной при скрещивании сортов Прима и Фиеста, разработали одну из первых карт генома яблони с 17 группами сцепления. Идентификация новых SSR-локусов в геноме яблони позволила в дальнейшем создать более насыщенные генетические карты (6-9). Информация об идентифицированных SSR-локусах и их геномной локализации служит ценной научной базой при выполнении генетических исследований яблони — картировании генов хозяйственно ценных признаков, анализе генетической структуры коллекций генетических ресурсов, паспортизации генофонда, изучении генетического разнообразия в пределах вида *Malus × domestica* Borkh.

В настоящее время выполнен широкий спектр исследований, направленных на оценку генетического полиморфизма в коллекциях генетических ресурсов (как современных сортов, так и аборигенного генофонда). Проводились работы по выяснению вопросов, касающихся генеалогии местных сортов, формирования автохтонной генплазмы яблони, а также ее генетической взаимосвязи с мировым генофондом (10-15), ДНК-паспортизации подвоев (16, 17). При этом в ряде случаев была выявлена уникальность аборигенного генофонда. Результаты, полученные А. Gharghani с соавт. (13), показали, что аборигенные иранские сорта занимают промежуточное положение между сортами яблони европейской селекции и видом *Malus orientalis* Uglitz. А. Patocchi с соавт. (18) провели масштабное исследование, в котором с использованием 88 микросателлитных ДНК-маркеров был оценен полиморфизм в общей сложности порядка 2 000 тысяч образцов из европейских коллекций генетических ресурсов (сорта, гибридные популяции). На основании этих данных были рекомендованы SSR-маркеры, наиболее перспективные для анализа геномного полиморфизма яблони (18).

При изучении генетического разнообразия крупных генетических коллекций яблони, включающих, помимо сортов, дикие формы и межвидовые гибриды, SSR-маркеры также позволяют объективно оценивать филогенетические взаимосвязи на внутри- и межвидовом уровне (19, 20).

Анализ полиморфизма SSR-локусов при изучении генетического разнообразия позволяет составлять ДНК-паспорта генотипов. SSR-фингерпринты могут эффективно использоваться для идентификации образцов коллекций, выявления дублей и др.

Учитывая высокую актуальность изучения разнообразия в генофонде яблони и перспективность использования микросателлитных маркеров при решении подобных задач, мы выполнили SSR-генотипирование сортов современной селекции из коллекции генетических ресурсов Севе-

ро-Кавказского зонального НИИ садоводства и виноградарства (СКЗНИИСиВ) и оценили генетический полиморфизм в современном отечественном генофонде яблони.

Методика. Материалом для исследований послужила выборка сортов яблони современной селекции (оригинаторы: СКЗНИИСиВ и Всероссийский НИИ селекции плодовых культур — ВНИИСПК, г. Орел), сохраняемых в коллекции генетических ресурсов СКЗНИИСиВ ($n = 31$).

В работе использовали 12 SSR-маркеров: SN01f03b, SN01h01, SN01h10, SN02c06, SN02d08, SN04e05, SN05f06, SN01f02, SN02c11, Ni02c07, SN02c09 и SN03d07. Перечисленные SSR-маркеры рекомендованы Европейским консорциумом Fruitbreedomics для изучения генетического разнообразия яблони (последовательность праймеров доступна в базе данных <http://www.hidras.unimi.it>).

Для экстракции ДНК использовали СТАВ-метод (21). ПЦР проводили по стандартным методикам с предварительной оптимизацией параметров. ПЦР-смесь (конечный объем 25 мкл) включала 50-70 мкг ДНК, 0,05 мМ dNTPs, по 0,3 мкМ каждого праймера, 2,5 мкл 10× реакционного буфера, 2,5 мМ MgCl₂, 1 ед. Taq-полимеразы. Режим амплификации: начальная денатурации — 5 мин при 95 °С; денатурация — 10 с при 95 °С, отжиг праймеров — 30 с при 58 °С, элонгация — 30 с при 72 °С (30 циклов); заключительная элонгация — 3 мин при 72 °С. Реакцию проводили в амплификаторе Eppendorf Mastercycler gradient (Германия), фрагментный анализ SSR-локусов — на автоматическом генетическом анализаторе ABI prism 3130 (США). Результаты фрагментного анализа обрабатывали в программе GeneMapper v. 4.1.

