

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЛОГИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

УДК 634.11:631.524.86

УРБАНОВИЧ
Оксана Юрьевна

**ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ГЕНОФОНДА ПЛОДОВЫХ
КУЛЬТУР И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ И
ГЕНОТИПИРОВАНИЯ СОРТОВ И ВИДОВ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

по специальности 03.01.07 – молекулярная генетика

Минск, 2015

Научная работа выполнена в ГНУ «Институт генетики и цитологии
НАН Беларуси»

Научный консультант

Кильчевский Александр Владимирович

доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси, главный ученый секретарь НАН Беларуси

Официальные оппоненты:

Падутов Владимир Евгеньевич

доктор биологических наук, доцент, член-корреспондент НАН Беларуси, заведующий лабораторией генетики и биотехнологии ГНУ "Институт леса НАН Беларуси"

Шалыго Николай Владимирович

доктор биологических наук, доцент, член-корреспондент НАН Беларуси, заведующий лабораторией биофизики и биохимии растительной клетки ГНУ "Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси"

Кухарчик Наталья Валерьевна

доктор сельскохозяйственных наук, доцент, руководитель отдела биотехнологии РУП "Институт плодоводства".

Оппонирующая
организация:

ГНУ "Центральный ботанический сад НАН
Беларуси"

Защита состоится 29 мая 2015 г. в 10⁰⁰ часов на заседании совета по защите диссертаций Д 01.31.01 при ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» по адресу: 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27; тел.: (+37517) 284 19 45, факс (+37517) 284 19 17, e-mail: N.I.Dubovets@igc.bas-net.by

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

Автореферат разослан «_____» апреля 2015 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций,
доктор биологических наук



Н.И. Дубовец

ВВЕДЕНИЕ

Плодовые культуры имеют большое значение для человека. В Республике Беларусь они занимают свыше 80 тыс. га и выращиваются в более чем двухстах сельскохозяйственных организациях [Самусь, 2012]. На первом месте по распространению в стране находится яблоня. Большое значение имеют груша, слива домашняя, слива диплоидная, вишня обыкновенная, черешня. В последнее время расширил северную границу такой теплолюбивый вид как абрикос. В Беларуси успешно выращиваются многие сорта плодовых культур как собственной селекции, так и селекции других стран [Козловская, 2006, 2011; Самусь, 2012].

Необходимым элементом селекционного процесса, питомниководства и коммерческого распространения сортов является их идентификация. Идентификация сортов обеспечивает защиту авторских прав селекционных учреждений, позволяет следить за чистотой сортов и соответствием их известному стандарту. В настоящее время идентификация сортов плодовых культур проводится по морфологическим признакам. Им свойственны определенные недостатки. Морфологические признаки проявляются на поздних стадиях онтогенеза, они могут зависеть от условий окружающей среды, с их помощью сложно различить близкородственные генотипы и вести контроль за сортовой чистотой посадочного материала. Сложности идентификации по морфологическим признакам приводят к необходимости поиска новых, более удобных и надежных методов идентификации. Ими на полном основании могут стать методы ДНК-идентификации, преимущества которых выгодно отличают их от классических методов. Молекулярные методы позволяют обнаружить различия между генотипами на уровне ДНК, на котором такие различия представлены наиболее полно, они не требуют фенотипического проявления признака, могут применяться на любой стадии развития растения, принципиально сокращают время идентификации сортов, что особенно важно для многолетних культур. Однако единых универсальных методов ДНК идентификации плодовых культур на сегодня нет. Это связано, в частности, с недостатком знаний о генетическом разнообразии сортов, возделываемых в разных странах, уровне полиморфизма отдельных областей генома видов плодовых культур. Имеющиеся в литературе данные основаны на анализе небольших коллекций наиболее важных видов, в то время как другие виды остаются мало изученными. Сведения о генетическом разнообразии белорусских сортов семечковых и косточковых культур в литературе отсутствуют. Нет единого мнения относительно выбора типа молекулярных маркеров, которые могут быть применены для идентификации, их

количества и уровня информативности. В связи с этим, как исследование генетического разнообразия различных видов плодовых культур, так и разработка методов их ДНК идентификации являются важными и актуальными задачами.

Не менее актуальной задачей является совершенствование селекционного процесса. В настоящее время в целях облегчения процесса создания сортов яблони, отвечающих возрастающим современным требованиям, проводится большая работа по совершенствованию селекционных программ. Идет постоянный поиск новых методов оценки хозяйственно-биологических свойств сортов и гибридов, а также разработка новых, более эффективных методов отбора [Kole, 2007; Козловская, 2006, 2011]. Внедрению в селекционный процесс яблони новых методов способствует большой прогресс в области молекулярной генетики. Разработаны молекулярные маркеры, специфичные для генома видов *Malus*. Составлены достаточно подробные генетические карты яблони. Выявлен ряд генов, ответственных за хозяйственно-важные признаки, установлены места локализации их в геноме. Для отдельных признаков, контролируемых полигенно, на генетической карте обозначены сцепленные с ними локусы [Tartarini et al., 2000; Dunemann et al., 2007; Stoeckli et al., 2008; Patocchi et al., 2009; Dunemann et al., 2010, Galli et al., 2010; Bus et al., 2012]. Большой объем информации о строении и функционировании генома яблони был получен в результате секвенирования *Malus × domestica* [Velasco, 2010]. Имеющиеся в литературе данные создают основу для разработки подходов к маркер-сопутствующей селекции яблони. В мире уже начаты исследования в этом направлении. Актуальной является разработка этого направления для Беларуси, где подобные работы ранее не проводились. Молекулярные методы позволят оценить генетический потенциал сортов, выявить источники генов, влияющих на хозяйственно-ценные признаки, включить их в селекционный процесс и проводить отбор перспективных генотипов на его начальных стадиях, сокращая время и повышая эффективность. Эта технология будет особенно полезна в случаях, когда отбор по фенотипу оказывается длительным и недостаточно надежным. Она призвана дополнить традиционный селекционный процесс качественно новыми высокоэффективными методами.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами), темами. Диссертационная работа выполнена в рамках Государственной программы ориентированных фундаментальных исследований «Генетические, физиолого-биохимические и иммунологические основы адаптивной селекции растений, направленные на обеспечение высокой их продуктивности, устойчивости к стрессам и качество продукции» («Селекция, семеноводство и

генетика») задание 19 «Разработка методов идентификации плодовых культур с целью их паспортизации, оценки селекционной ценности и генетического разнообразия» (2006-2010 г.; № госрегистрации 2006473); Государственной программы «Инновационные биотехнологии» раздела «ДНК-технологии для сельского хозяйства и здравоохранения» подпрограммы «Сельскохозяйственная биотехнология (растениеводство)» задание 3/30 «Разработать высокоэффективные молекулярные методы идентификации генов устойчивости к болезням у яблони с целью сокращения сроков селекционного процесса» (2007-2011 г., № госрегистрации 20071816); Государственной программы научных исследований «Фундаментальные основы биотехнологий» подпрограмма 2 «Геномика», задание 2.02 «Изучение геномов растений с помощью технологии молекулярных маркеров и генетической трансформации» (2011-2013 г., № госрегистрации 20113482); Государственной программы научных исследований «Фундаментальные основы биотехнологий» подпрограмма «Геномика» задание 2.21-К «Создать систему маркер сопутствующей селекции сельскохозяйственных растений» (2012-2014 г., № госрегистрации 20122321).

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь, отраженным в пункте 3.6. идентификация и картирование генов; паспортизация, маркирование, идентификация, селекция и создание сельскохозяйственных растений, животных и микроорганизмов с помощью ДНК-технологий; ДНК-технологии и генно-инженерные методы в диагностике и лечении заболеваний человека и сельскохозяйственных животных; постановления Совета Министров Республики Беларусь "Об утверждении перечня приоритетных направлений фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2011-2015 годы" от 19 апреля 2010 г. № 585).

Цель и задачи исследования. Целью исследования являлась оценка генетического разнообразия генофонда плодовых культур (яблони, груши, вишни обыкновенной, черешни, сливы домашней, сливы диплоидной, абрикоса, диких видов и межвидовых гибридов) и разработка методов ДНК-идентификации, генотипирования и маркер-сопутствующей селекции для совершенствования селекционного процесса по созданию конкурентоспособных сортов.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Определить наиболее информативную, надежную и удобную систему молекулярных маркеров для идентификации генотипов плодовых культур.
2. Оценить генетическое разнообразие генофонда плодовых культур различного происхождения, выращиваемых в Беларуси.
3. Изучить полиморфизм SSR-локусов сортов белорусской селекции - яблони, груши, вишни обыкновенной, черешни, сливы домашней, сливы диплоидной, абрикоса, диких видов и межвидовых гибридов, старинных сортов и

сортов селекции других стран, выращиваемых на территории Беларуси, выявить наиболее полиморфные и информативные локусы.

4. Провести анализ частоты встречаемости SSR-аллелей отдельных локусов среди сортов плодовых культур, выращиваемых в Беларуси.

5. Разработать систему SSR-маркеров, позволяющую проводить ДНК-идентификацию видов и сортов яблони, груши, вишни обыкновенной, черешни, сливы домашней, сливы диплоидной, абрикоса, выращиваемых в Беларуси.

6. Провести анализ уровня генетического полиморфизма клоновых мутантов яблони (на примере сорта яблони Антоновка обыкновенная), оценить разрешающую способность различных маркерных систем для их идентификации.

7. Оценить степень распространения и эффективность генов устойчивости к парше среди видов, сортов и гибридов яблони, выделить генотипы, содержащие высокоэффективные гены устойчивости к парше, перспективные для селекции на устойчивость к данной болезни.

8. Выявить источники генов устойчивости к мучнистой росе среди видов, сортов и гибридов яблони, выделить перспективные гибридные сеянцы яблони, устойчивые к мучнистой росе, для включения в селекционный процесс по созданию сортов.

10. Разработать подходы маркер-сопутствующей селекции яблони. Провести молекулярно-генетическое тестирование гибридных популяций яблони различного генетического происхождения на наличие высокоэффективных генов, контролирующих устойчивость к болезням и вредителям, отвечающих за качество плодов. Выделить перспективные гибридные сеянцы, содержащие комплекс хозяйственно ценных генов и включить их в селекционный процесс.

Основными **объектами исследования** служили виды, сорта и гибриды плодовых культур.

Предметом исследования являлся геном плодовых культур, его структура и организация, полиморфизм отдельных участков генома.

Научная новизна. Разработано новое научное направление - молекулярно-генетическое исследование разнообразия генофонда плодовых культур. Впервые получены следующие научные результаты:

проведена оценка уровня генетического разнообразия генофонда семечковых и косточковых плодовых культур, выращиваемых в Беларуси, установлены родственные связи между сортами, определены системы молекулярных маркеров для установления родословных сортов;

разработаны универсальные системы ДНК идентификации семечковых и косточковых плодовых культур, пригодные для практического использования, позволяющие оценить соответствие сортов критериям отличимости, однородности и стабильности (ООС-тест);

определены особенности генома клоновых мутантов яблони сорта Антоновка обыкновенная, показано, что изменения, приводящие к возникновению клоновых мутантов, могут быть локальны и являться результатом активности ретротранспозонов *Ty3-gypsy* группы;

выявлены источники генов устойчивости к болезням и вредителям среди сортов, образцов и селекционного материала яблони, разработаны методические подходы для маркер-сопутствующей селекции яблони;

обоснована эффективность использования ряда молекулярных маркеров в селекции яблони на устойчивость к болезням и вредителям;

показана эффективность комбинации генов *Rvi6* и *Rvi17* в одном генотипе при создании высокоустойчивых к парше сеянцев яблони;

создан сорт яблони нового поколения Паланэз, сочетающий высокую устойчивость к парше с комплексом хозяйственно-ценных признаков.

Положения, выносимые на защиту.

1. Молекулярные методы на основе SSR анализа целесообразно использовать для оценки генетического разнообразия, установления родственных связей и разработки методов ДНК-идентификации сортов плодовых культур, максимально соответствующих критериям точности, надежности и удобства получения результатов.

2. Разработана система молекулярных методов для установления родственных связей, выделения уникальных генотипов и идентификации сортов на основе оценки уровня генетического разнообразия и степени гомологии генофонда яблони, представленного в Беларуси. Определены отдельные гомологичные SSR локусы видов и межвидовых гибридов яблони, что позволило создать универсальную систему ДНК-идентификации представителей рода *Malus*, в основу которой положен SSR анализ с помощью набора из 6 высокоинформативных и полиморфных маркеров (CH01c06, CH02b12, CH02c02b, CH03d12, SdSSR, CH04h02). Метод позволяет получить уникальные молекулярно-генетические формулы сортов яблони, выращиваемых в Беларуси, и осуществлять ДНК идентификацию генотипов в соответствии с критериями отличимости, однородности и стабильности ООС-теста.

3. Клоновые мутанты яблони по составу аллелей микросателлитных последовательностей соответствуют исходному сорту. Генетическая изменчивость отдельных клоновых мутантов сорта Антоновка обыкновенная обусловлена ретроэлементами *Ty3-gypsy* группы. Для их идентификации на молекулярном уровне эффективен метод S-SAP анализа с комбинацией маркеров к длинным концевым повторам ретроэлементов и AFLP локусов.

4. Анализ локусов микросателлитных последовательностей и генетического расстояния между сортами груши, относящимися к виду *P. communis* и сортами, полученными в результате межвидовой гибридизации, указывают на низкую

генетическую дифференциацию культивируемых видов груши. Выявлена высокая степень гомологии отдельных областей генома видов груши и яблони, что позволяет использовать единую систему маркеров для молекулярно-генетической характеристики и ДНК-идентификации представителей *Malus* и *Pyrus*.

5. Генофонд косточковых культур, выращиваемых в Беларуси, характеризуется высоким уровнем генетического разнообразия. Система молекулярных маркеров, разработанная в результате оценки степени генетической близости и гомологии видов косточковых культур, позволяет оценить генетическое разнообразие генофонда косточковых культур и создать универсальный метод ДНК идентификации сортов вишни обыкновенной, черешни, сливы домашней, сливы диплоидной, абрикоса на основе 7 SSR маркеров (EMPA001, EMPA005, EMPA018, EMPA026, BPPCT025, BPPCT026, BPPCT039). Метод обеспечивает возможность проведения идентификации генотипов косточковых культур на молекулярном уровне в соответствии с критериями отличимости, однородности и стабильности ООС-теста.

6. Источниками генов устойчивости к парше, мучнистой росе, красногалловой яблонной тле являются дикие виды, старинные и современные сорта яблони. Наиболее эффективную устойчивость к парше на территории Беларуси обеспечивают гены *Rvi6* и *Rvi17*. Комбинация генов *Rvi6* и *Rvi17* в одном генотипе в сочетании с полигенной устойчивостью позволяет получить высокоустойчивые к парше (поражение отсутствует) гибридные сеянцы яблони. Последовательности, гомологичные гену *Rvi6*, представлены в геноме груши и могут являться кандидатами на роль генов устойчивости к парше у этого вида.

