

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ ИМ. Н. И. ВАВИЛОВА
Российской академии наук

На правах рукописи

Савельева Екатерина Николаевна

**ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ РОДА *MALUS*
MILL. (ЯБЛОНЯ) С ПОМОЩЬЮ ДНК-МАРКЕРОВ**

03.02.07 – генетика

Диссертация на соискание учёной
степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д. б. н., Кудрявцев А. М.

Москва – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1. Род <i>Malus</i> Mill.: биологические особенности объекта исследования.....	9
1.2. Систематика яблони. Происхождение рода <i>Malus</i> , филогения.....	10
1.3. Молекулярно-генетические маркеры, их применение для изучения генетического разнообразия, филогении растений. Маркирование хозяйственно-ценных признаков растений.....	16
1.3.1. Маркеры, основанные на блот-гибридизации.....	17
1.3.2. Молекулярные маркеры, основанные на ПЦР.....	18
1.3.3. Метод, основанный на применении ДНК-чипов. SNP.....	33
1.4. Современное состояние молекулярно-генетических исследований рода <i>Malus</i> Mill.	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	41
2.1. Исходный материал.....	41
2.2. Выделение ДНК образцов яблони.....	57
2.3. Секвенирование и статистический анализ нуклеотидных последовательностей участка ITS1-5.8S ядерного генома.....	57
2.4. Проведение AFLP-, S-SAP-анализа, а также NBS-профайлинг образцов рода <i>Malus</i>	58
2.5. Электрофорез амплифицированных фрагментов ДНК.....	63
2.6. Анализ результатов и статистическая обработка данных.....	64
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	66
3.1. ITS-анализ образцов рода <i>Malus</i> Mill.....	66
3.2. AFLP-анализ образцов рода <i>Malus</i> Mill.....	73
3.3. S-SAP-анализ образцов рода <i>Malus</i> Mill.....	80
3.4. NBS-профайлинг образцов рода <i>Malus</i> Mill.....	93
3.5. Обсуждение полученных результатов	100
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	103

ВЫВОДЫ	104
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	105
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	108
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	109

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Яблоня (*Malus* Mill.) является одной из древнейших плодовых культур. Человек начал выращивать яблоню примерно 4 тысячи лет назад (Cornille *et al.*, 2012; Cornille *et al.*, 2013).

Именно яблоня домашняя (*M. domestica* Borkh.) занимает первое место по объемам мирового производства плодов среди культурных плодовых деревьев во всем мире – более 80 млн. тонн за 2013 год (FAOstat F, 2013). Широкое распространение яблони объясняется многими ценными хозяйственно-биологическими признаками, прежде всего, меньшей требовательностью к условиям произрастания и более высокой адаптивностью по сравнению с другими плодовыми культурами (Ferree *et al.*, 2003).

Род *Malus* очень разнообразен по морфологии, виды представляют собой непростую систему экотипов, форм, вариаций (Li, 1996). Виды рода хорошо совместимы и легко скрещиваются, создавая большое количество межвидовых гибридов (Korban *et al.*, 1986; Hokanson *et al.*, 2001). Среди систематиков до сих пор нет единого мнения по поводу таксономического статуса многих видов рода *Malus*, существующие классификации насчитывают различное количество видов (от 25 до 78), что затрудняет создание коллекций яблони, проведение филогенетических и селекционных работ (Лангенфельд, 1991; Пономаренко, 1992; Robinson *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2002). Уточнение видового состава и генетической структуры рода *Malus* позволит дать более четкую оценку его потенциала для селекции яблони, в частности при поиске новых источников генов устойчивости к различным заболеваниям.

Применение высокоинформативных молекулярно-генетических маркеров для анализа генетического разнообразия рода *Malus* позволяет решить данные проблемы.

На территории Российской Федерации имеются богатые коллекции образцов рода *Malus*. Коллекции Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВНИИР, г. Санкт-Петербург) и Всероссийского научно-исследовательского института генетики и селекции плодовых растений им. И.В. Мичурина (ВНИИГиСПР, г. Мичуринск) включают различные виды, гибриды рода *Malus* и сорта яблони вида *M. domestica*. Данные коллекции играют большую роль не только в сохранении генетического разнообразия рода *Malus*, но и являются важным селекционным ресурсом для создания новых устойчивых к заболеваниям и неблагоприятным условиям среды сортов яблони. В коллекции ВНИИР имеются сорта народной селекции Антоновки. Особое внимание к исследованию этих сортов яблони объясняется наличием у них хозяйственно-ценных признаков, таких как устойчивость ко многим сельскохозяйственным вредителям, болезням, а также устойчивость к низким температурам (Visser *et al.*, 1974; Calenge *et al.*, 2004; Dunemann *et al.*, 2010). Материал данных коллекций в целом хорошо отражает природное разнообразие рода *Malus*, может быть использован для изучения его генетического разнообразия и филогении, а также поиска ценного в селекционном отношении материала.