При оценке данных микросателлитного анализа матрицу генетических дистанций строили с использованием коэффициентов (индексов) подобия по М. Nei и W. Li (22). Кластерный анализ выполняли методом попарного невзвешенного кластирования с арифметическим усреднением (UPGMA) с использованием FreeTree Application v. 0.9.1.50 (ZDAT v.o.s.). Для графического построения дендрограммы применили программу TreeView (Win32) v. 1.6.6. Фактическую (H_o) и ожидаемую (H_e) гетерозиготность рассчитывали с помощью программы GenAlEx v. 6.3. Значение PIC (polymorphism information content) определяли с помощью программы PIC-calculator в режиме online (<http://w3.georgikon.hu/pic/english/kodom.aspx>).

Результаты. При апробации отобранных микросателлитных маркеров использовали электрофорез в 8 % неденатурирующем полиакриламидном геле. После оптимизации параметров ПЦР микросателлитные ДНК-маркеры были сгруппированы в мультиплексные наборы (4 маркера в наборе) для одновременного анализа по нескольким локусам. При этом размеры амплифицируемых фрагментов не перекрывались, а каждый из маркеров содержал специфическую флуоресцентную метку (FAM, TAMRA, R6G, ROX).

При выполнении фрагментного анализа были получены четкие воспроизводимые результаты. В качестве примера на рисунке 1 (визуализация результатов в рабочем окне программы GeneMapper v. 4.1) приведены данные для сорта Красный янтарь. На электрофореграмме два пика присутствовали у маркеров, по которым выявлялись два продукта, то есть соответствующие локусы гетерозиготны. В обсуждаемом случае это маркеры SN01h01, SN01f03b и SN02c06. Один пик по локусу SN01h10 на электрофореграмме свидетельствовал об его гомозиготности.

Из использованных в работе 12 маркеров наибольший полиморфизм выявили по локусу SN02c11 (10 аллелей), наименьший — по локусу

су SN01f03b (5 аллелей). Суммарно по 12 изученным локусам обнаружили 93 аллеля. Все изученные сорта обладали уникальным набором аллелей (полученные SSR-фингерпринты представлены в базе данных, проходящей в настоящее время регистрацию в качестве объекта интеллектуальной собственности).

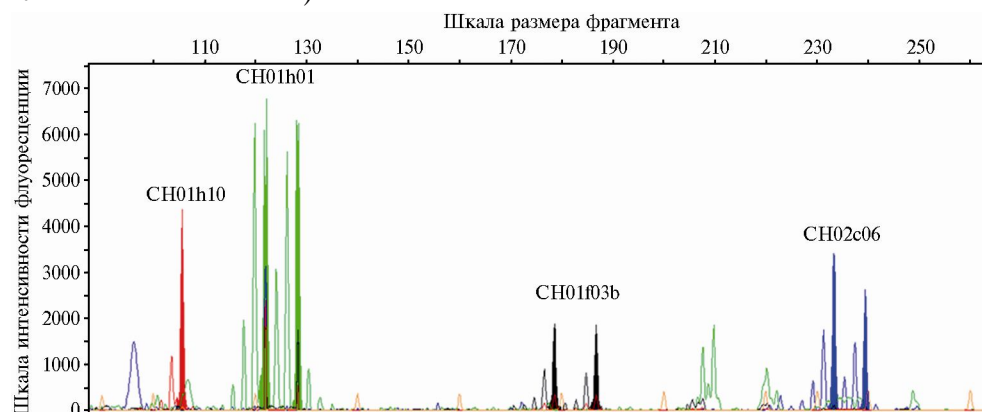


Рис. 1. Фрагментный электрофоретический анализ ДНК у сорта яблони Красный январь по мультиплексному набору, включающему SSR-маркеры SN01h10, SN01h01, SN01f03b и SN02c06 (коллекция Северо-Кавказского зонального НИИ садоводства и виноградарства, г. Краснодар)

Характеристика полиморфизма микросателлитных SSR-маркеров, использованных при оценке генетического разнообразия современных сортов яблони (*Malus × domestica* Borkh.) отечественной селекции из коллекции ($n = 31$, коллекция Северо-Кавказского зонального НИИ садоводства и виноградарства, г. Краснодар)