7. Сопоставление результатов ДНК-анализа и экспериментальных данных по полевой оценке устойчивости к заболеваниям сортообразцов и гибридных форм позволило разработать эффективные методы идентификации генов устойчивости к болезням и вредителям яблони на основе ДНК-маркеров и внедрить их в селекционный процесс. Применение традиционных селекционных подходов в сочетании с маркер-сопутствующей селекцией позволяет повысить точность селекционного отбора и разработать системы скрещивания для получения гибридных форм новой генерации с комплексной устойчивостью к парше, мучнистой росе, красногалловой яблонной тле, бактериальному ожогу, длительным сроком хранения плодов за счет пирамидизации генов в одном геноме.

Личный вклад соискателя. Выбор направления исследований, постановка и обоснование научных задач, выбор методов и условий проведения экспериментов, анализ, обобщение и интерпретация полученных результатов осуществлен лично автором. Экспериментальные данные получены совместно с сотрудниками руководимого автором коллектива. Основные результаты исследований получены в лаборатории молекулярной генетики ГНУ "Институт

генетики и цитологии НАН Беларуси". Наряду с результатами собственных исследований в работу включены отдельные результаты экспериментальных исследований, проводимых совместно с РУП "Институт плодородства". Автор выражает искреннюю благодарность д. с.-х. н., профессору Козловской З.А. и другим сотрудникам РУП "Институт плодородства" за всестороннюю помощь в проведении совместных исследований. Автор выражает глубокую благодарность академику Картелю Н.А. и академику Хотылёвой Л.В. за научную школу, которая была пройдена под их руководством.

Апробация результатов диссертации и информация об использовании ее результатов. Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационного исследования, были представлены в виде докладов на следующих научных конференциях: Международной научной конференции «Методическое обеспечение устойчивого развития современного плодородства» (Самохваловичи, 2006), Международной научно-практической конференции «Совершенствование сортимента плодовых, ягодных, орехоплодных культур и винограда в современных условиях хозяйствования» (Самохваловичи, 2007), VIII съезде Украинского общества генетиков и селекционеров им. Н.И.Вавилова (Алушта, 2007), Международной конференции «Actualities in plant physiology» (Каунас, 2008), Первой Международной конференции «Биотехнология Плодовых Культур» (Дрезден, 2008), Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 2008), Международной научной конференции «Роль Вавиловской коллекции генетических ресурсов растений в меняющемся мире» (Санкт-Петербург, 2009), Международной научно-практической конференции «Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов» и X зоологической конференции (Минск, 2009), V Международной научной конференции «Факторы экспериментальной эволюции организмов» (Алушта, 2009), Международной научно-практической конференции «Развитие научного наследия И.В. Мичурина по генетике и селекции плодовых культур», посвященной 155-летию со д.р. И.В. Мичурина (XXII Мичуринские чтения) (Мичуринск, 2010), Международной научной конференции «Генетика и биотехнология на рубеже тысячелетий» (Минск, 2010), VI Международной конференции «Современная биотехнология сельскохозяйственных растений и биобезопасность (Геном растений VI)» (Одесса, 2010), Международной конференции "Молекулярная филогения " (Москва, 2010), V Международный научный семинар «Генетика для сельского хозяйства» «ДНК-биотехнологии в растениеводстве и животноводстве» (Минск, 2011), XIII Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics (Warsaw, 2011), VII Международной научной «Факторы экспериментальной эволюции организмов» (Алушта, 2011), Международной научно-практической конференции «Теоретические и

прикладные аспекты современной фитопатологии и иммунитета растений» (Самохваловичи, 2011), Международной конференции «Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры» (Минск, 2012), Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» (Минск, 2012), III Вавиловской Международной конференции «Идеи Н.И. Вавилова в современном мире» (Санкт-Петербург, 2012), VIII Международной научной конференции «Факторы экспериментальной эволюции организмов» (Алушта, 2013), VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Молекулярная диагностика 2014" (Москва, 2014).

Результаты диссертации внедрены и используются в селекционном процессе яблони и в учебном процессе в Беларуси, России и Украине, что подтверждено 8 актами о внедрении и практическом использовании результатов исследования. Методы ДНК-идентификации внедрены в аккредитованный Республиканский центр по генетическому маркированию и паспортизации растений, животных, микроорганизмов и человека ГНУ "Институт генетики и цитологии НАН Беларуси".

Опубликованность результатов диссертации. Основные результаты диссертации изложены в 68 публикациях, в том числе: монографии (13,12 авторских листа), 23 статьях в научных изданиях, включенных в Перечень ВАК Республики Беларусь и соответствующих пункту 18 Положения ВАК о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь (9,4 авторских листа), 19 статей в других журналах и сборниках научных трудов, 11 статей в материалах научных конференций, 10 публикаций в сборниках тезисов докладов, 4 методических рекомендациях.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, общей характеристики работы, 6 глав, библиографического списка, который включает 523 литературных источника, в том числе 68 публикаций соискателя, и приложений. Работа изложена на 361 странице, из которых 33 страницы занимает 54 рисунка, 59 страниц - 72 таблицы, 44 страницы - библиографический список, 35 страниц - приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе описывается современное состояние проблемы в области генотипирования и идентификации геномов плодовых культур. Анализ литературных данных показывает, что за последние годы получены новые сведения о структуре и организации генома плодовых культур. Это создает

основу для углубленного изучения их генома, разработки и применения технологии маркер-сопутствующей селекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проведения исследования были сформированы коллекции видов, сортов, линий и образцов плодовых культур, в том числе и относящихся к межвидовым гибридам. Коллекции включали 161 образец семечковых культур и 106 образцов косточковых культур различного генетического происхождения, выращиваемых на территории Беларуси, в том числе и сорта, внесенные в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь. Среди них сорта селекции Беларуси, России, Украины, Германии, Польши и других стран. Для каждого сорта уточнялось происхождение. В исследование по идентификации генов, отвечающих за хозяйственно ценные признаки, были включены сорта яблони, представляющие селекционный интерес и гибридные сеянцы яблони, полученные от различных комбинаций скрещивания в РУП "Институт пловодства". Суммарное количество образцов по плодовым культурам составило 2194.

Исследования проводили методами RAPD-, ISSR-, SSR-, S-SAP-, SCAR-, CAPS-анализа, привлекались также методы клонирования и секвенирования. Выбор метода анализа определялся поставленной задачей. Эффективность условия проведения реакций определялась экспериментально. В результате проведения исследования созданы оригинальные маркеры, оптимизированы методы амплификации с праймерами разного типа. Подобраны условия реакций, позволяющие получать стабильно воспроизводимые результаты. Разработаны подходы для маркер-сопутствующей селекции яблони.

Для изучения генетического разнообразия видов семечковых и косточковых плодовых культур были проведены расчеты количества идентифицированных и полиморфных локусов, доли полиморфных локусов, частоты встречаемости аллелей, уровня ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности, числа эффективных аллелей, значение индекса Райта, дискриминационной силы маркера. Приведенные расчеты позволили достоверно оценить генетическое разнообразие анализируемых образцов и выделить наиболее высокоэффективные и информативные молекулярные маркеры. Дендрограммы генетического сходства сортов были получены с помощью программы Treemap методом UPGMA, основываясь на коэффициенте генетического сходства Nei и Li. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакета программ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и программы Geneious 4.7.6. Оценку гомологии секвенированных последовательностей проводили с привлечением базы данных GenBank. Учеты и наблюдения по устойчивости яблони к парше и

мучнистой росе были проведены в РУП "Институт плодоводства" согласно "Программе и методике селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур" и "Программе и методике первичного сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур".

Экспериментально обоснован выбор метода для исследования генетического разнообразия и разработки методов ДНК-идентификации сортов плодовых культур. Необходимость этапа связана с тем, что в настоящее время нет стандартных методов ДНК-идентификации сортов растений, в то время как существует большой выбор молекулярных маркеров, позволяющих проводить идентификацию генотипов на внутривидовом уровне. Выбор системы маркеров осуществлен на основе литературных и собственных экспериментальных данных, полученных с привлечением важных сельскохозяйственных культур (подсолнечника, пшеницы, картофеля, сахарной свеклы), различающихся по уровню генетического разнообразия и полиморфизму. Проведена сравнительная оценка молекулярных методов идентификации генотипов с помощью маркеров различного типа. Для разработки методов ДНК-идентификации плодовых культур предложен метод SSR-анализа как наиболее перспективный и пригодный для практического использования. Важными критериями выбора метода являлись его высокая точность, надежность, а также хорошая воспроизводимость результатов.

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ СОРТОВ ЯБЛОНИ НА ОСНОВЕ МЕТОДА SSR АНАЛИЗА

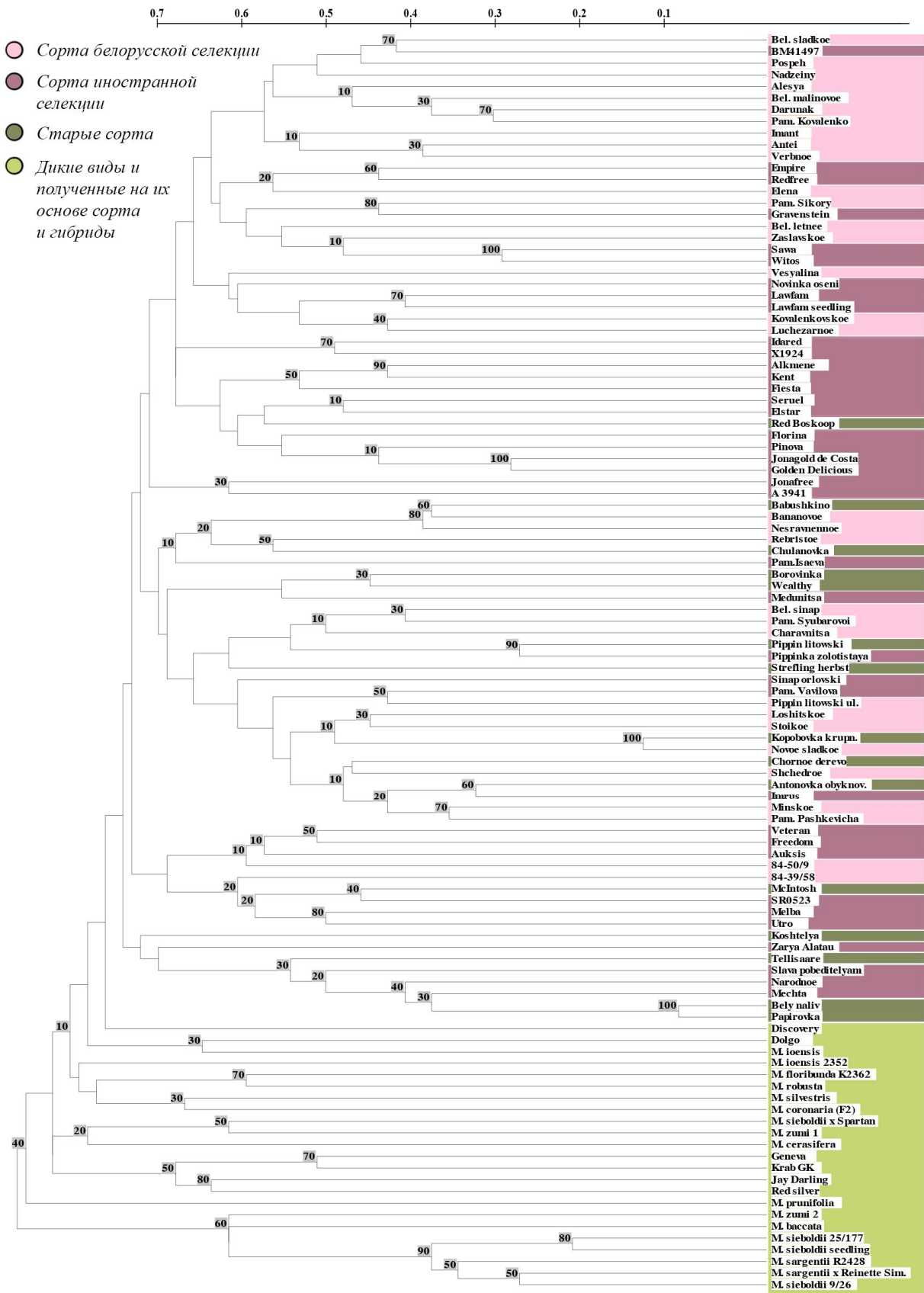
Для исследования генетическое разнообразие сортов и видов яблони был сформирован набор, включающий 20 SSR-маркеров, созданных на основе *M. × domestica*. Предпочтение отдавалось моноаллельным высокополиморфным маркерам, охватывающим разные области генома яблони. В общей сложности среди 108 сортов и видов яблони было выявлено 330 полиморфных аллелей. Большой вклад в общее разнообразие аллелей вносили редкие сорта и дикие виды. В составе их генотипов присутствуют аллели, не встречающиеся у культурных сортов. Количество аллелей, детектируемых для каждого маркера, колебалось от 8 до 40 и в среднем составило 16,5. Для отдельных аллелей отмечена высокая частота встречаемости, вплоть до 77%, что снижает их диагностическую ценность. Значение числа эффективных аллелей (N_e) оказалось минимальным для маркера СН01b12 - 3,13 и максимальным для маркера СН04h02 - 16,67. Среднее значение для всех маркеров составило 6,25. Среднее значение индекса Райта (F) было равно 0,2, среднее значение H_e составило 0,84, H_o - 0,668, что говорит о высоком уровне полиморфизма и гетерозиготности сортов яблони. Поддержанию высокого уровня гетерозиготности способствует способ опыления.

Яблоня является перекрестноопыляемым видом, имеющим механизм самонесовместимости, мешающий самоопылению.

Сравнение генетического разнообразия сортов белорусской селекции, старинных сортов, сортов селекции стран СНГ и Прибалтики, сортов селекции других стран, а также диких видов и межвидовых гибридов яблони показало, что сорта белорусской селекции по степени генетического разнообразия не уступают другим сортам ($A_e = 9,6$, $H_e = 0,79$). Генетическое разнообразие сортов белорусской селекции несколько выше, чем сортов селекции стран СНГ и Прибалтики ($A_e = 8,7$, $H_e = 0,79$) и сортов селекции других стран ($A_e = 8,3$, $H_e = 0,79$), и ниже, чем старинных сортов ($A_e = 10,3$, $H_e = 0,82$) и видов и межвидовых гибридов ($A_e = 12,2$, $H_e = 0,86$).

Кластерный анализ сортов и видов яблони продемонстрировал, что их генотипы имеют уникальный состав SSR аллелей (рисунок 1). Генетическое расстояние между образцами колеблется в пределах от 0,8 до 0,1. Значительная часть диких видов яблони образует отдельные кластеры и находится на большем генетическом расстоянии от культурных сортов. К ним ближе сорт Долго, созданный на основе *M. baccata*, а также Jeneva и креб GK, ведущие свое происхождение от *M. Nadzvezkyana*. В эту же группу входят Jay Darling и Red silver, происхождение которых неизвестно. Культурные сорта яблони в генетическом отношении очень разнообразны. Они формируют отдельные кластеры, в которые входят как современные, так и старые сорта, а также сорта иностранной селекции. Отдельный кластер объединяет группу сортов, связанных общим происхождением с McIntosh, а также VM41497 и другими. Генетические расстояния между двумя старорусскими сортами Белый налив и Папировка, в отношении идентичности которых высказывались разные мнения, указывают на то, что это два разных сорта, которые имеют общее происхождение. Близки к ним сорта Мечта, Народное, Белорусское летнее и Слава победителям, связанные общим происхождением с Папировкой. Современные сорта белорусской селекции генетически связаны как с местными старинными сортами, так и с современными сортами иностранной селекции. Это отражает тенденции современной селекции в Беларуси, которая старается сочетать в новых сортах лучшие качества местных и иностранных сортов.