Степень разработанности темы исследования.

Исследованиям, направленным на изучение генетического разнообразия и филогению рода *Malus*, посвящено множество работ как в отечественной (Forte *et al.*, 2002; Nikiforova *et al.*, 2013), так и международной литературе (Phipps *et al.* 1990; Hokanson *et al.*, 1998; Robinson *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2002; Cornille *et al.*, 2013). Также большую долю занимают исследования, посвященные таксономии и классификации яблони (Rehder, 1940; Лангенфельд, 1991; Барсукова, 2012). В настоящее время геном домашней яблони полностью секвенирован (Velasco *et al.*, 2010), что облегчает его изучение и маркирование молекулярно-генетическими методами. Так как яблоня является ценной плодовой культурой, то большое

количество работ направлено на поиск и идентификацию генов устойчивости к различным заболеваниям яблони и дальнейшем применении результатов в маркер-опосредованной селекции (MAS) (Hemmat *et al.* 1998; Conner *et al.* 1998; Pereira-Lorenzo *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2014).

Целью нашей работы являлось изучение внутривидового и межвидового генетического разнообразия рода *Malus* при помощи различных молекулярных маркеров с последующей оценкой родственных связей и уточнением вопросов филогении и систематики внутри рода, а также установление видовой принадлежности отечественных сортов народной селекции Антоновок. Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Собрать коллекцию образцов яблони, максимально охватив всё разнообразие рода *Malus*.
2. Выделить ДНК из собранных образцов рода *Malus*.
3. Провести секвенирование и дальнейший анализ полиморфизма последовательности района транскрибируемого спейсера ITS1 и гена 5.8S рРНК у образцов *Malus*.
4. Провести AFLP-анализ образцов рода *Malus*.
5. Провести S-SAP-анализ образцов рода *Malus*, включая поиск последовательностей LTR-ретротранспозонов в базах данных, разработку и тестирование праймеров.
6. Провести NBS-профайлинг для анализа внутри- и межвидового полиморфизма последовательностей семейства NBS-LRR генов резистентности (R-генов) к заболеваниям у различных образцов рода *Malus*.
7. Дать рекомендации по использованию различных методов молекулярного маркирования для анализа генетического разнообразия рода *Malus*, выработать рекомендации по использованию образцов яблони, обладающих генами устойчивости к различным заболеваниям, в маркер-опосредованной селекции.

Научная новизна

Впервые было проведено изучение генетического разнообразия образцов рода *Malus* из отечественных коллекций с использованием высокоинформативных молекулярных маркеров (AFLP, S-SAP). Также в ходе работы впервые были секвенированы и проанализированы последовательности района транскрибируемого спейсера ITS1 и гена 5.8S рРНК у образцов рода *Malus* отечественных коллекций. Впервые был проведен анализ генетической variability последовательностей семейства NBS-LRR генов устойчивости у различных видов и сортов яблони домашней рода *Malus* из отечественных коллекций. Уникальные сорта народной селекции Антоновки также были взяты в исследование впервые, ранее молекулярно-генетические методы для их анализа не применялись.

Теоретическая и практическая значимость.

Полученные в результате работы данные о генетическом разнообразии рода *Malus* могут быть использованы для решения проблем систематики и уточнения вопросов филогении видов рода *Malus*. Работа значительно дополняет собой обширно развивающееся направление в области изучения генетической variability рода *Malus*.

Данные, полученные в результате анализа генетической variability последовательностей семейства NBS-LRR генов устойчивости к заболеваниям у различных видов рода *Malus* будут полезны для маркер-опосредованной селекции при выведении новых сортов яблони. Сорта народной селекции Антоновки могут послужить новыми источниками хозяйственно-ценных признаков.

Основные положения, выносимые на защиту:

- генетическое разнообразие образцов рода *Malus* отечественных коллекций на основе анализа полиморфизма последовательности района транскрибируемого спейсера ITS1 и гена 5.8S рРНК.