Маркер	Диапазон размеров амплифицированных фрагментов, п.н.	Число выявленных аллелей	PIС	H_o	H_e
SN01f03b	141-182	5	0,690	0,710	0,736
SN01h01	118-137	6	0,712	0,742	0,754
SN01h10	94-120	7	0,572	0,548	0,602
SN02c06	204-256	9	0,806	0,897	0,827
SN02d08	215-258	9	0,745	0,800	0,776
SN04e05	178-230	9	0,772	0,867	0,798
SN05f06	171-189	7	0,678	0,871	0,723
SN01f02	173-210	8	0,726	0,839	0,763
SN02c11	219-241	10	0,727	0,806	0,752
Ni02c07	104-166	9	0,752	0,897	0,781
SN02c09	235-259	7	0,737	0,774	0,772
SN03d07	188-228	7	0,747	0,679	0,776

Примечание. PIС — polymorphism information content (информативность маркера), H_o — наблюдаемая гетерозиготность, H_e — ожидаемая гетерозиготность.

Сравнение общего числа выявленных аллелей, полученного по результатам нашего исследования, с результатами анализа генетического разнообразия мирового генофонда яблони позволяет утверждать, что полиморфизм SSR-локусов в изученной выборке сортов яблони отечественной селекции весьма высок. В работе S. Pereira-Lorenzo с соавт. (14) при анализе 66 испанских сортов яблони по 10 SSR-локусам выявили суммарно 122 аллеля. При этом для группы из 27 аборигенных сортов этот показатель равнялся 75 (14). В финском и шведском генофонде яблони (суммарно 101 генотип) по 9 локусам обнаружили 105 аллелей. При этом показатели ожидаемой (H_e) и наблюдаемой (H_o) гетерозиготности варьировали в диапазоне соответственно 0,31-0,88 и 0,41-0,88 (23), в то время как в нашем исследовании они изменялись в пределах 0,548-0,897 для H_o и 0,602-0,827 для H_e (табл.). Средняя величина показателя H_o в нашем исследовании составила 0,786, H_e — 0,755, что превысило показатели, полученные при анализе скандинавской генплазмы яблони ($H_e = 0,72$; $H_o = 0,74$), где

среднее число аллелей на локус составляло 11,6 (23). По результатам нашего исследования этот показатель в выборке из 31 сорта отечественной селекции равнялся 7,75. А. Pina с соавт. (24), изучая генетическое разнообразие аборигенного генофонда яблони на северо-востоке Испании (область Арагон), при анализе 20 SSR-локусов в выборке из 130 генотипов выявили средний показатель 12,4 аллеля. В своем исследовании авторы сопоставили результаты с данными по полиморфизму SSR-локусов у 21 сорта мировой селекции из разных регионов мира и определили у последних среднее число аллелей на локус, равное 8,2 (24).

Полученные нами значения PIC, варьирующие в диапазоне от 0,572 до 0,806 (см. табл.), свидетельствуют о высоком уровне информативности большинства изученных SSR-маркеров. По SSR-локусу CH01h10, у которого было выявлено 7 аллелей, наименьшая среди использованных маркеров величина PIC (0,572) в значительной степени обусловлена преобладанием одного из аллелей (с размером 100 п.н.) над другими (его обнаружили у 60 % изученных генотипов), а также наличием двух редких аллелей (118 и 120 п.н.), каждый из которых был идентифицирован только у одного образца.

На основании данных SSR-генотипирования была выполнена оценка степени генетического сходства изученных сортов с применением метода попарного невзвешенного кластирования с арифметическим усреднением (UPGMA) (рис. 2).

По степени генетического сходства выделились пять основных кластеров: № 1 — сорт Свежесть; № 2 — сорта Нимфа, Талида, Персиковое, Маяк станичный, Ноктюрн, Любава, Василиса, Кубань, Кармен, Болотовское, Юнона, КВ Зарево, Золотая корона, Дин Арт, Апорт АСС, Зори Кубани, Талисман, Амулет, Красный янтарь, Фортуна, Рассвет; № 3 — Солнышко, Строевское, Юбилей Москвы, Афродита, Старт; № 4 — Кубанское румяное, Золотое летнее; № 5 — Имрус, Зимнее утро. При этом в кластер № 2 вошли четыре субкластера (2a-2d) и сорта Талида и Нимфа.