Сформированная система маркеров позволяет уточнить происхождение сортов яблони на молекулярном уровне. В частности, сорт Память Сюбаровой содержит SSR-аллели, унаследованные от сортов Серуэл и Белорусский синап, что подтверждает его происхождение от заявленной комбинации скрещивания. Состав SSR-аллелей сорта Память Коваленко также соответствует заявляемым родителям - Белорусское малиновое × VM41497. В случае сорта Пепин литовский улучшенный было известно, что он получен в результате опыления Пепина литовского неизвестным сортом. Сравнительный анализ состава SSR-аллелей



Цифры на дендрограмме отражают значения бутстрепа. На шкале сверху отмечено генетическое расстояние

Рисунок 1. – Дендрограмма генетического сходства образцов яблони, построенная на основе результатов SSR-анализа

показал, что опылителем служил сорт Антоновка обыкновенная. Вывод, полученный в результате молекулярно-генетического анализа, совпадает с морфологической оценкой сорта Пепин литовский улучшенный.

На основании анализа уровня генетического разнообразия сортов и видов яблони был сформирован оптимальный набор SSR-маркеров, который позволил достоверно идентифицировать индивидуальные образцы. Учитывались уровень информативности каждого маркера, частота встречаемости аллелей среди сортов, удобство анализа фрагментов амплификации. Сформированный набор включает шесть SSR-маркеров – CH03d12, SdSSSR, CH04h02, CH02b12, CH02c02b, CH01c06, характеризующихся высоким уровнем полиморфизма (таблица 1).

Таблица 1. – Количество аллелей (A_e), уровень наблюдаемой (H_e) и ожидаемой гетерозиготности (H_o), число эффективных аллелей (N_e), индекс Райта (F), количество и доля уникальных генотипов, дискриминационная сила маркера (PD), рассчитанные для 108 образцов видов, сортов и гибридов яблони

Название маркера	A_e	H_e	H_o	N_e	F	Количество уникальных генотипов	Доля уникальных генотипов	PD
CH01c06	13	0,80	0,47	5,0	0,41	36	0,333	0,9024
CH02b12	11	0,83	0,73	5,88	0,12	33	0,306	0,9283
CH02c02b	8	0,75	0,60	4,0	0,2	19	0,176	0,8701
CH03d12	14	0,80	0,55	5,0	0,31	37	0,343	0,9222
CH04h02	40	0,94	0,71	16,67	0,24	83	0,769	0,9840
SdSSSR	17	0,89	0,45	9,09	0,49	36	0,333	0,9413
среднее	17,2	0,84	0,59	7,6	0,3	40,7	0,377	0,9247

Среднее количество аллелей, выявляемых с помощью предложенного набора из 6 SSR маркеров, составило 17,2 среди исследованных образцов; среднее значение количества уникальных генотипов - 40,7. Доля уникальных генотипов в среднем составила 0,377; PD - 0,9247. С помощью сформированного набора SSR маркеров были получены уникальные молекулярно-генетические формулы сортов яблони, пример которых представлен в таблице 2. При записи формулы использовали принцип, предложенный Сиволапом Ю.М. с соавторами (2000, 2011 г.) - локус обозначен буквенным символом, нижний индекс к нему отражает длину аллелей в п.н. Применена следующая кодировка локусов - CH01c06 = A, CH02b12 = B, CH02c02b = C, CH03d12 = D, CH04h02 = E, SdSSSR = F. Метод позволяет идентифицировать сорта яблони, внесенные в Государственный реестр сортов древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь, а также другие сорта различного генетического происхождения, выращиваемые в Беларуси и представляющие ценность для селекционного процесса, виды яблони и

межвидовые гибриды. При необходимости предложенную комбинацию маркеров можно расширить, что позволит идентифицировать практически любое количество сортов. Разработанный метод позволяет проводить ДНК идентификацию сортов яблони в соответствии с критериями отличимости, однородности и стабильности ООС-теста.

Таблица 2. – Пример молекулярно-генетических паспортов сортов яблони

Название сорта	Молекулярно-генетическая формула
Алеся	A _{158,160} B ₁₄₀ C _{111,125} D _{115,123} E _{178,186,194,198} F ₁₇₉
Антей	A ₁₆₀ B ₁₄₀ C _{111,115} D _{115,145} E _{184,198,204} F ₂₁₁
Антоновка обыкновенная	A ₁₆₀ B ₁₂₄ C ₁₁₁ D _{103,121} E _{180,184,204,230} F ₁₇₅
Ауксис	A _{158,186} B _{114,142} C _{125,176} D ₁₂₁ E _{172,180,230} F ₁₇₉
Бабушкино	A ₁₆₀ B ₁₄₀ C _{121,125} D _{121,145} E _{172,180,184,198} F _{173,211}

Метод ДНК-идентификации с помощью SSR-маркеров позволяет эффективно и надежно идентифицировать генотипы яблони, полученные в результате перекрестного опыления. Однако у яблонь известны также клоновые мутанты, которые фенотипически могут отличаться от исходных форм и друг от друга по размеру и цвету плодов, форме и размеру кроны дерева, характеру ветвления и т.д. Некоторые из них могут быть выделены в самостоятельные сорта, в связи с чем вопрос идентификации клоновых мутантов яблони приобретает важное практическое значение. Исследование генетического разнообразия клоновых мутантов сорта Антоновка обыкновенная показало, что количество различий в их геномах значительно ниже, чем количество различий между сортами яблони. Клоновые мутанты идентичны исходному сорту по составу SSR-локусов. Низкую эффективность для дифференциации клоновых мутантов показал RAPD анализ с 27 праймерами, ISSR анализ с 10 праймерами. Результаты говорят о том, что изменения, приводящие к возникновению клоновых мутантов, могут быть локальными и не затрагивают большую часть генома. Идентифицировать клоновые мутанты удалось методом S-SAP, позволяющим оценить расположение в геноме мобильных генетических элементов. В результате анализа 33 комбинаций S-SAP-праймеров выделено 3, с помощью которых выявляются полиморфные фрагменты между отдельными образцами - LTR2 + M13, LTR2 + M15, LTR2 + M24 и LTR2 + M53. Обнаруженные различия в геномах клоновых мутантов яблони сорта Антоновка обыкновенная были обусловлены ретроэлементами *Ty3-gypsy*. Различий в паттернах локализации ретротранспозонов *Ty1-copia* у изучаемых клоновых мутантов не наблюдалось.

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ СОРТОВ ГРУШИ НА ОСНОВЕ МЕТОДА SSR АНАЛИЗА

Для изучения генетического разнообразия сортов груши, выращиваемых в Беларуси, был сформирован набор из 17 SSR-маркеров, разработанных для яблони и имеющих гомологичные сайты связывания в геноме видов *Pyrus*. С их помощью среди 43 образцов груши было выявлено 217 полиморфных аллелей. Количество полиморфных аллелей на маркер колебалось от 4 до 21 со средним значением 12,8. Самый высокий уровень информативности маркера наблюдается в локусах SN02b12 и SN03g12 – 0,91. Наименьшее значение отмечено для локуса SN01b12 – 0,52. При сравнении коэффициента полиморфизма яблони и груши видно, что оба вида характеризуются высоким генетическим разнообразием аллелей микросателлитных последовательностей. Для рассмотренных локусов среднее значение H_e сортов груши равно 0,81, яблони – 0,84 (таблица 3). Сорта груши, так же как и сорта яблони, характеризуются относительно высоким уровнем гетерозиготности ($H_o = 0,56$, $F = 0,3$), чему способствует перекрестное опыление, характерное для груши так же как и для яблони. Количество информативных аллелей среди сортов груши составило в среднем 6,49. Это несколько ниже, чем среди яблони – 7,5. Максимальное значение этот показатель среди образцов груши достигал при использовании маркеров SN02b12 и SN03g12 – 11,11; яблони – маркера SN04h02 – 16,67.

Таблица 3. – Количество аллелей (A_e), уровень наблюдаемой (H_e) и ожидаемой гетерозиготности (H_o), число эффективных аллелей (N_e), индекс Райта (F), количество и доля уникальных генотипов, дискриминационная сила маркера (PD), рассчитанные для 43 образцов груши

Название маркера	A_e	H_e	N_e	H_o	F	Количество уникальных генотипов	Доля уникальных генотипов	PD
SN01c06	7	0,71	3,49	0,77	-0,08	17	0,395	0,8740
SN02b12	18	0,91	11,11	0,48	0,47	35	0,814	0,9680
SN02c02b	8	0,77	4,35	0,60	0,22	16	0,372	0,8708
SN03d12	11	0,81	5,26	0,47	0,42	19	0,442	0,8956
SN04h02	13	0,70	3,33	0,51	0,27	17	0,395	0,7572
SdSSR	14	0,89	9,09	0,74	0,17	28	0,651	0,9345
среднее значение	11,8	0,80	6,11	0,60	0,30	22,0	0,512	0,8834

Данные о составе SSR аллелей были использованы для уточнения генетического сходства сортов груши. Генетическое расстояние между образцами колеблется в пределах от 0.9 до 0.3. На большем генетическом расстоянии относительно других сортов находятся китайский сорт Пин-го-ли, происхождение которого неизвестно, сорт американской селекции Хони Дью, происхождение которого связано с грушей грушелистной, и казахстанский сорт Талгарская красавица, полученный от свободного опыления сорта Лесная красавица предположительно пыльцой другого вида. Сорта груши, полученные в результате скрещивания европейских сортов с уссурийской грушей, часто используемой в скрещивании как источник зимостойкости, распределены в разных кластерах совместно с сортами груши европейской. Они не выделяются в отдельную группу относительно сортов европейской груши, что говорит о схожести их геномов.

В результате анализа информативности маркеров для ДНК-идентификации сортов груши был выбран набор из шести высокополиморфных SSR-маркеров, который успешно зарекомендовал себя при идентификации сортов яблони. Он позволил выявить высокую долю уникальных генотипов среди образцов груши - 0,512. Значение дискриминационной силы маркера было высоким для всех локусов - от 0,7572 для маркера CH04h02 до 0,9680 для маркера CH02b12 и в среднем составило 0,8834. Показатели, характеризующие информативность отдельных маркеров в геноме груши и яблони, различались незначительно. Приведенные в таблице расчеты демонстрируют, что набор маркеров CH01c06, CH02b12, CH02c02b, CH03d12, CH04h02, SdSSR эффективен для идентификации генотипов груши. Пример молекулярно-генетических паспортов сортов груши представлен в таблице 4.

Таблица 4. – Пример молекулярно-генетических паспортов сортов груши

Название сорта	Молекулярно-генетическая формула
Аллегро	A _{150,152} B _{112,134} C ₁₃₃ D _{89,113} E ₁₈₈ F _{140,164}
Белорусская поздняя	A _{152,158} B _{101,114,134,152} C _{117,129} D _{101,113} E _{184,190} F _{168,176}
Бере лошицкая	A _{152,158} B _{101,103,140} C _{119,125} D _{113,127} E ₁₈₄ F _{166,172}
Бере Люка	A ₁₅₀ B _{101,114,124,134} C _{125,129} D _{111,115} E ₁₈₄ F ₁₆₄
Большая летняя	A _{150,152} B _{101,138,144} C _{119,125} D _{111,115} E ₁₈₄ F _{162,164}

Метод позволяет идентифицировать как сорта груши европейской, так и сорта, полученные от скрещивания груши европейской с грушами уссурийской и грушелистной, а также гибриды, полученные в результате межвидовых скрещиваний. Предложенный метод ДНК-идентификации сортов груши позволяет дифференцировать сорта в соответствии с критериям ООС-теста.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ СОРТОВ КОСТОЧКОВЫХ КУЛЬТУР И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ИХ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИИ НА ОСНОВЕ SSR АНАЛИЗА

Исследования генетического разнообразия сортов косточковых культур, выращиваемых в Беларуси, проводили с привлечением 20 SSR маркеров, охватывающих разные хромосомы, отобранных как наиболее перспективные. Наличие сайтов связывания для выбранных SSR маркеров в геноме всех анализируемых видов и соответствие размеров идентифицированных аллелей указывает на то, что виды косточковых культур генетически близки, дивергенция их нуклеотидных последовательностей низкая. В общей сложности среди 106 образцов сортов и видов косточковых культур было выявлено 524 полиморфных аллеля. Виды косточковых культур различались по общему количеству выявляемых аллелей и другим показателям (таблица 5).

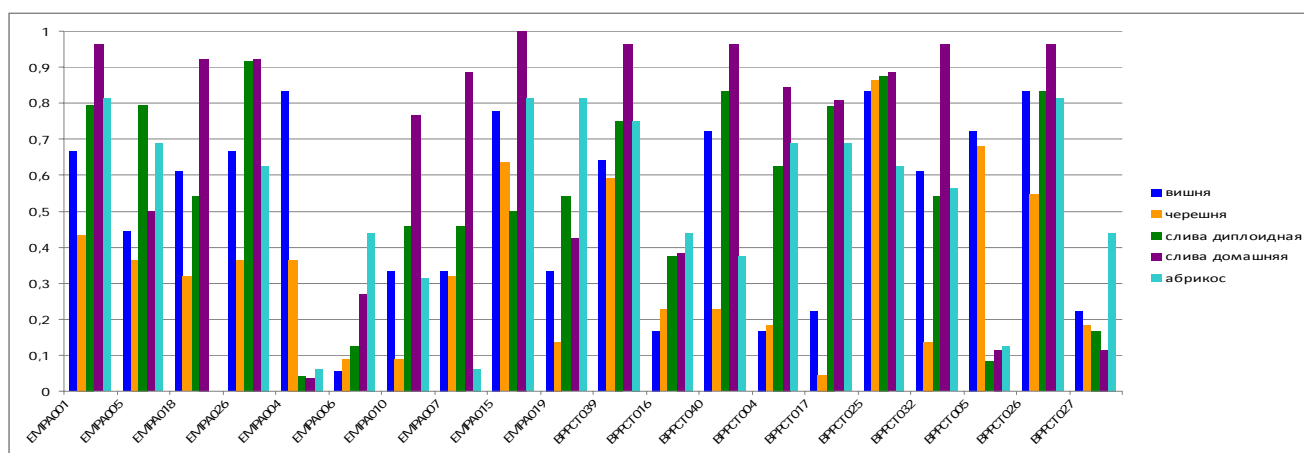
Таблица 5. – Средние значения количества аллелей (A_e), количества уникальных генотипов, доли уникальных генотипов, дискриминационной силы маркера (PD), рассчитанные для образцов косточковых культур на основе анализа данных, полученных с использованием 20 SSR маркеров.