- генетическое разнообразие образцов рода *Malus* отечественных коллекций на основе AFLP-анализа;
- генетическое разнообразие образцов рода *Malus* отечественных коллекций, основанное на полиморфизме по сайтам интеграции LTR-ретротранспозонов (S-SAP-анализ);
- видовая принадлежность сортов народной селекции Антоновок;
- идентификация при помощи NBS-профайлинга генотипов яблони, обладающих генами устойчивости к заболеваниям, для последующего использования в селекционном процессе.

Все исследования выполнялись соискателем лично или совместно с сотрудниками Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

Степень достоверности и апробация результатов работы.

Промежуточные и итоговые результаты работы были представлены автором на международных конференциях, в том числе на Plant Genetics and Breeding Technologies, Vienna International Plant Conference Association (VIPCA) (Vienna, 2013), XIV International Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics (Bologna, 2015), а так же на VI Съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГИС) (Ростов-на-Дону, 2014).

Материалы исследования были представлены на итоговых годовых сессиях аспирантов ИОГен РАН в 2012 - 2015 годах.

По материалам работы опубликовано пять печатных работ, из них две статьи в изданиях, рецензируемых ВАК.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Род *Malus* Mill.: биологические особенности объекта исследования

Яблоня относится к роду *Malus* Mill. семейства Rosaceae, и вместе с близкородственными плодовыми (*Pyrus*, *Cydonia*, *Aronia*) родами растений образует подсемейство *Maloideae* (Challice *et al.*, 1974; Phipps *et al.*, 1990).

Большинство видов рода *Malus* являются диплоидными ($2n = 34$), хотя встречаются триплоидные виды (например, *M. hupehensis* и *M. coronaria*), или тетраплоидные виды (например, *M. sargentii*), в то время как некоторые виды показывают различный уровень плоидности (Way *et al.*, 1990).

Многие из подобных видов являются апомиктическими, развивающимися без оплодотворения: *M. sikkimensis*, *M. toringoides* (апомикты и триплоиды), *M. sargentii* (апомикт и тетраплоид), и *M. × spectabilis* и *M. baccata* (диплоиды или тетраплоиды, но не апомикты) (Way *et al.*, 1990), а также триплоиды *M. ioensis* и *M. toringo* (Tatum *et al.*, 2005).

Существует две основные гипотезы происхождения хромосом гаплоидного набора рода *Malus*. Первая предполагает, что основное число гаплоидного набора ($n=17$) появилось в результате гибридизации между *Prunoideae* ($n=8$) и *Spiroideae* ($n=9$) (Sax *et al.*, 1931; Derman, 1949; Challice *et al.*, 1973). Вторая гипотеза предполагает, что основное число хромосом, общее внутри семейства Rosaceae ($n=7$), было удвоено, а три хромосомы из этого основного набора были не просто удвоены, а повторены трижды, что дало в результате 17 хромосом гаплоидного набора (Darlington *et al.*, 1930).

Все представители рода *Malus* являются деревьями или кустарниками от 3 до 12 метров в высоту с широкой ветвистой кроной и, как правило, без шипов. Листья очередные, простые, черешковые, слабо зубчатые, пильчатые или лопастные. Плоды не содержат каменистые клетки, или они представлены всего в нескольких видах. Семена от светлокориичневых до

черных, семяздоли плоско-выпуклые. Яблоня вступает в плодоношение на 3-8 год жизни, иногда позже (Ignatov *et al.*, 2011). Большинство видов перекрестноопыляемые, обычно самонесовместимы (Janick *et al.*, 1996). В роде *Malus* самонесовместимость контролируется серией генетических последовательностей, известных как S (самонесовместимость) аллели. Первые 11 S-аллелей были найдены Kobel *и др.* (1954), и в настоящее время известно до 25 подобных аллелей (Juniper *et al.*, 2006).

Культурные сорта яблони размножают большей частью вегетативным путем, так как при половом размножении (семенами) сортовые свойства обычно не передаются потомству. Основным способом размножения яблони является прививка, семенное размножение используется только для выведения новых сортов и при выращивании подвоев для прививок (Урбанович, 2013).

1.2. Систематика яблони. Происхождение рода *Malus*, филогения

Современные естественные классификации выделяют от пяти до шести секций в роде *Malus*.