Результаты UPGMA-анализа в целом отражают генетическую разнородность сортов из изученной выборки. Это выражается, с одной стороны, в наличии кластеров, объединяющих несколько сортов на одном уровне или включающих всего два либо даже один генотип (сорт Свежесть), с другой — в формировании кластеров со сложной структурой (например, № 2).

Кластеризация сортов во многом согласуется с их происхождением. К примеру, сорт Свежесть [Антоновка краснобочка × PR12T67 (Уэлси × F₂ *M. floribunda*)], выделенный в кластер № 1, и сорта Имрус (Антоновка обыкновенная × OR18T13) и Зимнее утро (Либерти × Скарлет Стаймаред), образующие кластер № 5, имеют происхождение от сортов, не представленных в родительских формах ни у одного из остальных сортов изученной выборки.

Достоверность данных, полученных при построении дендрограммы, также подтверждается объединением в один кластер сортов Афродита, Старт, Солнышко, Юбилей Москвы и Строевское, которые имеют общую родительскую форму 814 — [F₂ (*M. floribunda* 821 × *M. domestica*)] × Голден Делишес (25, 26), что служит наиболее вероятной причиной их обособленности от большинства изученных генотипов по результатам кластеризации. Сорта Талисман, Амулет, Красный янтарь, Фортуна, Рассвет (субкластер 2d) происходят из гибридной комбинации Редфри × Папировка тетраплоидная.

Сложная структура дендрита, получаемая при выполнении класте-

ризации, по результатам SSR-анализа может быть следствием наличия большого числа уникальных и редких аллелей у изучаемых генотипов, что, в свою очередь, обусловлено высоким уровнем генетического разнообразия внутри выборки (27).