Название маркера	Общее количество образцов	Общее количество аллелей	A_e	Кол-во уникальных генотипов	Доля уникальных генотипов	PD
вишня	18	186	9,3	9,2	0,508	0,7210
черешня	22	97	4,9	7,5	0,341	0,6549
слива	24	226	11,3	13,3	0,552	0,7405
слива	26	307	15,4	17,7	0,681	0,8106
абрикос	16	120	6,0	8,1	0,506	0,6727
всего	106	936				
среднее		187,2	9,4	11,2	0,518	0,7199

Минимальное количество аллелей было обнаружено среди сортов черешни - 97 и абрикоса - 120. У сливы домашней выявлено максимальное количество аллелей 307, что объясняется ее гексаплоидным происхождением. При этом общее количество аллелей среди сортов вишни обыкновенной, являющейся тетраплоидом, равно 186. Это меньше, чем среди сортов сливы диплоидной, у которой их 226. Среднее значение количества аллелей минимально среди сортов черешни и абрикоса (4,9 и 6,0 соответственно), и максимально у сливы домашней и сливы диплоидной (15,4 и 11,3 соответственно) и в среднем составило 9,4.

Максимальное среднее количество уникальных генотипов было выявлено среди сортов сливы домашней - 17,7. Соответственно доля уникальных генотипов и дискриминационная сила маркеров также была выше у этого вида - 0,681 и 0,8106. Относительно низкие значения наблюдались у черешни - среднее количество уникальных генотипов - 7,5, доля уникальных генотипов - 0,341, PD - 0,6549. У абрикоса среднее количество уникальных генотипов было равно 8,1. Сорта сливы диплоидной уступали по данным показателем только гексаплоидным сортам сливы домашней (среднее количество уникальных генотипов = 13,3, доля уникальных генотипов = 0,552, PD = 0,7405). Полученный результат говорит о высоком уровне генетического разнообразия сортов сливы диплоидной относительно других диплоидных видов косточковых культур. По всей видимости, оно обусловлено тем, что понятие "слива диплоидная" условное. В эту категорию входят сорта, полученные в результате межвидовой гибридизации. В их формировании принимали участие такие виды как алыча (*P. cerasifera*), слива китайская (японская) (*P. salicina* Lindl.) и ее подвиды - сливы уссурийская (*subsp. mandschurica* или *ussurienensis*), американская (*P. americana* Marsh.) и другие.

Данные, отражающие долю уникальных генотипов, выявляемых с помощью разных маркеров, представлены на рисунке 2, который наглядно отражает диагностическую ценность маркера применительно к каждой культуре.



На оси ординат обозначена доля уникальных генотипов в %, на оси абсцисс указаны названия SSR маркеров

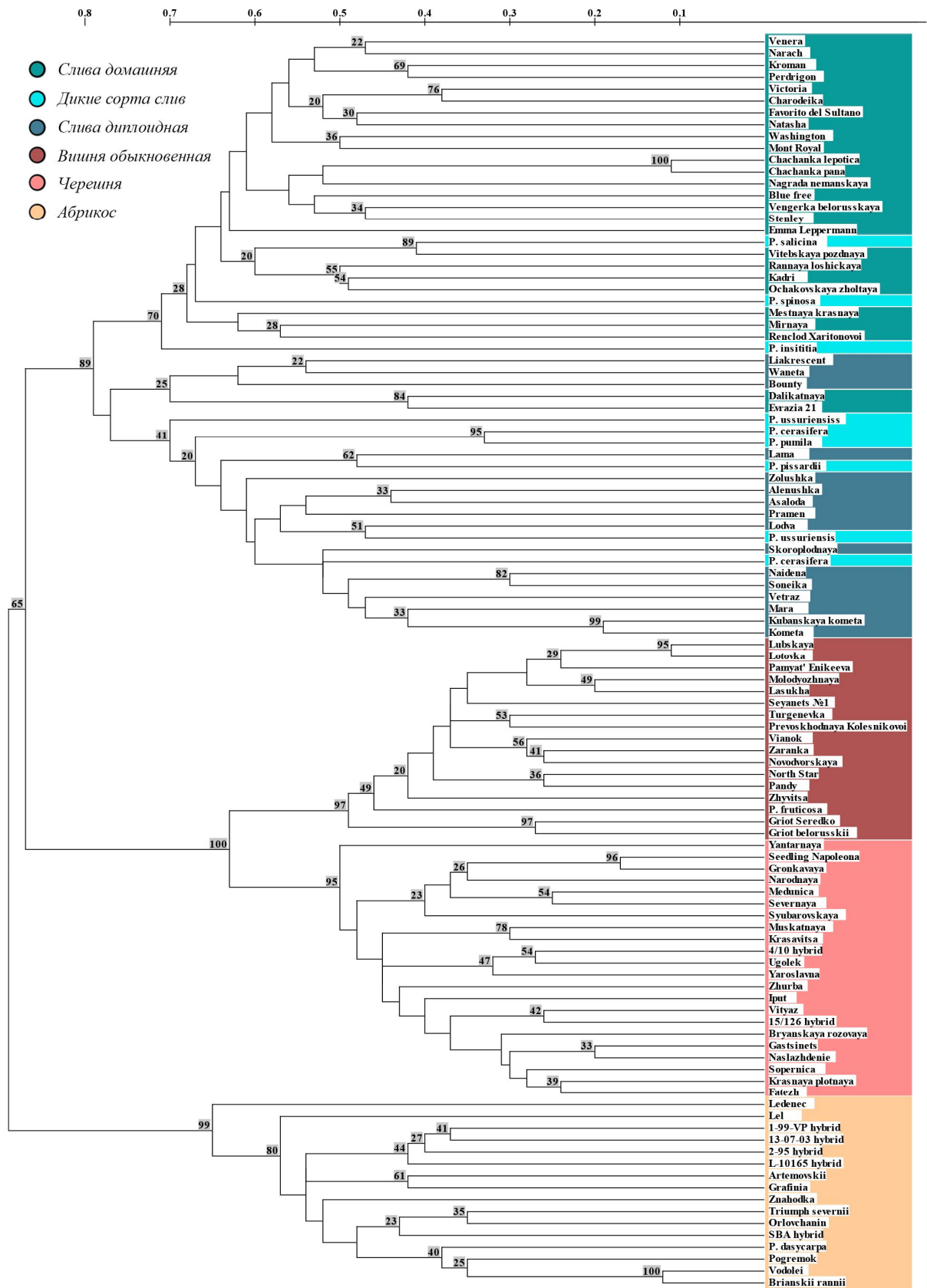
Рисунок 2. – Доля уникальных генотипов, выявляемых с помощью SSR маркеров, среди образцов косточковых культур

Большая часть SSR-локусов характеризовалась высоким полиморфизмом аллелей у всех исследуемых видов. Для сортов сливы домашней значение доли уникальных генотипов превысило 0,8 в случае использования 12 SSR-маркеров из 20. При этом маркер EMPA015 фактически позволил разделить по составу аллелей все тестируемые сорта сливы домашней. Не многим уступают по полиморфизму сорта сливы диплоидной. Наименьшие показатели доли

уникальных генотипов среди разных SSR-маркеров отмечены для сортов черешни. В целом количество высоко информативных SSR-маркеров, значение доли уникальных генотипов для которых превысило 0,3 для всех видов составило 8 из 20. Поддержанию генетического разнообразия способствует перекрестное опыление, характерное для этих видов. Кроме того, в селекции косточковых культур широко используется межвидовая гибридизация, что благоприятствует увеличению генетического разнообразия сортов.

Сорта, относящиеся к вишне обыкновенной, черешне, сливе домашней, сливе диплоидной и абрикосу образуют отдельные кластеры на дендрограмме генетического сходства (рисунок 3). При этом все 106 образцов демонстрируют уникальный состав SSR-аллелей. Наибольшая генетическая близость наблюдается между образцами сливы домашней и сливы диплоидной, между образцами черешни и вишни обыкновенной. Сорта абрикоса образуют более отдаленный кластер. Генетические расстояния между сортами слив, как диплоидных, так и гексаплоидных, находятся в пределах около 0,34 - 0,75. Только два близких по происхождению сорта сливы домашней Чачанска лепотика и Чачанска рана находятся на минимальном расстоянии - 0,1. Они получены от одной комбинации скрещивания - Стенли × Ruth Gerstetter. Генетически близки к ним родительский сорт Стенли и его потомки. В общий кластер с сортами сливы домашней вошел вид тетраплоидного терна *P. spinosa*, который, как предполагается, вместе с алычой *P. cerasifera* сформировал ее генотип. Генетически близки диплоидными сливами алыча краснолистная *P. pissardii* (*P. cerasifera* var. *pissardii*), слива карликовая *P. pumila*, слива уссурийская *P. ussuriensis*.

Сорта вишни обыкновенной и черешни формируют четкие отдельные кластеры с максимальным значением будстрепы 100. Внутри вида выявляется значительное генетическое разнообразие. Максимальное генетическое расстояние между сортами находится на уровне 0,6. Среди сортов вишни обыкновенной более близкими в генетическом отношении оказались сорта белорусской селекции Заранка и Вянок. Сорт Новодворская, потомками которого они являются, тесно связан с ними генетически. Примечательно, что полученный в результате межвидовой гибридизации сорт Превосходная Колесниковой, а также образец вишни степной не выделяются в самостоятельный кластер и демонстрируют тесную связь с сортами вишни обыкновенной, что дополнительно подтверждает генетическую близость видов вишни и черешни. Генетические расстояния между сортами черешни в целом сходны с расстояниями между сортами вишни обыкновенной. Общую группу формируют сорт Красная плотная и полученные на его основе сорта. Сорта абрикоса группируются на максимальном расстоянии от черешни, вишни обыкновенной и слив. Сорта генетически хорошо дифференцированы - в основном в пределах значений генетических расстояний 0,35 - 0,75.



Цифры на дендрограмме отражают значения бутстрэпа. На шкале сверху отмечено генетическое расстояние

Рисунок 3. – Дендрограмма генетического сходства образцов косточковых культур, построенная на основе результатов SSR-анализа

На основании анализа полиморфизма SSR-аллелей косточковых культур был выбран единый набор маркеров, позволяющий проводить ДНК-идентификацию сортов всех исследуемых видов: ЕМРА001, ЕМРА005, ЕМРА018, ЕМРА026, ВРРСТ025, ВРРСТ026, ВРРСТ039. Для идентификации сортов абрикоса маркер ЕМРА018 не используется. Для достоверной дифференциации сортов этого вида достаточно 6 маркеров. Показатели, характеризующие информативность выбранных маркеров, выше, чем средние значения для всех 20 SSR маркеров, использованных в исследовании (рисунок 4). Так, среднее количество аллелей, рассчитанное на основании значений, полученных с помощью 20 SSR маркеров, составило 9,4; для выбранного набора маркеров - 12,2. Максимальное среднее количество аллелей отмечено для сливы домашней - 20,0; минимальное - для черешни - 6,6. Среднее количество уникальных генотипов составило 11,2; а с помощью набора для идентификации - 15,7. При этом сохраняется основная тенденция - наиболее полиморфными оказываются сорта сливы домашней, затем в порядке убывания сорта сливы диплоидной, вишни обыкновенной, абрикоса, черешни.



Рисунок 4. – Средние значения доли уникальных генотипов и дискриминационной силы маркера, выявляемые методом SSR анализа, среди образцов косточковых культур

Полученные результаты показывают, что SSR маркеры, выбранные для идентификации сортов косточковых культур, высокополиморфны и информативны. Молекулярно-генетическая формула, получаемая с их помощью, уникальна для всех образцов. Предложенный нами экспериментально обоснованный метод ДНК-идентификации является оптимальным по количеству используемых маркеров. Он позволяет получить молекулярно-генетические паспорта сортов вишни обыкновенной, черешни, сливы домашней, сливы диплоидной, абрикоса, культивируемых в Беларуси, как отечественной, так и зарубежной селекции, а также коллекционных образцов близкородственных видов/подвидов/разновидностей косточковых культур. Его можно успешно применять для установления сортовой типичности и сортовой чистоты.

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К МАРКЕР-СОПУТСТВУЮЩЕЙ СЕЛЕКЦИИ ЯБЛОНИ

Парша - одно из самых опасных заболеваний яблони. С целью выявления источников генов, определяющих устойчивость к нему, была проведена оценка распространения генов *Rvi2*, *Rvi4*, *Rvi5*, *Rvi6*, *Rvi11*, *Rvi15*, *Rvi17* среди 130 сортов и образцов яблони и сравнительная оценка по уровню их устойчивости к парше. По степени устойчивости/восприимчивости 130 образцов были распределены следующим образом: высокоустойчивые – 41, устойчивые – 18, слабоустойчивые – 43, среднеустойчивые – 25, восприимчивые – 3. Для идентификации генов использовали технологию молекулярных маркеров. Сопоставление данных об уровне устойчивости и распространении генов позволило определить, что гены *Rvi2*, *Rvi4*, *Rvi5*, *Rvi15* преодолены современными расами патогена. Содержащие их сорта оказываются восприимчивыми к парше. Наиболее эффективными на территории Беларуси являются гены *Rvi6* и *Rvi17*. Ген *Rvi6* был детектирован в геноме 41 сорта (30,8 %). Сравнение полученных результатов с родословными сортами яблони позволило определить, что основным источником гена *Rvi6* в сортах белорусской селекции – Белорусское сладкое, Дарунак, Надзейны, Память Коваленко, Поспех – была линия VM41497. В сорт Имант ген передан от сорта Либерти. Присутствие гена обеспечивает высокую устойчивость содержащих его сортов яблони к парше. Ген *Rvi17*, который несет сорт Антоновка обыкновенная, представлен у 10 сортов, которые характеризовались стабильной полевой устойчивостью к парше в течение последних эпифитотийных лет развития заболевания – паршой было поражено не более 10% листьев. По результатам полевых наблюдений 2 сорта (Пепин литовский улучшенный и Коваленковское) были отнесены в группу среднепоражаемых – поражению паршой было подвержено до 25 % листьев при условии умеренного характера спороношения.

Парша обыкновенная является одним из наиболее опасных заболеваний не только яблони, но и груши. Из генома устойчивого к парше сорта груши Память Яковлева нами была выделена последовательность *PVf1* длиной 3081 п.н. (номер доступа в GenBank - KC806058), гомологичная *HcrVf* генам яблони и R-генам других растений. *PVf1* содержит открытую рамку считывания, кодирующую белок размером в 1012 аминокислотных остатков. В нем представлены: N-концевой домен лейцин-богатого повтора, LRR1 - лейцин богатые повторы (LRRs) из подсемейства рибонуклеаз-подобных ингибиторов (RI). LRRs соответствуют структурной единице, состоящей из бета-цепи и альфа-спирали. Исследуемая последовательность гипотетического белка состоит из 12 цепей, соответствующих 11 полным повторам (рисунок 5). Нуклеотидные последовательности генов устойчивости к парше груши пока не установлены. *PVf1* может являться кандидатом на эту роль.