Необходимо отметить, что среди ботаников до сих пор нет единого мнения по поводу классификации рода *Malus*, это объясняется высоким уровнем межвидовой гибридизации (Hoefler, 2010). На данный момент существуют различные классификации, насчитывающие от 25 до 78 видов яблони, в зависимости от присвоенного ранга таксона и предполагаемого уровня гибридизации (Лангенфельд, 1991; Пономаренко, 1992; Robinson *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2002), отнесенных к пяти или шести секциям *Malus* – *Malus*, *Sorbomalus*, *Gymnomeles*, *Eriolobus*, *Docyniopsis* и *Chloromeles* (Rehder, 1940; Phipps, 1990; Лангенфельд, 1991; Robinson *et al.* 2001; Барсукова, 2012).

До настоящего времени различия по морфологическим признакам, а также эколого-географические характеристики остаются главным критерием в систематике видов яблони (Лангенфельд, 1991).

Кроме того, как было сказано выше, классификации, содержащие большее число видов, могут включать также межвидовые гибриды, так как виды рода хорошо совместимы и легко скрещиваются (Korban, 1986; Nokanson *et al.*, 2001).

Коллекции яблони сохраняются в садах и также в семенном материале (Forsline, 2003). В Китае, являющимся одним из центров происхождения яблони, примерно 80% видов являются исконными, среди них восемь новых видов обнаружено не так давно (Zhou, 1999). Таким образом, эволюционные взаимоотношения внутри рода *Malus* представляют большой интерес для современных молекулярно-генетических исследований.

На данный момент одной из самых распространенных классификаций рода *Malus* является классификация, созданная В. Т. Лангенфельдом (1991), в которой была проведена систематизация видов яблони по морфологическим и эколого-географическим критериям, также автор проводил сопоставление своей работы с классификациями других известных систематиков. В нашей работе будет использоваться классификация рода *Malus* по Лангенфельду (1991) (рис. 1).

Как было сказано выше, выделение видов по секциям в роде *Malus* в основном ведется по морфологическим и эколого-географическим признакам.

Наиболее древние по происхождению яблони представлены видами секций *Eriolobus* и *Docyniopsis* (Лангенфельд, 1991). Например, к древним относится вид *M. sikkimensis*, произрастающий в Восточных Гималаях и горных лесах Сиккима. Его относят к первичным яблоням, так как он сочетает в себе наиболее примитивные признаки из всех ныне существующих видов рода *Malus* (Барсукова, 2012).