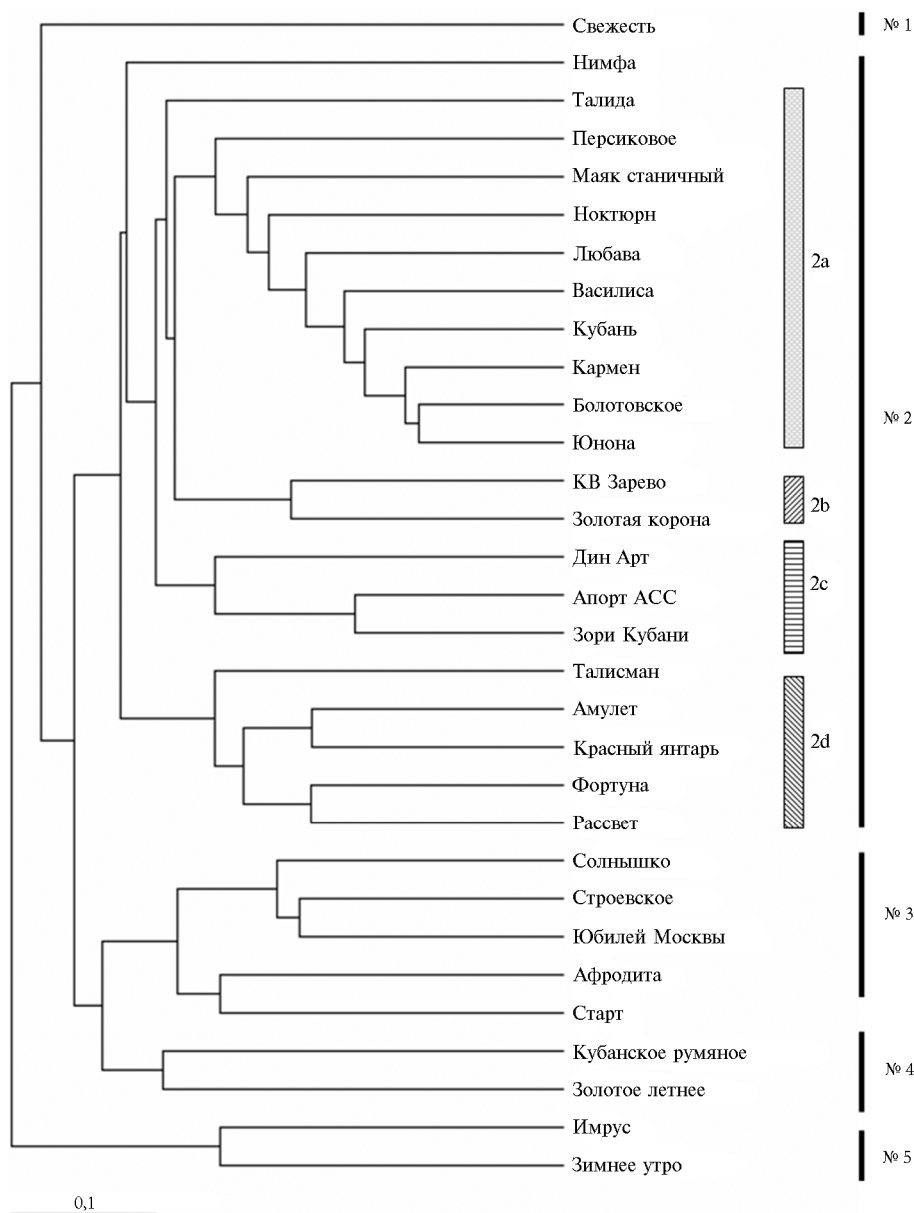


Рис. 2. Дендрограмма генетического сходства между изученными современными сортами яблони (*Malus × domestica* Borkh.) отечественной селекции, построенная по методу UPGMA: №№ 1-5 — кластеры, 2a, 2b, 2c, 2d — субкластеры (коллекция Северо-Кавказского зонального НИИ садоводства и виноградарства, г. Краснодар).

Таким образом, результаты проведенного исследования подтверждают эффективность SSR-маркеров для оценки генетического разнообразия генофонда яблони. На основании данных, полученных при анализе полиморфизма SSR-локусов у 31 сорта яблони современной отечественной селекции, можно говорить о высоком уровне полиморфизма в изу-

ченной выборке генотипов. В то же время факт объединения сортов с одинаковой генеалогией в одни кластеры подтверждает значительное генетическое сходство внутри групп таких сортов. В этой связи мы рекомендуем не использовать сорта, вошедшие в один кластер, в качестве родительских пар при гибридизации, если необходимо получить наибольшую генетическую изменчивость в гибридных популяциях. Данные выполненного SSR-генотипирования могут учитываться при подтверждении генеалогии сортов и гибридов, в случае если одна или обе их родительские формы входят в изученную выборку генотипов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хавкин Э.Е. Молекулярные маркеры в растениеводстве. Сельскохозяйственная биология, 1997, 5: 3-19.
2. Diwan N., Cregan P.B. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. *Theor. Appl. Genet.*, 1997, 95: 723-733 (doi: 10.1007/s001220050618).
3. Thomas M.R., Scott N.S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphism when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.*, 1993, 86: 985-990 (doi: 10.1007/BF00211051).
4. Morgante M., Oliveri A.M. PCR-amplified microsatellite markers in plant genetics. *Plant J.*, 1993, 3: 175-182 (doi: 10.1046/j.1365-313X.1993.t01-9-00999.x).
5. Maliepaard C., Alston H.F., Van Arkel G. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. *Theor. Appl. Genet.*, 1998, 97: 60-73 (doi: 10.1007/s001220050867).
6. Liebhard R., Gianfranceschi L., Koller B., Ryder C.D. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Molecular Breeding*, 2002, 10: 217-241 (doi: 10.1023/A:1020525906332).
7. Liebhard R., Koller B., Gianfranceschi L., Gessler C. Creating a saturated reference map for the apple (*Malus domestica* Borkh.) genome. *Theor. Appl. Genet.*, 2003, 106: 1497-1508 (doi: 10.1007/s00122-003-1209-0).
8. Silfverberg-Dilworth E. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus × domestica* Borkh.) genome. *Tree Genetics & Genomes*, 2006, 2: 202-224 (doi: 10.1007/s11295-006-0045-1).
9. Fernandez-Fernandez F., Eans K.M., Clarke J.B., Govan C.L. Development of an STS map of an interspecific progeny of *Malus*. *Tree Genetic & Genomic*, 2008, 4: 469-479 (doi: 10.1007/s11295-007-0124-y).
10. Muzher B.M., Younis R.A.A., El-Halabi O., Ismail O.M. Genetic identification of some Syrian local apple (*Malus* sp.) cultivars using molecular markers. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 2007, 3(6): 704-713.
11. Pereira-Lorenzo S., Ramos-Cabrer A.M., Diaz-Hernandez M.B. Evaluation of genetic identity and variation of local apple cultivars (*Malus domestica* Borkh.) from Spain using microsatellite markers. *Genet. Resour. Crop. Evol.*, 2007, 54: 405-420 (doi: 10.1007/s10722-006-0003-7).
12. Fua G., Simon S., Pojskic N., Kurtovic M., Peji I. Genetic assessment of apple germplasm in Bosnia and Herzegovina using microsatellite and morphologic markers. *Scientia Horticulturae*, 2010, 126: 164-171 (doi: 10.1016/j.scienta.2010.07.002).
13. Gharghani A., Zamani Z., Talaie A., Oraguzie N.C. Genetic identity and relationships of Iranian apples (*Malus × domestica* Borkh.) cultivars and landraces, wild apple species and representative old apple cultivars based on SSR markers. *Genet. Resour. Crop. Evol.*, 2009, 56: 829-842 (doi: 10.1007/s10722-008-9404-0).
14. Pereira-Lorenzo S., Ramos-Cabrer A.M., Gonzalez-Diaz A.J., Diaz-Hernandez M.B. Genetic assessment of local apple cultivars from La Palma, Spain, using simple sequence repeats (SSRs). *Scientia Horticulturae*, 2008, 117: 160-166 (doi: 10.1016/j.scienta.2008.03.033).
15. Савельев Н.И., Юшков А.Н., Шамшин И.Н. Применение метода молекулярных маркеров для изучения генетического разнообразия плодовых культур. *Вестник Мичуринского государственного аграрного университета*, 2011, 2(1): 8-12.
16. Супрун И.И., Алексеев Я.И., Малюченко О.П., Бабаков А.В. Генотипирование подвоев яблони отечественной селекции с использованием мультиплексного STR-анализа. *Садоводство и виноградарство*, 2012, 4: 20-23.
17. Oraguzie N.C., Yamamoto T., Soejima J., Suzuki T. DNA fingerprinting of apple (*Malus* spp.) rootstocks using Simple Sequence Repeats. *Plant Breed.*, 2005, 124: 197-202 (doi: 10.1111/j.1439-0523.2004.01064.x).