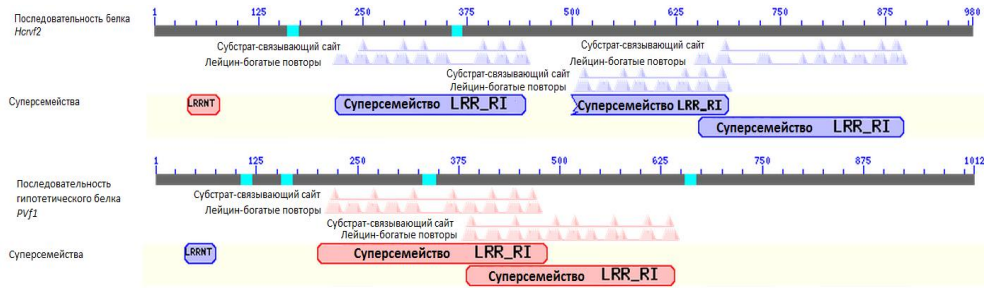


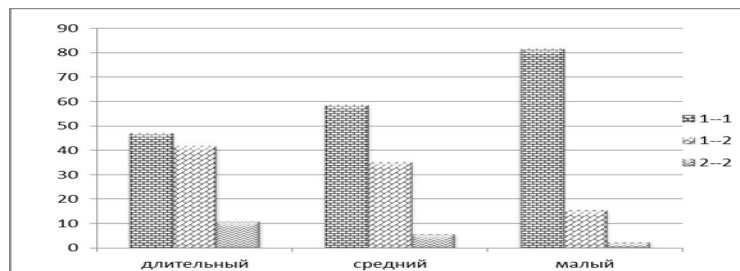
Рисунок 5. – Консервативные домены белка *Hcrvf2* и гипотетического белка *Pvf1*

Опасным заболеванием яблони является мучнистая роса. Один из практически важных генов, определяющих устойчивость яблони к мучнистой росе, *Pl-1*, был обнаружен у трех сортов из 130, взятых для исследования - Чулановка, Долго, Аламата, и видов яблони *M. × cerasifera*, *M. sargentii*, *M. × robusta*, *M. baccata*, которые, согласно фитопатологическим исследованиям, практически не поражаются мучнистой росой. Маркерный аллель к гену *Pl-1* был выявлен у видов и гибридов *M. ioensis*, *M. sieboldii* 25/177, *M. sieboldii* × Спартан 25/170, *M. × cerasifera*, *M. baccata*, *M. sieboldii* 25/175, *M. zumi*, *M. sargentii*, *M. sargentii* × Ренет Симиренко, а также у сортов Red silver и Нора. Ген *Pl-2* представлен у одного из образцов *M. sargentii*. Для его идентификации дополнительно был разработан маркер, расположенный ближе к гену, чем описанные ранее, на расстоянии 4.9 сМ. Он охватывает последовательность гомологов генов устойчивости, относящуюся к NBS-LRR классу. В целом, полученные результаты показывают, что гены устойчивости к мучнистой росе не получили к настоящему времени широкого распространения среди культивируемых сортов, в том числе белорусской и российской селекции. Одной из причин, ограничивающих распространение генов устойчивости к мучнистой росе среди возделываемых сортов яблони, можно считать трудности в их идентификации фитопатологическими методами. Определенная перспектива в этом направлении появилась с разработкой молекулярных методов, которые позволяют идентифицировать конкретный ген на уровне генотипа и проследить за его передачей потомству.

В сортах яблони широко распространен локус *Sd*, обеспечивающий устойчивость к красногалловой яблонной тле. Он встречается в геноме 31 сорта и гибрида яблони из 132. Локус представлен как у старых сортов, известных еще в XIX веке, таких как Папировка, Пепин литовский, Чулановка, так и у сортов современной селекции Беларуси и других стран.

Важным показателем коммерческого успеха сорта является срок хранения плодов. С целью выделения комбинаций аллелей генов *Md-ACS1*, *Md-ACO1* и *Md-Exp7*, влияющих на этот признак, был определен их состав в геноме сортов яблони и сравним со сроками хранения плодов разных сортов. Аллели,

ассоциированные с низким синтезом этилена, были представлены как в сортах с длительным сроком хранения, так и в сортах с коротким или средним сроком хранения (рисунок 6). Отсутствие в сортах яблони аллелей генов *Md-ACS1*, *Md-ACO1* и *Md-Exp7*, ассоциированных с длительным сроком хранения плодов, не означает, что сроки хранения плодов таких сортов будут малыми. Так, в частности, сорта белорусской селекции Имант, Пospех, Надзейны, Вербное, имеющие генотип *Md-ACS1-1/1*, хранятся в соответствующих условиях более 6 месяцев. Очевидно, что длительный срок хранения этих сортов определяется другими факторами, генами или аллелями. В процессе проведенного исследования были обнаружены новые аллели гена *Md-Exp7*. Они встречаются редко, что затрудняет оценку их влияния на признак.



1-1 – генотип *Md-ACS1-1/1*, 1-2 генотип – *Md-ACS1-1/2*, 2-2 генотип – *Md-ACS1-2/2*

Рисунок 6. – Распределение аллелей гена *Md-ACS1* среди сортов яблони с длительным, средним и малым сроком хранения плодов в %

Проведена оценка степени ассоциации аллелей гена *MdMYB1* с признаком окраски кожицы плодов. Показано, что 100% сортов яблони, имеющих темно-красную окраску и среднюю степень проявления окраски несут аллель *MdMYB1-1*, в то время как у 12,5% сортов, имеющих плоды красной окраски и 44,4% яблонь с плодами со слабой красной окраской, аллель *MdMYB1-1* не представлен. Наличие аллеля *MdMYB1-1* в геноме образцов яблони не может гарантировать проявление признака. Для точного прогнозирования проявления этих количественных признаков необходима разработка дополнительных подходов.

Данные о распространении в сортах яблони генов, влияющих на хозяйственно-ценные признаки, были использованы при выделении гибридных сеянцев, устойчивых к болезням. С привлечением доноров гена *Rvi6* были созданы гибридные сеянцы яблони на основе 17 комбинаций скрещивания, где хотя бы один родитель содержал в составе генома ген *Rvi6*. Для отбора гибридных сеянцев яблони был использован комбинированный подход, включающий первоначальный отбор сеянцев на искусственном инфекционном фоне, отбор с помощью молекулярных маркеров к гену и дальнейшее наблюдение за сеянцами на естественном инфекционном фоне. В результате было выделено 934 перспективных сеянцев яблони, из которых 64,4% растений несли доминантный аллель *Rvi6*. и 35,6% растений являлись рецессивными гомозиготами по данному

гену. В семье, полученной от комбинации скрещивания Отава × Надзейны, в которой оба родителя являются носителем гена *Rvi6*, 82,6% гибридных семян несут целевой ген. Большая доля устойчивых семян, в геноме которых не представлен искомым ген, наблюдается в комбинациях скрещивания, где один из родителей представлен высокоустойчивым диким видом яблони или гибридом, полученным с привлечением диких видов. Присутствие гена *Rvi6* обеспечивает высокую устойчивость содержащих его гибридных семян яблони к парше в условиях Беларуси, что было подтверждено данными полевых испытаний в 2007–2011 г. При этом гомозиготные *Rvi6*-содержащие растения обычно более устойчивы, чем гетерозиготные. Некоторые *Rvi6*-содержащие растения могут в разной степени поражаться патогеном. Вариации в реакции устойчивости/восприимчивости, по всей видимости, связаны с присутствием или отсутствием генов-модификаторов.

Так как оба высокоэффективных гена *Rvi6* и *Rvi17* по отдельности преодолеваются определенными расами патогена, мы поставили целью объединить их в одном генотипе, чтобы создать гибридные семена, а впоследствии и сорта яблони, обладающие комплексной устойчивостью к парше. В качестве источника гена *Rvi17* был взят сорт Чаравница. 39,5 % гибридных семян из 5 семей, полученные на его основе, несли маркерный аллель к гену *Rvi17*. Источниками гена *Rvi6* являлись российский сорт Имрус и сорт белорусской селекции Сябрына. Среди семян, у которых были выявлены оба гена (*Rvi17* и *Rvi6*), 8% генотипов проявили исключительно высокую стабильную полевую устойчивость к заболеванию (поражение отсутствовало), 76% анализируемых растений оказались устойчивыми к парше – поражение не более 1 балла (рисунок 7). Данные гибриды представляют собой ценные исходные формы для дальнейшей селекционной работы особенно с учетом того, что в эпифитотийные годы поражение сортов Имрус и Сябрына, используемых в качестве источников гена *Rvi6*, достигало 2 баллов.

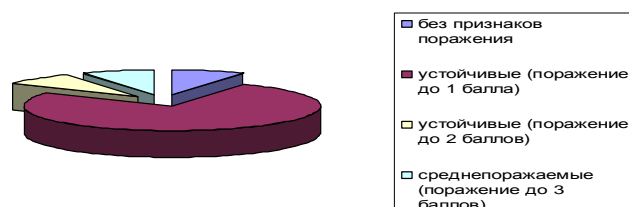


Рисунок 7. – Распределение гибридных семян яблони, содержащих гены *Rvi6* и *Rvi17*, по степени устойчивости к парше в полевых условиях (в %)

Большинство современных сортов яблони в той или иной мере восприимчивы к мучнистой росе. Нами был проведен этап исследования с целью создания источников гена *Pl-1* среди гибридных семян. В 5 комбинациях

скрещивания с источником устойчивости сортом Чулановка получены гибридные сеянцы, 33,3% которых несут ген *Pl-1*. К устойчивым к мучнистой росе генотипам были отнесены 25/175 *M. sieboldii*, S-1-12-20, 19/2 *M. sieboldii*, S-1-28-47, H1255, 21/175, № 34 (от *M. prunifolia*) × BM41497. Среди 10 гибридных семей выделены отдельные образцы, которые несут в составе генома маркерный аллель к гену *Pl-w* (в гибридных семьях № 1 и 4 составляет 28.2 и 35.7% соответственно). Следует отметить, что создание гибридных сеянцев яблони с генами устойчивости к мучнистой росе является важной селекционной задачей, так как эти гены в настоящее время мало представлены среди культивируемых сортов. Включение диких видов яблони, являющихся основными источниками генов устойчивости, в скрещивание приводит к ухудшению качества и размера плодов и требует больших затрат времени для успешного создания новых сортов. Перспективным является направление по созданию коммерческих сортов с привлечением главных генов устойчивости и полигенной устойчивости.

Выявление сортов, содержащих *Sd*-локус, позволило использовать их в качестве доноров устойчивости к красногалловой яблонной тле в скрещивании при создании селекционных образцов. Устойчивые сорта Чулановка, Чаравница, Пинова были вовлечены в различные комбинации скрещивания при получении перспективных сеянцев яблони. Было получено 294 сеянца яблони от 16 гибридных семей, из которых 48.3% содержат *Sd*-локус.

В представленном исследовании стратегия маркер-сопутствующей селекции была использована с целью получения гибридных сеянцев яблони с комплексной устойчивостью к парше, мучнистой росе, бактериальному ожогу, красногалловой яблонной тле, а также выявления генотипов, способствующих увеличению срока хранения яблок. В частности в гибридизацию были включены источники гена *Rvi6* и сорт Чулановка, обладающий не только устойчивостью к мучнистой росе, но и устойчивостью к красногалловой яблонной тле за счет присутствия *Sd*-локуса. Сорт Чулановка передал ген *Pl-1* 36,6% сеянцам из 4 гибридных семей. При этом в гибридной семье *M. sieboldii* 25/184 × Чулановка представлен маркер к другому гену устойчивости к мучнистой росе – *Pl-w*. Источником гена является *M. sieboldii* 25/184. В геноме гибридных сеянцев № 55 и 58 из гибридной семьи *M. sieboldii* 25/184 × Чулановка, удалось объединить гены *Pl-1* и *Pl-w*, что потенциально должно обеспечить им более надежную защиту от поражения мучнистой росой. Среди потомства от представленных комбинаций скрещивания были выявлены гибридные сеянцы, обладающие устойчивостью к парше за счет присутствия гена *Rvi6* (12,2%). При этом два гибридных сеянца содержали также ген *Pl-1*. *Sd*-локус был перенесен из сорта Чулановка в геном 44% гибридных сеянцев яблони. Из них 6 образцов несут маркерный аллель к гену *Pl-1*. В гибридной семье от свободного опыления сорта Чулановка, выделены генотипы, обладающие потенциалом устойчивости как к мучнистой росе, так и

красногалловой яблонной тле и парше, которые могут служить источником комплексной устойчивости в дальнейшем селекционном процессе.

Гибридные сеянцы яблони с комплексной устойчивостью были получены среди потомства сорта Чаравница от 11 комбинаций скрещивания. Выявлены образцы, несущие частично или полностью QTL (Quantitative Trait Loci) устойчивости к бактериальному ожогу. Генотипы распределились в соотношениях: 33,7% образцов унаследовали QTL, и 20,7% образцов без такового. Сорт Чаравница передал ген *Rvi17* 40,1% своих потомков (таблица 6). Из них 14 сеянцев содержат в составе оба высокоэффективных гена устойчивости к парше – *Rvi6* и *Rvi17*. Ген *Sd1* представлен у 46,5% сеянцев. Аллельный состав гена *Md-ACS1* 2/2, соответствующий низкой продукции этилена и хорошей лежкости плодов, выявлен у 12,7% сеянцев в 5 гибридных семьях.

Таблица 6. – Результаты анализа генотипов гибридных сеянцев яблони на присутствие молекулярных маркеров к генам *Rvi6*, *Rvi17*, *Sd1* и аллелей гена *ACS1*, выраженные в %

Гибридная семья	<i>Rvi6</i>	<i>Rvi17</i>	<i>Sd1</i>	<i>Md-ACS1-1/1</i>	<i>Md-ACS1-1/2</i>	<i>Md-ACS1-2/2</i>
1999-2/88-91	-	25,0	25,0	50,0	50,0	-
1999-5/51-53	-	100,0	50,0	100,0	-	-
2001-16/4-69	40,9	36,4	45,5	25,0	50,0	25,0
2001-16/71-84	-	30,8	7,7	76,9	23,1	-
2001-19/61-65	100	50,0	50,0	-	50,0	50,0
2002-6/27-44	37,5	31,3	37,5	50,0	31,3	18,7
2002-31/3 -43	-	38,5	76,9	30,8	69,2	-
2002-35/7-18	16,7	25,0	25,0	50,0	33,3	16,7
2003-44/16-23	-	50,0	75,0	62,5	37,5	-
2004-55/44-81	11,1	55,6	52,8	36,1	58,3	5,6
2006-70/133-137	-	20,0	80,0	80,0	20,0	-
Всего в среднем:	21,0	40,1	46,5	41,4	45,9	12,7

В результате проведенных исследований среди гибридных сеянцев выделены образцы, содержащие в составе генома гены устойчивости к парше *Rvi6* и *Rvi17*, красногалловой яблонной тле *Sd1*, QTL устойчивости к бактериальному ожогу и 2/2 аллели гена *Md-ACS1*, определяющие длительное хранение яблок (рисунок 8). Они являются перспективными для дальнейшей селекционной работы по созданию высокопродуктивных, конкурентоспособных сортов новой генерации. Гены *Rvi6* и *Rvi17*, *Sd1*, *Md-ACS1* и QTL устойчивости к бактериальному ожогу, расположены на разных участках хромосом, не сцеплены

между собой и, соответственно, наследуются независимо. Соответственно, в геномах отдельных гибридных семян представлена разная их комбинация.