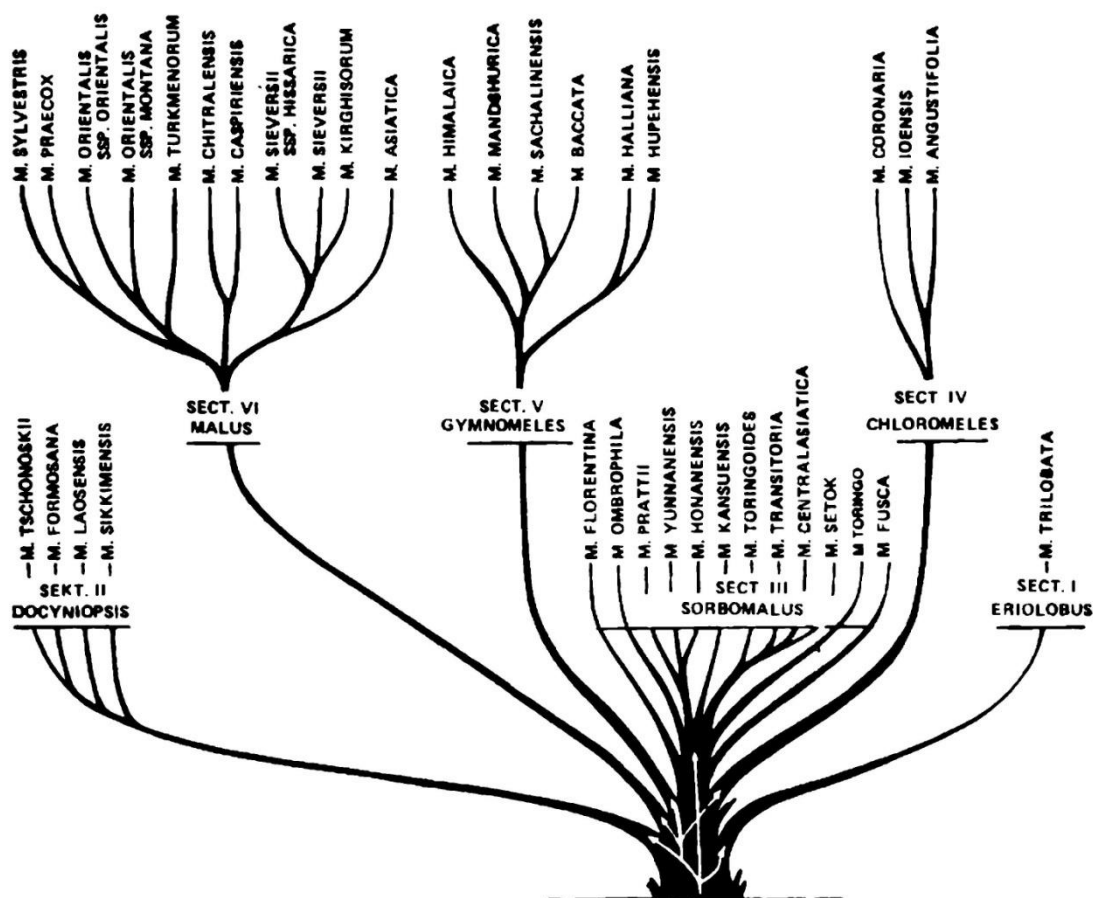


Рис. 1. Схема филогенетических отношений в роде *Malus*
(по Лангенфельду, 1991)

Секция *Sorbomalus* включает примерно 12 простых видов произрастающих на территории Центральной и Восточной Азии. Данные виды сильно отличаются по хозяйственным признакам и устойчивости к патогенам от европейско-азиатского пула, в культуре известны в основном благодаря своим декоративным характеристикам (Барсукова, 2012). Филогенетически секция делится на три ветви – таксономические серии *Yunnanenses*, *Kansuenses* и *Toringonae*. К последней серии относятся и виды *M. sargentii* и *M. sieboldii*, которые Лангенфельд (1991) считает экологически и морфологически обособленными разновидностями вида *M. toringo*. Таксономически к этой секции принадлежит также вид *M. fusca*, который произрастает на территории Северной Америки (Барсукова, 2012).

Отдельно необходимо отметить вид *M. florentina* - яблоня флорентийская, которая в диком виде распространена в Северной Италии, встречается в Югославии (Барсукова, 2012). Происхождение и филогенетическое положение вида до сих пор не выяснено, многие авторы говорят о происхождении *M. floribunda* Sieb. как гибрида между видами рода *Malus* и *Sorbus*. Phipps *et al.* (1990) выделяет вид *M. florentina* в отдельную секцию *Florentinae*. Cheng *et al.* (2001) описал вид *M. florentina* как китайский вид, также выделяя его в новую секцию *Florentinae*, однако точного описания секции не приводит. Лангенфельд (1991) относит данный вид к секции *Sorbomalus*. Однако, недавние исследования показали значительную разницу геномов между этим видом и видами секции *Sorbomalus*, что делает невозможным включение *M. florentina* в данную секцию (Robinson *et al.* 2001; Forte *et al.*, 2002).

К секции *Chloromeles* относятся яблони Северной Америки, исторически произрастающие в Центральном и Восточном штатах США и на юге Канады (*M. ioensis*, *M. coronaria*). Это особая ветвь эволюции яблони в Северной Америке, имевшая здесь широкое распространение. Данные яблони приспособились к распространению семян с помощью наземных животных (Лангенфельд, 1991).

К секции *Gymnomeles* относятся примерно шесть простых видов современных ягодных яблонь (*M. himalaica*, *M. mandshurica*, *M. sachalinensis*, *M. baccata*, *M. halliana*, *M. hupehensis*). Ареал произрастания видов секции - Восточная Сибирь, Приморье, Северный Китай, Монголия, Тибет и Гималаи. (Лангенфельд, 1991; Барсукова, 2012).

Типичная секция рода – настоящие яблони *Malus* - включает виды Евразийского происхождения наиболее близкие к культурной яблоне. Систематика этой секции наименее однозначна. Лангенфельд (1991) выделяет шесть истинных видов *M. asiatica*, *M. sieversii*, *M. orientalis*, *M. caspiensis*, *M. chitralensis*, *M. sylvestris*, а также группу культурных сортов

вида *M. domestica* Borkh. Другие авторы дают видовой статус яблоням, которые Лангенфельд (1991) считает подвидами или даже формами вышеуказанных видов. Это виды *M. turkmenorum* (Барсукова, 2012) - *M. orientalis* ss. *turkmenorum* (Лангенфельд, 1991); *M. niedzwetskyana* (Phipps *et al.*, 1990; Барсукова, 2012) - *M. sieversii* f. *niedzwetzkyana* (Лангенфельд, 1991). Кроме того, наличие множества систематик рода *Malus* вносит дополнительную неоднозначность. Например, видовое название *M. pumila* в той или иной систематике имели практически все виды данной секции, за исключением домашней яблони. Н. И. Вавилов (1951), описывая центры происхождения культурных растений, называл *M. pumila* самостоятельным дикорастущим видом. Однако на данный момент существует другая точка зрения, так, известный русский ботаник В. В. Пономаренко (1992) не считает *M. pumila* самостоятельным видом.