18. Patocchi A., Fernandez-Fernandez F., Evans K., Gobbin D. Development and test of 21-multiplex PCRs composed of SSRs spanning most of the apple genome. *Tree Genetics & Genomes*, 2009, 5: 211-223 (doi: 10.1007/s11295-008-0176-7).
19. Richards C.M., Volk G.M., Reilley A.A., Henk A.D. Genetic diversity and population structure in *Malus sieversii*, a wild progenitor species of domesticated apple. *Tree Genetics & Genomes*, 2009, 5: 339-347 (doi: 10.1007/s11295-008-0190-9).
20. Gross B.L., Henk A.D., Forsline P.L., Richards C.M., Volk G.M. Identification of interspecific hybrids among domesticated apple and wild relatives. *Tree Genetics & Genomes*, 2012, 8(6): 1223-1235 (doi: 10.1007/s11295-012-0509-4).
21. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.*, 1980, 10: 4321-4325 (doi: 10.1093/nar/8.19.4321).
22. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *PNAS USA*, 1979, 76: 5269-5273 (doi: 10.1073/pnas.76.10.5269).
23. Garkava-Gustavsson L., Mujajub C., Sehic J., Zborovskaya A., Gunter M.B. Genetic diversity in Swedish and Finnish heirloom apple cultivars revealed with SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 2013, 162: 43-48 (doi: 10.1016/j.scienta.2013.07.040).
24. Pina A., Urrestarazu J., Pilar E. Analysis of the genetic diversity of local apple cultivars from mountainous areas from Aragon (Northeastern Spain). *Scientia Horticulturae*, 2014, 174: 1-9 (doi: 10.1016/j.scienta.2014.04.037).
25. Седов Е.Н., Жданов В.В. Устойчивость яблони к парше. Орел, 1983.
26. Седов Е.Н., Седышева Г.А., Жданов В.В., Ульяновская Е.В., Серова З.М. Результаты селекции иммунных к парше триплоидных сортов яблони. *Вестник ВОГиС*, 2009, 13(4): 793-785.
27. Урбанович О.Ю., Козловская З.А., Хацкевич А.А., Картель Н.А. Анализ полиморфизма SSR-локусов видов *Malus*. *Известия Национальной академии наук Беларуси*, 2010, 1: 12-17.