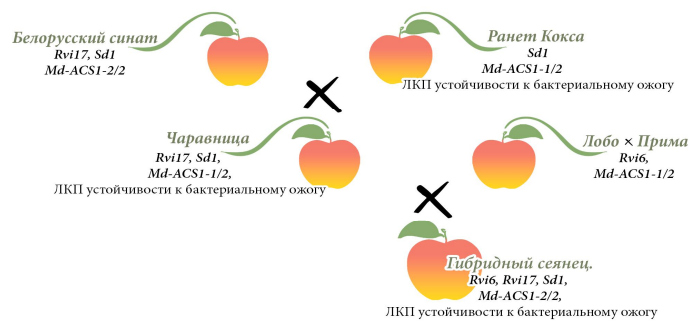


Рисунок 8. – Этапы пирамидизации генов *Rvi6*, *Rvi17*, *Sd1*, *Md-ACS1-2*, ЛКП устойчивости к бактериальному ожогу в геноме гибридных семян яблони

Создание сортов, обладающих устойчивостью к наиболее опасным болезням, является важнейшей задачей. Для ее решения в данном исследовании применен комбинированный подход, объединяющий традиционный этап скрещивания и отбора, и этап отбора с помощью методов маркер-сопутствующей селекции. Сопоставление результатов ДНК-анализа и экспериментальных данных по полевой оценке устойчивости к заболеваниям сортообразцов и гибридных форм яблони позволило получить достоверные результаты относительно присутствия отдельных генов в геноме гибридных семян, значительно сократить сроки создания гибридных форм новой генерации с комплексной устойчивостью к парше, мучнистой росе, бактериальному ожогу, насекомым, лучшим качеством плодов за счет пирамидизации хозяйственно ценных генов в одном генотипе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Метод на основе SSR анализа рекомендован для разработки методов ДНК идентификации сортов плодовых культур. В основу выбора метода идентификации положены критерии эффективности, надежности, стабильности, точности, высокой воспроизводимости, а также удобства документации результатов [1, 2, 3, 5, 6, 25, 27, 28, 29, 44, 45].

2. Виды, сорта и гибриды яблони, выращиваемые в Беларуси, характеризуются высоким генетическим разнообразием аллелей локусов микросателлитных последовательностей ($H_e = 0,84$, $H_0 = 0,67$, $N_e = 6,25$, $F = 0,2$, $A_e = 16,5$). Большой вклад в общее разнообразие аллелей вносят редкие сорта и дикие виды. Сорта белорусской селекции по степени генетического разнообразия не уступают сортам селекции других стран ($A_e = 9,6$, $H_e = 0,79$). Наибольшее

генетическое разнообразие наблюдается среди старинных сортов ($A_e = 10,3$, $H_e = 0,82$) и видов и межвидовых гибридов яблони ($A_e = 12,2$, $H_e = 0,86$). Для уточнения родословных и происхождения сортов яблони рекомендован набор из 20 SSR маркеров, эффективность которого экспериментально обоснована [1, 9, 10, 32, 40, 49, 65].

3. Разработана система ДНК-идентификации генотипов сортов и видов яблони. Метод основан на использовании 6 высокоинформативных SSR маркеров: CH01c06 (PD = 0,9024), CH02b12 (PD = 0,9283), CH02c02b (PD = 0,8701), CH03d12 (PD = 0,9222), SdSSR (PD = 0,9413), CH04h02 (PD = 0,9840). Метод позволяет получить уникальную молекулярно-генетическую формулу генотипов яблони и идентифицировать сорта, межвидовые гибриды и дикие виды яблони. Предложенный метод обеспечивает возможность проверки соответствия сортов яблони критериям отличимости, однородности и стабильности OOC-теста [1, 4, 8, 9, 31, 49, 56, 68].

4. Изменения, приводящие к возникновению клоновых мутантов яблони, могут быть локальны и не затрагивают большую часть генома. Впервые показано, что изменения генома отдельных клоновых мутантов сорта яблони Антоновка обыкновенная являются результатом изменения структуры или локализации ретротранспозонов *Ty3-gypsy* группы. Для идентификации клоновых мутантов рекомендуется применять метод S-SAP анализа со следующими комбинациями праймеров: LTR2 + M13, LTR2 + M15, LTR2 + M24, LTR2 + M53. Показана неэффективность использования наборов из 20 SSR-, 10 ISSR- и 27 RAPD маркеров и их комбинаций для идентификации клоновых мутантов яблони сорта Антоновка обыкновенная [1, 19, 50, 61].

5. Сорта груши, выращиваемые в Беларуси, характеризуются высоким генетическим разнообразием аллелей SSR локусов ($H_e = 0,81$, $H_o = 0,56$, $N_e = 6,49$, $F = 0,31$, $A_e = 12,8$). Показана низкая степень дивергенции сортов, относящихся как к одному, так и к разным видам, или являющихся межвидовыми гибридами. Сорта груши, полученные в результате скрещивания европейских сортов с уссурийской грушей, не выделяются в отдельную группу относительно сортов европейской груши, что говорит о схожести геномов видов *Pyrus*. SSR маркеры, включенные в набор для идентификации генотипов яблони, в геноме груши показывают высокие значения PD: CH01c06 - 0,8740, CH02b12 - 0,9680, CH02c02b - 0,8708, CH03d12 - 0,8956, SdSSR - 0,9345, CH04h02 - 0,7572, что позволяет получить уникальную молекулярно-генетическую формулу образцов груши различного генетического происхождения, выращиваемых в Беларуси, включая межвидовые гибриды, и разработать общий метод идентификации этих культур [1, 14, 36, 48, 53, 58, 68].

6. Среди представителей рода *Prunus* средние значения количества и доли уникальных генотипов составили 11,2 и 0,518 соответственно. Наибольшим

генетическим разнообразием характеризуются сорта сливы домашней ($PD = 0,8106$). В порядке снижения генетического разнообразия расположены слива диплоидная ($PD = 0,7405$), вишня обыкновенная, ($PD = 0,7210$), абрикос ($PD = 0,6727$), черешня ($PD = 0,6549$). Геномы, формирующие полиплоидные виды сливу домашнюю и вишню обыкновенную, генетически близки и имеют слабую дивергенцию нуклеотидных последовательностей, на что указывает количество и размер SSR аллелей. Анализ генетических дистанции, рассчитанных на основе данных о составе 524 SSR аллелей, показывает, что степень внутривидовой дивергенции сортов вишни обыкновенной и черешни меньше, чем сливы домашней, сливы диплоидной и абрикоса. Наибольшее генетическое сходство наблюдается между видами сливы домашней и сливы диплоидной, а также между вишней обыкновенной и черешней. Сорта абрикоса генетически более отдалены от сортов сливы домашней, сливы диплоидной, вишни обыкновенной и черешни. Генетические расстояния между сортами сливы диплоидной, относящимися к разным видам или являющимися межвидовыми гибридами, сходны с внутривидовыми, что указывает на низкую межвидовую дифференциацию диплоидных слив. Они характеризуются большим генетическим разнообразием относительно диплоидных видов - абрикоса и черешни [23, 24, 43, 64].

7. Разработан универсальный метод ДНК-идентификации основных сортов косточковых культур, выращиваемых в Беларуси, основанный на использовании набора из 7 SSR-маркеров (EMPA001, EMPA005, EMPA018, EMPA026, BPPCT025, BPPCT026, BPPCT039). Он позволяет достоверно различить сорта вишни обыкновенной, черешни, сливы домашней, сливы диплоидной, абрикоса, дикие виды и межвидовые гибриды косточковых культур. Метод обеспечивает возможность проверки соответствия сортов критериям отличимости, однородности и стабильности ООС-теста [23, 24, 43, 64].

8. На основе результатов молекулярного анализа, сравнения устойчивости к парше в полевых условиях и анализа родословных выделены источники генов устойчивости к парше *Rvi2*, *Rvi4*, *Rvi5*, *Rvi6*, *Rvi11*, *Rvi15*, *Rvi17* среди видов, гибридов и сортов яблони различного генетического происхождения. Определено, что наиболее эффективными генами на территории Беларуси являются гены *Rvi6* и *Rvi17*. Сорта, содержащие данные гены, демонстрируют высокую стабильную устойчивость к поражению паршой как листьев, так и плодов. Из генома высокоустойчивого к парше сорта груши Память Яковлева выделена последовательность *PVf1*, гомологичная последовательностям кластера генов яблони *HcrVf*, которая может служить кандидатом на роль гена устойчивости. Показано, что гены устойчивости к мучнистой росе *Pl1*, *Pl2*, *Pl-w*, *Pl-d* не получили широкого распространения среди культивируемых сортов. Основными источниками этих генов остаются дикие виды и полученные на их основе гибриды. В геноме как старинных, так и современных сортов яблони широко

распространен *Sd*-локус, определяющий устойчивость к красногалловой яблонной тле [1, 7, 9, 12, 13, 17, 21, 22, 26, 34, 35, 39, 41, 42, 46, 47, 51, 55, 57, 59, 66, 67].

9. У ряда сортов яблони наблюдается связь между отдельными молекулярными маркерами и признаками, контролируемые полигенно, а именно окраской плодов и сроками их хранения. Сопоставление результатов ДНК-анализа и экспериментальных данных по полевой оценке показало, что на формирование данных признаков оказывают влияние дополнительные факторы или гены [1, 18, 20, 53, 60, 62].

10. Выделены гибридные сеянцы яблони различного генетического происхождения, высокоустойчивые к парше. Гибридные сеянцы, несущие ген *Rvi6*, демонстрируют более высокие показатели устойчивости, если они были получены от комбинаций скрещивания, где хотя бы один из родителей характеризуется полигенной устойчивостью к парше. Использование в селекционной работе исходных форм с геном *Rvi17* позволяет получать более 70% устойчивых гибридных потомств. Гибридные сеянцы, полученные от скрещивания источников полигенной устойчивости к парше, и объединяющие в одном генотипе высокоэффективные гены *Rvi6* и *Rvi17*, демонстрируют высокие (поражение отсутствует) показатели устойчивости к парше в полевых условиях. Выделены перспективные гибридные сеянцы яблони, объединяющие в составе генома гены устойчивости к парше *Rvi6* и *Rvi17*, красногалловой яблонной тле *Sd1*, QTL устойчивости к бактериальному ожогу и 2/2 аллели гена *Md-ACS1*, влияющие на длительность хранения плодов. В гибридных семьях, полученных с привлечением межвидовых форм и гибридов, выделены сеянцы, содержащие маркеры к генам устойчивости к парше *Rvi6* и мучнистой росе *Pl-w* одновременно. Среди гибридных семей, полученных от скрещивания сорта Чулановка, идентифицированы сеянцы с генами *Pl-1* и *Pl-w*. В процессе создания гибридных сеянцев яблони с комплексом не сцепленных между собой генов в одном генотипе необходимо учитывать объем выборки, так как он возрастает с увеличением количества генов, которые планируется объединить [1, 11, 15, 17, 34, 37, 38, 52, 63].

Рекомендации по практическому использованию результатов исследования

1. Рекомендуется использовать разработанные методы ДНК-идентификации сортов плодовых культур для охраны авторских прав селекционных учреждений, уточнения родословных сортов, выявления уникальных генотипов в коллекционных садах, при закупке и продаже посадочного материала, установлении сортовой чистоты и сортового соответствия. Методы ДНК-идентификации сортов внедрены в Республиканском центре по генетическому

маркированию и паспортизации растений, животных, микроорганизмов и человека ГНУ "Институт генетики и цитологии НАН Беларуси".

2. Рекомендуются использовать результаты идентификации генов яблони, определяющих устойчивость к парше, для создания исходного селекционного материала с комплексной устойчивостью (акты о практическом использовании от 03 июня 2013 г. и 01 октября 2013 г.).

3. Рекомендуются использовать результаты идентификации генов яблони, определяющих устойчивость к мучнистой росе, для создания исходного селекционного материала и сортов яблони, устойчивых к данному заболеванию (акт о практическом использовании от 11 ноября 2013 г.)

4. Рекомендуются использовать методы ДНК-идентификации генов, влияющих на хозяйственно-ценные признаки яблони, в селекционном процессе для создания исходного селекционного материала и гибридов с комплексной устойчивостью к болезням и вредителям (акт о внедрении от 10 октября 2013 г., акт о внедрении от 3 ноября 2014 г.)

5. Внедрены в учебный процесс и рекомендованы к использованию в селекционном процессе Методические рекомендации по идентификации на основе ДНК-маркеров генов устойчивости к парше яблони и Методические рекомендации по идентификации на основе ДНК-маркеров генов устойчивости к мучнистой росе яблони (УО "Гродненский государственный аграрный университет, акты о внедрении от 24 ноября 2011 г.; Биотехнологическая школа по усовершенствованию специалистов-биотехнологов НААН Украины, акт о внедрении от 3 ноября 2014 г.), материалы монографии (Брянский государственный университет, акт о внедрении от 28 октября 2014 г.).

6. Включены в Государственный реестр информационных ресурсов базы данных "Содержание ПЦР-маркеров к генам устойчивости к парше в геноме сортов и гибридов яблони, выращиваемых в Беларуси", "Молекулярно-генетические паспорта сортов яблони, полученные в результате ДНК идентификации методом SSR-анализа", "Молекулярно-генетические паспорта сортов груши, полученные в результате ДНК идентификации методом SSR-анализа" (РС № 1341303605, 13411303607, 1341303608 от 04 сентября 2013 г.).

7. Подан патент на изобретение "Способ ДНК-идентификации сортов вишни, черешни, сливы домашней, сливы диплоидной, абрикоса" (Регистрационный номер а20140283, от 21 мая 2014 г.).

8. Создан и передан в ГУ "Государственная инспекция по испытанию и охране сортов растений" сорт яблони Паланэз (номер регистрации 201514 от 11.12.2014 г.), устойчивый к комплексу основных заболеваний, с высоким качеством плодов, скороплодный, урожайный.

Список публикаций соискателя ученой степени

Монография

1. **Урбанович, О.Ю.** Молекулярные методы идентификации и генотипирования яблони и груши / **О.Ю. Урбанович** // Минск: Право и экономика, 2013 г. – 210 с. – ISBN 978-985-522-231-8.

Публикации, соответствующие пункту 18 Положения о присуждении ученых степеней и ученых званий в республике Беларусь

2. **Урбанович, О.Ю.** Использование RAPD-метода для анализа генома аллоплазматических линий пшеницы / **О.Ю. Урбанович**, Т.В. Долматович, Н.А. Картель // Доклады НАН Беларуси. – 2002 г. – Т. 46, № 4. – С. 77–81.

3. Попов В.Н. Исследование генетического разнообразия инбредных линий подсолнечника методами RAPD- и изоферментного анализов / В.Н. Попов, **О.Ю. Урбанович**, В.В. Кириченко // Генетика. – 2002. – Т. 38, №7. – С. 937–943.

4. **Урбанович, О.Ю.** ДНК-технологии в растениеводстве – возможности и перспективы / **О.Ю. Урбанович** // Наука и инновации. – 2006. – № 9 (43). – С. 32–36.

5. **Урбанович, О.Ю.** Исследование генетического разнообразия сортов картофеля с помощью SSR-анализа / **О.Ю. Урбанович**, С.В. Малышев, Н.А. Картель // Картофелеводство : сб. науч. тр. / НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству ; редкол.: В.Г. Иванюк (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2008. – Т. 14. – С. 115–123.