До сих пор не много известно о месте и времени происхождения и одомашнивания яблони (Cornille *et al.*, 2012). Одомашниванием называется процесс увеличения созависимости между растениями и животными, с одной стороны, и человеческим обществом с другой (Diamond *et al.* 1997; Zeder *et al.*, 2006). Понимание процесса одомашнивания дает представление общих механизмов адаптации и истории человеческой цивилизации, но также может направлять современные программы селекции на улучшение сельскохозяйственных культур или видов в дальнейшем (Feuillet *et al.*, 2008; Brown *et al.* 2009). В настоящее время биномиальное название *Malus* × *domestica* Borkh. принято в качестве основного научного термина для яблони домашней (Korban *et al.*, 1984).

Наиболее вероятным основным предком домашней яблони *M. domestica* является вид *M. sieversii*, что подтверждается не только сравнением по морфологическим признакам, но и исследованиями последовательностей ДНК двух видов (Watkins, 1995; Zhou *et al.*, 2000; Robinson *et al.*, 2001; Forte *et al.*, 2002; Harris *et al.*, 2002, Cornille *et al.*, 2012). Еще Н.И. Вавилов

определил Центральную Азию, в том числе и современную территорию Тянь-Шаня на границе с Казахстаном, Узбекистаном, Киргизией и Китаем в качестве центра происхождения яблони (Vavilov, 1930). Популяции вида *M. sieversii* в дикой природе встречаются в горных областях Тянь-Шаня в Центральной Азии (Zhang *et al.*, 2015). Кроме того, в формирование генома яблони домашней внесли вклад и другие виды яблони: *M. sylvestris*, *M. baccata*, *M. orientalis*, *M. mandshurica*, *M. × prunifolia* (Pereira-Lorenzo *et al.*, 2009, Cornille *et al.*, 2012). Так, по данным Nikiforova *et al.* (2013) и Cornille *et al.* (2013), большую часть хлоропластного генома домашняя яблоня *M. domestica* получила именно от дикого вида *M. sylvestris*. Было показано, что вид *M. sylvestris* мог быть вовлеченным в формирование генома многих европейских сортов яблони в Испании, Франции, Англии (Cornille *et al.*, 2012). Однако, в соответствии с некоторыми результатами исследований, вид *M. sylvestris* не может являться предковым для яблони домашней *M. domestica* (Wagner *et al.* 2000; Gross *et al.* 2014).

Многие хозяйственно-ценные признаки сортов вида *M. domestica* были получены от других видов яблони. Например, ген устойчивости к парше был получен при скрещивании с видом *M. × floribunda* (Kellerhals, 2009).

Процесс одомашнивания яблони шёл рука об руку с развитием цивилизаций человечества и был подробно описан Morgan *et al.* (1993). Например, существуют свидетельства еще начала эпохи неолита о сборе плодов яблони (Juniper *et al.*, 1999).

Выращивание яблони как плодовой культуры увеличилось с распространением метода черенкования, а также с открытием методов прививки (Morgan *et al.*, 1993). Еще древние греки были знакомы с методом черенкования яблони, что было описано Теофрастом в третьем веке до нашей эры (Ferree *et al.*, 2003). Клональное размножение генотипов оказало продолжительный эффект на производство яблок, так как позволило выращивать яблони в садах и предоставило садоводам возможность самим

выбирать наиболее подходящие сорта яблони. Даже сейчас в общем производстве яблок преобладают такие старинные сорта, как McIntosh (1800), Джонатан (1820), Cox's Orange Pippin (1830s), Granny Smith (1860), Delicious (1870), Golden Delicious (1890) и Braeburn (1940-е годы), которые в основном выбраны из случайных сеянцев более 100 лет тому назад. Примерно в этот период яблоня домашняя достигла всех уголков мира, в том числе при помощи эмигрантов из Старого Света, которые перевезли яблоню на новую родину в Северную Америку (Gardiner *et al.*, 2007).