¹ФГБНУ Северо-Кавказский зональный

НИИ садоводства и виноградарства,

350921 Россия, г. Краснодар, пос. Белозерный,

e-mail: kubansad@kubannet.ru, supruni@mail.ru;

²National Institute for Agricultural Research (INRA),

Centre Angers-Nantes,

42 rue Georges Morel, BP 60057, 49071 Beaucouzé cedex, France

Поступила в редакцию

27 января 2015 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2015, V. 50, № 1, pp. 37-45

GENETIC DIVERSITY STUDY OF MODERN RUSSIAN APPLE (*Malus × domestica* Borkh.) CULTIVARS BY THE SSR LOCI ANALYSIS

I.I. Suprun¹, Ya.V. Ushakova¹, S.V. Tokmakov¹, Ch.E. Durel², C. Denancé²,
E.V. Ul'yanovskaya¹

¹North Caucasian Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture, Federal Agency of Scientific Organizations, 39, ul. 40-letiya Pobedy, Krasnodar, 350901 Russia, e-mail kubansad@kubannet.ru, supruni@mail.ru;

²National Institute for Agricultural Research (INRA), Centre Angers-Nantes, 42 rue Georges Morel — BP 60057, 49071 Beaucouzé cedex — France

Supported by Russian Foundation for Basic Research (project № 13-04-02089_a). The work was partly funded by the EU seventh Framework Programme through the FruitBreedomics Project («Integrated approach for increasing breeding efficiency in fruit tree crops»; Number 255582).

Received January 27, 2015

doi: 10.15389/agrobiol.2015.1.37eng

Abstract

SSRs are one of the most suitable DNA-markers for assessment of genetic diversity of plant genetic resources. Microsatellites were used for development of saturated genetic maps of apple (*Malus × domestica* Borkh.) as well as for wide range of genetic diversity studies. Our study was aimed on the investigation of the genetic relationship within subcollection of modern Russian apple cultivars. Polymorphism of 12 microsatellite loci was estimated for 31 apple cultivars from the SKZNIISiV collection of genetic resources. These cultivars have been bred in North Caucasian Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture (SKZNIISiV) and All-Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding (VNIISPK). SSR-markers CH01f03b, CH01h01, CH01h10, CH02c06, CH02d08, CH04e05, CH05f06, CH01f02, CH02c11, Hi02c07, CH02c09 and CH03d07, which are recommended by FruitBreedomics, the European consortium, were used in the study. According to the data of SSR-analysis from 5 to 10 alleles per locus were detected, with an average value of 7.75 alleles per locus. A total of 93 alleles were detected for all 12 loci. All apple cultivars showed individual, distinct SSR-profiles. Comparison with the data on the genetic diversity of the world apple tree gene pool suggests that the SSR-loci polymorphism in studied set of the apple cultivars is relatively high. Expected (H_e) and observed (H_o) heterozygosity varied within the

ranges of 0.548–0.897 and 0.602–0.827 for H_o and H_e , respectively. The average values of these indexes are $H_o = 0.786$ and $H_e = 0.755$. PIC value ranged from 0.571 to 0.806, and 9 loci showed PIC value higher than 0.712. Results of UPGMA-analysis are consistent with the level of genetic heterogeneity of the studied cultivar set. Five clusters were determined. Distribution of cultivars into clusters in most cases is consistent with their genealogy. For example, Svezhest' cultivar, formed a distinct cluster 1, as well as cultivars Imrus and Zimnee utro which formed cluster 5 are originated from the cultivars, which are not presented as the parental forms of any studied cultivars. Cultivars of VNIISPK breeding such as Solnishko, Stroeviskoe, Yubilei Moskvyy, Afrodita and Start, which formed distinct cluster 3 have one common parental cultivar. The structure of dendrite obtained when performing clustering on the results of SSR-analysis may be due to large number of unique alleles studied in genotypes that in turn is due to the high genetic diversity within the studied set of cultivars. At the same time, the fact of incorporation of cultivars with the same genealogy in the same clusters confirms the high significant genetic similarity within groups of such varieties. Results of the study allows to assess the level of the genetic diversity within the set of modern apple cultivars as well as can be used for confirmation of genealogy of apple cultivars and hybrids in the case of disputes, as well as for identification of varieties.