6. Молекулярно-генетический анализ аллоплазматических линий пшеницы (*T. aestivum* L.) / **О.Ю. Урбанович**, А.А. Булойчик, Е.А. Волуевич, Н.А. Картель // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук – 2008. – №3. – С. 34–39.

7. **Urbanovich, O.** Identification of scab resistance genes in apple trees by molecular markers / **O. Urbanovich**, Z. Kazlouskaya // Sodininkyste ir darzininkyste. – 2008. – Vol. 27, № 2. – P. 347–357.

8. **Урбанович, О.Ю.** Паспортизация сортов яблони на основе SSR-маркеров / **О.Ю. Урбанович**, З.А. Козловская, Н.А. Картель // Доклады НАН Беларуси. – 2008. – Т. 52, № 5. – С. 93–99.

9. **Urbanovich, O.Y.** Identification of apple tree cultivars growing in Belarus using SSR-markers / **O.Y. Urbanovich**, Z.A. Kazlovskaya // Acta Horticulturae. – 2009. – Vol. 839. – P. 479–486.

10. Анализ полиморфизма SSR-локусов видов *Malus* / **О.Ю. Урбанович**, З.А. Козловская, А.А. Хацкевич, Н.А. Картель // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук.– 2010. – № 1. – С. 12–16.

11. Использование молекулярных маркеров при создании гибридных сеянцев яблони (*Malus x domestica* Borkh) с комплексом хозяйственно-ценных генов / **О.Ю. Урбанович**, З.А. Козловская, Е.А. Заблоцкая, В.В. Васеха, Н.А. Картель // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2010. – № 2. – С. 25–31.
12. **Урбанович, О.Ю.** Технология молекулярных маркеров в селекции яблони на устойчивость к мучнистой росе, определяемой геном *Pl1* / **О.Ю. Урбанович**, З.А. Козловская, Н.А. Картель // Доклады НАН Беларуси. – 2010. – Т.54, № 5. – С. 75–80.
13. **Урбанович, О.Ю.** Распространение генов устойчивости к мучнистой росе в коллекции сортов и видов яблони, выращиваемых в Беларуси / **О.Ю. Урбанович**, З.А. Козловская, Н.А. Картель // Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол.: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2010 г. – Т. 11. – С. 20–25.
14. **Urbanovich, O. Yu.** Polymorphism of SSR Alleles in Pear Cultivars Grown in Belarus / **O. Yu. Urbanovich**, Z. A. Kazlouskaya, O. A. Yakimovich, N. A. Kartel // Russian Journal of Genetics . – 2011. – P. 47, № 3 – P. 349–358.
15. Оценка потенциала устойчивости к парше яблони гибридных потомств *M. sieboldii* и *M. x zumi* / З.А. Козловская З.А., В.В. Васеха, Т.А. Гашенко, **О.Ю. Урбанович** // Плодоводство и ягодоводство России : сб. науч. работ / ВСТИСП РАСХН ; редкол.: И.М. Куликов [и др.]. – Москва, 2011. – Т. XXVIII. – Ч. 1. – С. 282–288.
16. Идентификация гена *Va1* среди сортов и образцов яблони различного генетического происхождения, выращиваемых в Беларуси / **О.Ю. Урбанович**, З.А. Козловская З.А., В.В. Васеха, П.В. Кузмицкая, Н.А. Картель // Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол.: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2011 г. – Т. 12. – С. 56–63.
17. Козловская, З.А. Использование нового гена устойчивости к парше *Rvi17* в селекции яблони в Беларуси / З.А. Козловская, В.В. Васеха, **О.Ю. Урбанович** // Земляробства і ахова раслін. – 2012. – № 1 (80). – С. 74–76.
18. Ассоциация аллеля *MdMYB1-1* с красной окраской кожицы плодов яблони / **О.Ю. Урбанович**, З.А. Козловская, П.В. Кузмицкая, Н.А. Картель // Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол.: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2012 г. – Т. 13. – С. 88–94.
19. Identification of apple sport mutants of 'Antonovka' by molecular methods / **O. Yu. Urbanovich**, P.V. Kuzmitskaya, Z. A. Kazlouskaya, N.A. Kartel // Acta Horticulturae. – 2013. – Vol. 979. – P. 299–303.
20. Аллельный состав генов *MD-ACS1*, *MDAC01* и *MD-EXP7* сортов яблони (*Malus x domestica*) с различным сроком хранения плодов / **О.Ю. Урбанович**,

П.В. Кузмицкая, З.А. Козловская, Н.А. Картель // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2013. – № 3. – С. 47–55.

21. Молекулярные методы в селекции яблони на устойчивость к красногалловой яблонной тле / **О.Ю. Урбанович**, З.А. Козловская, А.А. Хацкевич, Н.А. Картель // Сельскохозяйственная биология. – 2013. – №5. – С. 54–60.

22. ПЦР-основанное клонирование гомолога генов *HcrVf* из генома сорта груши Память Яковлева / **О.Ю. Урбанович**, П.В. Кузмицкая // Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол.: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2013 г. – Т. 16. – С. 55–60.

23. Разнообразие SSR-аллелей сортов вишни обыкновенной (*Prunus cerasus* L.) / **О.Ю. Урбанович**, П.В. Кузмицкая, З.А. Козловская, А.А. Таранов. // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2014. – № 3. – С. 64–69.

24. Исследование генетического разнообразия сортов слив с помощью молекулярных маркеров SSR-типа / **Урбанович О.Ю.**, Кузмицкая П.В., Козловская З.А. // Доклады НАН Беларуси. – 2014. – Т. 58. – № 5. – С. 92–97.

Статьи в других журналах и сборниках научных трудов

25. Создание и анализ SSR-базы данных белорусских сортов пшеницы / С.В. Малышев, **О.Ю. Урбанович**, Т.В. Долматович, Н.А. Картель // Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол.: А.В. Кильчевский [и др.]. – Минск, 2005. – Т.1. – С. 96.

26. Современные молекулярные методы выявления генов устойчивости к патогенам в геноме яблони / **О.Ю. Урбанович**, С.В. Малышев, З.А. Козловская, Н.А. Картель // Плодоводство : науч. тр. / РУП «Институт плодоводства» ; редкол.: В.А. Матвеев (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2006. – Т. 18, ч. 2. – С. 62–67.

27. **Урбанович, О.Ю.** Генотипирование сортов картофеля с помощью SSR-анализа. / **О.Ю. Урбанович**, С.В. Малышев, Н.А. Картель // Факторы экспериментальной эволюции организмов : сб. науч. тр. / Укр. общ. генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова ; редкол.: М.В. Ройка [и др.]. – Киев, 2006. – Т. 3. – С. 137–143.

28. Аналоги генов устойчивости как молекулярные маркеры для идентификации сортов растений / **О.Ю. Урбанович**, С.В. Малышев, Т.В. Долматович, Н.А. Картель // Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол.: А.В. Кильчевский [и др.] – Т. 3. – Минск, 2006. – С. 135–142.

29. Микросателлитный (SSR) анализ белорусских сортов озимой пшеницы / С.В. Малышев, **О.Ю. Урбанович**, Т.В. Долматович, Н.А. Картель // Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр. / Институт генетики и

цитологии НАН Беларуси ; редкол.: А.В. Кильчевский [и др.] – Т. 3. – Минск, 2006. – С. 80–84.

30. **Урбанович, О.Ю.** Использование ДНК-маркеров в селекции и семеноводстве сельскохозяйственных растений / **О.Ю. Урбанович** // Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол.: А.В. Кильчевский [и др.] – Т. 4. – Минск, 2006. – С. 19–31.

31. **Урбанович, О.Ю.** Идентификация сортов яблони с использованием SSR-анализа в Беларуси / **О.Ю. Урбанович, З.А. Козловская, Н.А. Картель** // Плодоводство : науч. тр. / РУП «Институт плодоводства» ; редкол.: В.А. Матвеев (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2007. – Т. 19. – С. 32–39.

32. **Урбанович, О.Ю.** Исследование генетического разнообразия сортов яблони с помощью SSR-анализа / **О.Ю. Урбанович, З.А. Козловская** // Достижения и проблемы генетики, селекции и биотехнологии. VIII съезд, Укр. общ. генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова : сб. науч. тр. НАН Украины, НААН Украины, НАМН Украины / Укр. общ. генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова ; редкол.: В.А. Кунах (гл. ред.) [и др.]. – Киев, 2007. – Т. 2. – С. 297–301.

33. ДНК-маркеры в генетике и селекции растений / Н.А. Картель, С.В. Малышев, **О.Ю. Урбанович, Т.В. Долматович** // Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол.: А.В. Кильчевский [и др.] – Т. 6. – Минск, 2007. – С. 81–91.

34. Результаты отбора гибридных семян яблони на устойчивость к парше фитопатологическими и молекулярными методами / **О.Ю. Урбанович, Т.А. Гашенко, Е.А. Заблоцкая, З.А. Козловская, Н.А. Картель** // Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол.: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2008. – Т. 8. – С. 113–119.

35. Молекулярные маркеры в изучении хозяйственно-ценных признаков сельскохозяйственных культур / Н.А. Картель, С.В. Малышев, **О.Ю. Урбанович, О.Ю., А.А. Хацкевич** // Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол.: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2009. – Т. 9. – С. 19–27.

36. Молекулярные методы паспортизации сортов груши / **О.Ю. Урбанович, А.А. Хацкевич, З.А. Козловская, Н.А. Картель** // Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол.: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2009. – Т. 9. – С. 160–166.

37. Результативность использования исходных форм различного генетического происхождения в селекции яблони на устойчивость к парше / **З.А. Козловская, В.В. Васеха, Т.А. Гашенко, О.Ю. Урбанович** // Плодоводство :

науч. тр. / РУП «Институт плодородства» ; редкол.: В.А. Матвеев (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2009. – Т. 21. – С. 9–17.

38. Сорт яблони Чаравница – источник устойчивости к бактериальному ожогу / **О.Ю. Урбанович**, Козловская З.А., З.А. Козловская З.А., Т.А. Гашенко, В.В. Васеха, Н.А. Картель // Плодородство : науч. тр. / РУП «Институт плодородства» ; редкол.: В.А. Матвеев (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2009. – Т. 21. С. 34–41.

39. Распространение *Sd*-локуса устойчивости к красногалловой яблонной тле среди сортов яблони // **О.Ю. Урбанович**, А.А. Хацкевич, З.А. Козловская, Н.А. Картель // Факторы экспериментальной эволюции организмов : сб. науч. тр. / НАН Украины, УААН, АМН Украины, Укр. общ. генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова ; редкол.: В.А. Кунах (гл. ред.) [и др.]. – Киев, 2009. – Т. 6. – С. 389–394.

40. Исследование генетического разнообразия видов *Malus* с помощью SSR-анализа / **О.Ю. Урбанович**, З.А. Козловская, А.А. Хацкевич, Н.А. Картель // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции / ВИР ; редкол.: Н.И. Дзюбенко [и др.]. – Санкт-Петербург, 2009. – Т. 166. – С. 473–478.

41. **Урбанович, О.Ю.** Распространение гена *Val* в коллекции яблонь, выращиваемых в Беларуси / **О.Ю. Урбанович**, З.А. Козловская, Н.А. Картель // Факторы экспериментальной эволюции организмов : сб. науч. тр. / НАН Украины, НААН Украины, НАМН Украины, Укр. общ. генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова ; В.А. Кунах (гл. ред.) [и др.]. – Киев, 2011. – Т. 10. – С. 338–342.

42. Гомолог генов *HcrVf* семьи яблони из генома груши / **О.Ю. Урбанович**, П.В. Кузмицкая, З.А. Козловская, А.А., Б.Ю. Аношенко // Факторы экспериментальной эволюции организмов : сб. науч. тр. / НАН Украины, НААН Украины, НАМН Украины, Укр. общ. генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова ; В.А. Кунах (гл. ред.) [и др.]. – Киев, 2013. – Т. 12. – С. 318–322.

43. Разработка методов ДНК-идентификации сортов косточковых культур / **О.Ю. Урбанович**, П.В. Кузмицкая, З.А. Козловская, А.А. // Молекулярная диагностика 2014 : сб. трудов VIII всероссийской научно-практической конф. с международным участием / МЗСР РФ ; под ред. В.И. Покровского, – Москва, 2014. – Т. 2. – С. 414–415.

Материалы конференций

44. Popov, V.N. Classification of sunflower inbred lines collection with molecular-genetic markers / V.N. Popov, **O.Yu. Urbanovich**, V.V. Kirichenko // Genetic collections, isogenic and alloplasmic lines : Prosid. International Conf., Novosibirsk, July 30 – August 3, 2001 e. / ICG SB RAS ; edit: Shumni [et. al]. – Novosibirsk, 2001. – P. 206–209.

45. **Урбанович, О.Ю.**, Использование микросателлитных маркеров для характеристики аллоплазматических линий мягкой пшеницы / **О.Ю. Урбанович, А.А. Булойчик А.А., Е.А. Волуевич** // Молекулярная генетика, геномика и биотехнология : материалы Междунар. науч. конф., Минск, 24–26 нояб. 2004 г. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол.: Н.А. Картель [и др.]. – Минск, 2004. – С. 120.

46. **Урбанович, О.Ю.** Распространение гена *Vf* в сортах яблони белорусской селекции / **О.Ю. Урбанович, З.А. Козловская** // От классических методов генетики и селекции к ДНК-технологиям : материалы Междунар. науч. конф., Гомель, 2–5 окт. 2007 г. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол.: А.В. Кильчевский [и др.]. – Минск, 2007. – С. 167.

47. Молекулярные методы в селекции яблони на устойчивость к грибным патогенам / **О.Ю. Урбанович, Е.А. Заблоцкая, З.А. Козловская, Н.А. Картель** // Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты : материалы Междунар. науч. конф., Минск, 3–6 дек. 2008 г. / БГУ ; редкол.: Н.П. Максимова [и др.]. – Минск, 2008. – С. 168–170.

48. **Урбанович, О.Ю.** Оценка генетического разнообразия коллекционных образцов яблони и груши с помощью технологии молекулярных маркеров / **О.Ю. Урбанович, З.А. Козловская, Н.А. Картель** // Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов : материалы Междунар. науч.-практ. конф. и X зоологической конф., Минск, 18–20 нояб. 2009 г. / НАН Беларуси, ГНУ "НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам" ; под ред. М.Е. Никифорова. – Минск, 2009. – С. 367–369.

49. Полиморфизм SSR-аллелей сортов и видов яблони. / **О.Ю. Урбанович, П.В. Кузмицкая, З.А. Козловская, Н.А. Картель** // Развитие научного наследия И.В. Мичурина по генетике и селекции плодовых культур : материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 155-летию со дня рожд. И.В. Мичурина (XXII Мичуринские чтения), Мичуринск, 26–28 окт. 2010 г. / ГНУ ВНИИГиСПР ; под ред. Н.И. Савельева. – Мичуринск, 2010. – С. 33–36.