Как было отмечено выше, гибридизация и интрогрессия играли важную роль в процессе создания сортов яблони домашней. Таким образом, для исследований, направленных на определение ранних истоков яблони домашней, необходимо использовать самые древние сорта яблони (Harris *et al.*, 2002).

1.3. Молекулярно-генетические маркеры, их применение для изучения генетического разнообразия, филогении растений.

Маркирование хозяйственно-ценных признаков растений

Генетическое разнообразие представляет собой важный компонент генетической характеристики популяции, группы популяций или вида. Оценка генетического разнообразия важна при мониторинге генетической изменчивости как в диких, так и в сельскохозяйственных видах и популяциях растений и животных; на основе получаемой генетической информации разрабатывают стратегию их сохранения и рационального использования (Abdel-Mawgood, 2011). Изучение генетического разнообразия основывается на морфологических, биохимических и молекулярных маркерах (Mohammadi *et al.*, 2003; Sudre *et al.*, 2007; Goncalves *et al.*, 2009).

Молекулярные маркеры представляют собой генетические маркеры, анализируемые на уровне ДНК. К ним применимы термины классической генетики, такие, как локус, аллель, доминантный и кодоминантный тип

наследования. Аллели маркерных локусов представляют собой различные формы (нуклеотидные последовательности, отличающиеся по длине и/или по нуклеотидным заменам) одного и того же маркера, расположенные в одинаковых участках (локусах) гомологичных хромосом. Если метод анализа маркера позволяет выявлять оба аллеля, говорят о кодминантном типе наследования данного маркера, если выявляется только один аллель – о доминантном наследовании (Хлесткина, 2011).

Молекулярные маркеры имеют значительные преимущества по сравнению с другими методами исследования, так как они более надежны, информативны, достоверны и воспроизводимы, к тому же, факторы окружающей среды не оказывают влияния на полученный результат по молекулярным методам анализа. (Binneck *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2004; Saker *et al.*, 2005; Goncalves *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2008).

Молекулярные маркеры основаны на полиморфизме последовательностей ДНК, возникающим в результате мутаций ДНК – таких, как замена оснований, перестройка (вставка или делеция нуклеотидов), или ошибок репликации ДНК и появления повтора (Bretting *et al.*, 1995). Много маркеров, связанных с моногенными признаками (главным образом устойчивостью к патогенам и вредителям), были найдены и для видов рода *Malus* (Guilford *et al.*, 1997; Oraguzie *et al.*, 2001).

Таким образом, в настоящее время молекулярно-генетические маркеры активно используются для решения различных вопросов, связанных с определением видовой принадлежности, выяснения степени родства различных групп организмов, их генетического полиморфизма и филогении, а также в практических целях для обнаружения того или иного полезного признака.

1.3.1. Маркеры, основанные на блот-гибридизации

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов, ПДРФ) – метод, основанный на расщеплении ДНК эндонуклеазами рестрикции с помощью так называемой «блот-гибридизации» (Календарь *и др.*, 2002) и последующей детекцией специфических нуклеотидных последовательностей в геномной ДНК. Знания последовательности ДНК не требуется, метод не основан на ПЦР – получаемые фрагменты наследуются кодоминантно. Данный метод был предложен Southern (1975) и нашел широкое применение для оценки генетической variability растений, маркирования генов.

RFLP используют для маркирования генов устойчивости яблони к различным болезням. Так, Roche *et al.* (1997) использовал три RFLP-маркера для локализации гена устойчивости к тле (*Sd₁*) у яблони. Данная работа была первой по маркированию гена устойчивости к тле у плодовых.

Две различные хромосомные локализации генов устойчивости картофеля к вирусу X (PVX) при помощи RFLP-анализа были найдены у двух популяций картофеля (Ritter, 1991).

Yamazaki (1994) оценил генетическое сходство четырех видов рода *Glycyrrhiza* (солодка) при помощи RFLP- и RAPD-маркеров. Результаты показали, что виды *G. glabra* и *G. uralensis*, богатые глицирризином, более близки друг к другу, чем к *G. echinata* или *G. pallidiflora*.

Miller (1990) изучил генетическую variability рода *Lycopersicon* (томат) при помощи RFLP-анализа и выявил, что генетическое разнообразие среди данных видов между популяциями гораздо выше, чем внутри популяций. Генетическая variability среди самосовместимых видов оказалась выше, чем среди самонесовместимых.