Keywords: apple tree, SSR-markers, genotyping, polymorphism, genetic diversity.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ ПРЕДСТАВЛЯЕМЫХ РУКОПИСЕЙ

1. В журнале «Сельскохозяйственная биология» публикуются обзорные, проблемные, оригинальные экспериментальные и методические работы по генетике и селекции сельскохозяйственных растений и животных, защите их от вредителей и болезней, молекулярной биологии, физиологии, биохимии, биофизике, радиобиологии, иммунитету, представляющие интерес для сельского хозяйства. Не публикуются статьи серийные и статьи, излагающие отдельные этапы исследований, которые не позволяют прийти к определенным выводам.
2. Статьи представляются тщательно отредактированными, в 2 экземплярах, напечатанных на одной стороне листа через два интервала (шрифт 14 Times New Roman) на бумаге стандартного формата, с приложенным диском с файлом статьи в программе Word for Windows. Рукопись должна быть подписана авторами и иметь заверенное печатью направление (на публикацию в журнале и в сети Интернет) от учреждения, в котором выполнена работа, подтверждающее, что материалы публикуются впервые.
3. При оформлении статей, содержащих экспериментальные данные, необходимо придерживаться следующей схемы: обзор литературы, цель исследования, методика, результаты и выводы. Объем обзорных и проблемных статей, включая список литературы, не должен превышать 18–22 стр., экспериментальных — 10–12 стр., кратких сообщений — 5 стр. Статья должна содержать реферат, отражающий структуру и основные положения статьи (250–270 слов, с авторским переводом) и ключевые слова (на русском и английском языках).
4. Иллюстрации и подписанные подписи представляются в 2 экземплярах. Рисунки снабжаются всеми необходимыми цифровыми или буквенными обозначениями с их пояснениями в подписи к рисунку. Максимальное число таблиц — 3, рисунков — 3; в кратких сообщениях — или 1 таблица, или 1 рисунок.
5. Формулы следует вписывать разборчиво. Во избежание ошибок в формулах необходимо размечать прописные (заглавные) и строчные буквы, а также верхние и нижние индексы. Сокращаемые слова (названия препаратов, химических соединений, методов, учреждений, латинские названия видов и др.) при первом упоминании приводятся полностью (иностранные — также с русским переводом). Единицы физических величин приводятся по Международной системе СИ (ГОСТ 8.417–81), названия химических соединений, таксономические названия — в соответствии с международной номенклатурой (подробно см. на сайте журнала <http://www.agrobiology.ru>).
6. Список литературы должен содержать лишь те источники, на которые имеется ссылка в статье. Составляется список в порядке очередности упоминания этих источников в тексте. Для цитируемых книг и сборников приводятся: фамилия и инициалы всех авторов, название, место издания (город, для иностранных источников — город и страна) и год издания; для материалов научных собраний следует указать название, время и место проведения научного мероприятия, название конференции, симпозиума и т.д., при наличии редакторов сборника или книги — указать их фамилии и инициалы; при наличии тома, выпуска указываются их номера, приводятся номера цитируемых страниц «от-до»; для журнальных статей указываются фамилия и инициалы всех авторов, название статьи, полное название журнала, год издания, том, номер (выпуск), страницы «от-до».
7. Необходимо указать фамилию, имя и отчество всех авторов рукописи полностью, фамилии и инициалы в транслитерации, принятые авторами в зарубежных публикациях, место работы, адрес и телефоны (служебный, домашний, мобильный), а также адрес электронной почты (e-mail), официальное название учреждения на английском языке.
8. При несоблюдении этих требований статья к рассмотрению не принимается. При отправке на доработку датой поступления считается дата получения редакцией окончательного принятого к публикации варианта статьи.
9. Аспиранты публикации не оплачивают. Копии отрицательных рецензий направляются авторам, положительных — предоставляются по запросу.
10. Экземпляр журнала с опубликованной статьей авторам не высылается. Журнал распространяется только по подписке. Гонорар не выплачивается. Рукописи не возвращаются.

Подробнее информацию см. на сайте журнала <http://www.agrobiology.ru>