50. Применение молекулярных методов анализа для идентификации клоновых мутантов яблони сорта Антоновка / **О.Ю. Урбанович, П.В. Кузмицкая, З.А. Козловская, Н.А. Картель** // Генетика и биотехнология на рубеже тысячелетий : материалы Междунар. науч. конф. посвящ. 45-летию основания Института генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, 25–29 окт. 2010 г. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол.: А.В. Кильчевский [и др.] – Минск, 2010. – С. 84.

51. **Урбанович, О.Ю.** Идентификация генов устойчивости к мучнистой росе в геноме яблони с помощью молекулярных маркеров / **О.Ю. Урбанович, Н.А. Картель, З.А. Козловская** // Актуальные проблемы в защите растений :

материалы Междунар. науч.-практ. конф., Горки, 23–25 июня 2010 г. / БГСХА ; гл. ред. А.П. Куделко – Горки, 2010. – С. 30–33.

52. Козловская, З.А. Результативность использования сорта Чаравница – источника гена устойчивости к парше *Rvi17* / З.А. Козловская, В.В. Васеха, **О.Ю. Урбанович** // Теоретические и прикладные аспекты современной фитопатологии и иммунитета растений : матер. Междунар. науч.-практ. конф., Самохваловичи, 13–15 июля 2011 г. / НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству ; редкол.: С.А. Турко [и др.]. – Самохваловичи, 2011. – С. 53.

53. Молекулярные методы в систематизации коллекционного материала груши / **О.Ю. Урбанович**, О.А. Якимович, П.В. Кузмицкая, З.А. Козловская, Н.А. Картель // Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры : материалы Междунар. конф., посвященной 80-летию Центрального ботанического сада НАН Беларуси, Минск, 19–22 июня 2012 г. / НАН Беларуси, ЦБС ; редкол.: В.В. Титок [и др.]. – Минск, 2012. – Ч. 2. – С. 345–347.

54. Аллельный состав гена *Md-Exp7* в геноме сортов яблони с различным сроком хранения плодов / **О.Ю. Урбанович**, П.В. Кузмицкая, З.А. Козловская, Н.А. Картель // Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы : материалы Междунар. науч. конф., Минск, 8–11 окт. 2012 г. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол.: А.В. Кильчевский [и др.] – Минск, 2012. – С. 108.

Тезисы докладов

55. **Urbanovich, O.** Identification of scab resistance genes by molecular markers in apple in Belarus / **O. Urbanovich**, Z. Kazlouskaya // Actualities in plant physiology : Abstracts of Int. scien. conf., Kaunas, Lithuania, 12–13 June, 2008. / Lithuanian Institute of Horticulture, Lithuanian University of Agriculture ; ed.: P.Duchovskis [et al.]. – Kaunas, 2008. – P. 122.

56. **Urbanovich, O.** Using SSR-markers for identification of apple varieties in Belarus / **O. Urbanovich**, Z. Kazlouskaya // Biotechnology of Fruit Species : Abstracts of First Intern. Symp., Dresden, Germany, 1–5 Sept., 2008. / JKI ; ed. M.-V.Hanke. – Dresden, 2008. – P. 97

57. Молекулярные методы в селекции яблони на устойчивость к тле / **О.Ю. Урбанович**, З.А. Козловская, А.А. Хацкевич, Е.А. Заблоцкая, Н.А. Картель // тез. докл. V Съезда Вавиловского Общества генетиков и селекционеров ; Москва, 21–28 июня 2009 г. / Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН ; ред. В.К. Шумный [и др.]. – Москва, 2009. – С.347.

58. **Urbanovich, O.Yu.** SSR-allele polymorphism of pear cultivars growing in Belarus / **O. Yu. Urbanovich**, Z.A. Kazlouskaya, V.A. Yakimovich, N.A. Kartel //

Molecular Phylogenetics: Contributions to the 2nd Moscow International Conference "Molecular Phylogenetics", Moscow, 18–21 May 2010. / MGU ; compiled by A. Troitsky, L. Rusin, V. Aleoshin. – Moscow, 2010. – P. 175.

59. Идентификация генов устойчивости к мучнистой росе в коллекционном материале яблони / **О.Ю. Урбанович**, З.А. Козловская, В.В. Васеха, Н.А. Картель // Современная биотехнология сельскохозяйственных растений и биобезопасность (Геном растений VI) : тез. VI Междунар. конф., Одесса, Украина, 7–10 сентября 2010 г. / ЮБЦР НААН; ред. Ю.М. Сиволап [и др.]. – Одесса, 2010. – С. 64.

60. **Urbanovich, O.Yu.** Allelic diversity of *Md-ACS1*, *Md-ACO1* and *Md-Exp7* genes of apple cultivars (*Malus x domestica* Borkh.) / **O. Yu. Urbanovich**, Z.A. Kazlouskaya, N.A. Kartel // Genomics of Plant Genetic Resources : Abs. 2 International Sym., Bologna, Italy, 24–27 April 2010. / ИПК. – Bologna, 2010. – P. 168.

61. **Urbanovich, O.Yu.** Identification of Apple Sport Mutants of 'Antonovka' by Molecular Methods / **O. Yu. Urbanovich**, P.V Kuzmitskaya, Z.A. Kazlouskaya, N.A. Kartel // Fruit Breeding and Genetics : Abst. XIII Eucarpia Symp., Warsaw, Poland, 11–15 Sept. 2011. / WULS ; ed. com.: K.M. Evana [et al.]. – Warsaw, 2011. – P. 232.

62. The possibility of applying marker MDMYB1-1 as a selection criterion in apple breeding programs / P. Kuzmitskaya, **O. Urbanovich**, Z. Kazlouskaya, V. Vaseha, N. Kartel // Molecular biology: advances and perspectives: Abst. The 4th international IMBG conference for young scientist, Kyiv, 14–17 Sept., 2011. / IMBG. – Kyiv, 2011. – P. 98.

63. Молекулярные маркеры в селекции яблони на устойчивость к парше / **О.Ю. Урбанович**, П.В. Кузмицкая, З.А. Козловская, В.В. Васеха, Н.А. Картель // Идеи Н.И. Вавилова в современном мире : тез. III Вавиловской Междунар. конф., Санкт-Петербург, 6–9 ноября, 2012 г. / ВИР. – Санкт-Петербург, 2012. – С. 114.

64. **Урбанович, О.Ю.** Исследование генетического разнообразия SSR-аллелей косточковых культур / **О.Ю. Урбанович**, П.В. Кузмицкая, З.А. Козловская // тез. докл. VI съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС), Ростов-на-Дону, 15-20 июня 2014 г. / ВОГиС. – Ростов-на-Дону, 2014. – С. 18.

Методические рекомендации

65. Малышев, С.В. Методические рекомендации «Идентификация и паспортизация сортов сельскохозяйственных культур (мягкой пшеницы, картофеля, томата, льна и свеклы) на основе ДНК-маркеров / С.В. Малышев **О.Ю. Урбанович**, Н.А. Картель // Минск: УП Камет, 2006. – 28 с.

66. **Урбанович, О.Ю.** Методические рекомендации по идентификации на основе ДНК-маркеров генов устойчивости к парше яблони / **О.Ю. Урбанович**,

З.А. Козловская, Н.А Картель // Минск: Право и экономика, 2011. – 32 с. – ISBN 978-985-552-021-5.

67. **Урбанович, О.Ю.** Методические рекомендации по идентификации на основе ДНК-маркеров генов устойчивости к мучнистой росе яблони / **О.Ю. Урбанович**, З.А. Козловская, Н.А Картель // Минск: Право и экономика, 2011. – 27 с. – ISBN 978-985-552-024-6.

68. **Урбанович, О.Ю.** Методические рекомендации по идентификации и паспортизации сортов яблони и груши на основе ДНК-маркеров / **О.Ю. Урбанович**, З.А. Козловская, Н.А Картель // Минск: Право и экономика, 2011. – 31 с. – ISBN 978-985-552-005-3.

РЕЗЮМЕ

Урбанович Оксана Юрьевна

Оценка генетического разнообразия генофонда плодовых культур и разработка методов ДНК-идентификации и генотипирования сортов и видов

Ключевые слова: геном яблони, геном груши, ДНК-идентификация, SSR анализ, филогенетические связи, геном косточковых культур, гены устойчивости к болезням и вредителям, маркер-сопутствующая селекция яблони.

Цель работы: целью исследования являлся анализ генетического разнообразия геномов плодовых культур (яблони, груши, вишни обыкновенной, черешни, сливы домашней, сливы диплоидной, абрикоса, а также видов и межвидовых гибридов) и разработка на основе полученных данных методов ДНК-идентификации, генотипирования и маркер сопутствующей селекции для совершенствования селекционного процесса по созданию конкурентоспособных сортов.

Методы исследования: методы RAPD-, ISSR-, RGAP-, SSR-, S-SAP-, SCAR-, CAPS-анализа, клонирования и секвенирования, компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей.

Результаты исследования. Впервые установлены генетические связи сортов, видов и гибридов яблони, груши, сливы диплоидной, сливы домашней, вишни обыкновенной, черешни, абрикоса. Разработаны методы ДНК-идентификации косточковых и семечковых культур на основе SSR-маркеров, которые позволяют проводить проверку соответствия сортов критериям отличимости, однородности и стабильности ООС-теста. Выявлены источники генов устойчивости к ряду болезней и вредителей яблони и разработаны подходы к маркер-сопутствующей селекции. Созданы гибридные сеянцы яблони с комплексом хозяйственно-ценных генов.

Рекомендации по использованию. Методы ДНК-идентификации сортов плодовых культур рекомендуется использовать в селекционном процессе, для охраны авторских прав селекционных учреждений, уточнения родословных сортов, при закупке и продаже посадочного материала, установлении сортовой чистоты и сортового соответствия, в учебном процессе ВУЗов.

Молекулярные методы идентификации хозяйственно-ценных генов и генотипов рекомендуется использовать в селекционном процессе для создания устойчивых к болезням и вредителям сортов яблони, сокращения времени селекционного процесса и повышения его точности.

РЭЗІЮМЭ

Урбановіч Аксана Юр'еўна

Вызначэнне генетычнай разнастайнасці генафонду плодовых культур і распрацоўка метадаў ДНК-ідэнтыфікацыі і генатыпіравання сартоў і відаў

Ключавыя словы: геном яблыні, геном грушы, ДНК-ідэнтыфікацыя, SSR аналіз, філагенетычныя сувязі, геном костачкавых культур, гены ўстойлівасці да хвароб і шкоднікаў, маркер-спадарожная селекцыя яблыні.

Мэта працы: мэтай даследавання з'яўляўся аналіз генетычнай разнастайнасці геномаў плодовых культур (яблыні, грушы, вішні звычайнай, чарэшні, слівы хатняй, слівы дыплоіднай, абрыкоса, а таксама відаў і міжвідавых гібрыдаў) і распрацоўка на аснове атрыманых дадзеных метадаў ДНК-ідэнтыфікацыі, генатыпіравання і маркер спадарожнай селекцыі для ўдасканалення селекцыйнага працэсу па стварэнні канкурэнтаздольных сартоў.

Метады даследавання: метады RAPD-, ISSR-, RGAP-, SSR-, S-SAP-, SCAR-, CAPS-аналізу, кланавання і секвеніравання, камп'ютэрны аналіз нуклеатыдных паслядоўнасцяў.

Вынікі даследавання. Упершыню вызначаны генетычныя сувязі сартоў, відаў і гібрыдаў яблыні, грушы, слівы дыплоіднай, слівы хатняй, вішні звычайнай, чарэшні, абрыкоса. Распрацаваны метады ДНК-ідэнтыфікацыі костачкавых і семечкавых культур на аснове SSR-маркераў, якія дазваляюць праводзіць праверку адпаведнасці сартоў крытэрам адрознення, аднастайнасці і стабільнасці ААС-тэсту. Выяўлены крыніцы генаў устойлівасці да шэрагу хвароб і шкоднікаў яблыні і распрацаваны падыходы да маркер-спадарожнай селекцыі. Створаны гібрыдныя сеянцы яблыні з комплексам гаспадарча-каштоўных генаў.

Рэкамендацыі па выкарыстанню. Метады ДНК-ідэнтыфікацыі сартоў плодовых культур рэкамендуецца выкарыстоўваць у селекцыйным працэсе, для аховы аўтарскіх правоў селекцыйных устаноў, удакладнення радаводных сартоў, пры закупцы і продажы пасадкавага матэрыялу, усталяванні сартавой чысціні і сартавой адпаведнасці, у навучальным працэсе ВНУ.

Малекулярныя метады ідэнтыфікацыі гаспадарча-каштоўных генаў і генатыпаў рэкамендуецца выкарыстоўваць у селекцыйным працэсе для стварэння ўстойлівых да хвароб і шкоднікаў сартоў яблыні, скарачэння часу селекцыйнага працэсу і павышэння яго дакладнасці.

SUMMARY

Urbanovich Oksana Yur'evna

Estimating fruit-farming gene pool diversity and developing methods for DNA identification and genotyping orchard varieties and species

Keywords: apple genome, pear genome, DNA identification, SSR analysis, phylogenetic relationships, stone fruits genome, diseases and pests resistance genes, apple marker-assisted selection.

The aim of the work: the aim of the study was analysis of genetic diversity of the orchard crop genomes (apple, pear, sour cherry, cherry, domestic plum, diploid plum, apricot and their interspecific hybrids) and the development of methods for DNA identification, genotyping and marker assisted selection on the basis of results obtained to improve the breeding process for the creation of competitive varieties.

The methods of the study: RAPD-, ISSR-, RGAP-, SSR-, S-SAP-, SCAR-, CAPS-analysis, DNA cloning and sequencing, computer analysis of the nucleotide sequences.

The results of the study. Genetic relations for varieties, species and hybrids of apple, pear, diploid plum, domestic plum, sour cherry, cherry and apricot were established for the first time. The SSR-marker methods of DNA identification for stone and pome fruit crops were developed, which allow the DUS variety assessment for compliance with the criteria of distinctness, uniformity and stability. The resistance gene sources to a whole number of apple diseases and pests were identified and approaches for marker-assisted selection were developed. The hybrid apple seedlings with a complex of economically important genes were created.

Recommendations for use. The methods of DNA identification for fruit-farming crops are recommended for using in breeding process of orchard crops, variety protection, pedigree clarifying, estimation of variety purity and conformity during purchase and sale of planting material and in higher educational process.

The molecular methods for identification of economically important genes and genotypes are recommended for using in apple breeding process for the creation of disease and pests resistant varieties, reduction of breeding process time and improvement of its accuracy.

Подписано в печать 15.04.2015 Формат 60x84_{1/16} Бумага офсетная

Гарнитура Roman Печать цифровая Усл.печ.л. 2,8 Уч.изд.л. 2,9

Тираж 60 экз. Заказ № 1999

ИООО «Право и экономика» 220072 Минск Сурганова 1, корп. 2

Тел. 284 18 66, 8 029 684 18 66

E-mail: pravo-v@tut.by; pravo642@gmail.com Отпечатано на издательской системе

KONICA MINOLTA в ИООО «Право и экономика»

Свидетельство о государственной регистрации издателя,

изготовителя, распространителя печатных изданий, выданное

Министерством информации Республики Беларусь 17 февраля 2014 г.

в качестве издателя печатных изданий за № 1/185