1.3.2. Молекулярные маркеры, основанные на ПЦР

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) была открыта в 1983 г. Кэрри Б. Мюллисом, за что автор был удостоен Нобелевской премии (Дубина, 2011).

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР, PCR) предполагает использование специфических праймеров и получение дискретных ДНК-продуктов амплификации отдельных участков геномной ДНК (Mullis *et al.*, 1987; Булат *и др.*, 1992; Глазко, 2000). Впервые ПЦР был осуществлена в 1985 г. фирмой Cetus, а последующее использование термостабильной ДНК-полимеразы в ПЦР существенно расширило возможности ее применения (Mullis *et al.*, 1986).

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, произвольно амплифицируемая полиморфная ДНК) (Williams *et al.*, 1990) – один из методов анализа ДНК. Широко используется для определения генетического полиморфизма по всему геному в растениях. Маркеры обычно наследуются доминантно. Преимущества метода – простота и скорость, он не требует знания последовательности ДНК, не требует большого количества матрицы, недорог и может быть автоматизирован (Gostimsky *et al.*, 2005). Основной проблемой этого метода является его чувствительность к изменениям условий реакции (буфер, полимеразы и концентрация компонентов реакции) и даже характеристик амплификатора (Календарь *и др.*, 2002). Недостаток метода – фрагменты одной длины могут иметь разную природу. RAPD-метод можно использовать для поиска молекулярных маркеров, сцепленных с селективно важным геном, для изучения генетического разнообразия на различных культурах. Так, Tartarini (1996) провел идентификацию пяти RAPD-маркеров, сцепленных с геном устойчивости к парше (*Vf*) у яблони. Из них маркеры OPAM19₂₂₀₀ и OPAL07₅₈₀ оказались наиболее тесно сцепленными с геном *Vf*.

Koller *et al.* (1993) провел дифференцировку 11 сортов яблони с использованием RAPD-маркеров с целью выявления наиболее подходящего и выгодного с коммерческой точки зрения маркера.

Dunemann *et al.* (2004) изучил генетическое разнообразие 18 образцов диких видов и 27 сортов яблони при помощи 29 RAPD-маркеров. Высокий

уровень полиморфизма наблюдался как на межвидовом, так и внутривидовом уровнях.

Определено фенетическое сходство между несколькими сортами груши (*P. communis* и *P. pyrifolia*) и генотипами *P. cordata*, *P. bourgaeana* и *P. pyrastrerwere* при помощи RAPD-маркеров (Oliveira *et al.*, 1999). Данное исследование было первой попыткой фенетической классификации рода *Pyrus* (груша), основанной на ДНК-маркировании. Кластерный анализ показал группировку образцов рода *Pyrus* в соответствии с их географическим распространением.

Vierling *et al.* (1992) изучал генетическое разнообразие двух видов диплоидных пшениц (*Triticum monococcum* и *Triticum urartu*) при помощи RAPD-маркеров. UPGMA-анализ полученных данных выявил более высокое сходство среди образцов *T. monococcum*, чем среди образцов вида *T. urartu*.

ISSR (Inter Simple Sequence Repeats, анализ полиморфных участков ДНК, амплифицированных между простыми повторяющимися последовательностями - микросателлитами) (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

Выявляемый полиморфизм с помощью ISSR, как правило, выше и более четко воспроизводим, чем с помощью RAPD (Глазко *и др.*, 1999). Как и RAPD, ISSR не требует предварительного клонирования и секвенирования фрагментов для подбора праймеров. К основным свойствам метода относятся доминантный тип наследования, относительно высокая точность и улучшенная воспроизводимость по сравнению с RAPD в связи с большей длиной праймера и более высокой температурой отжига (Goulão *et al.*, 2001).

Однако, локализация продуктов амплификации в геноме, также как и их функция, остаются неизвестными, но предполагается их относительно равномерное распределение по длине генома (Календарь *и др.*, 2002).

Blair *et al.* (1999) использовал ISSR для анализа частоты микросателлитных последовательностей и для оценки генетического разнообразия 59 образцов культурного риса (*Oryza sativa* L.). Данный тип

маркерного анализа показал высокий уровень внутривидового полиморфизма. По результатам исследований метод ISSR был рекомендован для дифференциации генотипов подвидов культурного риса *Japonica* или *Indica*.

Также метод ISSR применялся для изучения генетического разнообразия и идентификации 16 генотипов ячменя (*H. vulgare* L.) из различных стран в комбинации с RAPD-маркерами (Fernández *et al.*, 2002). Полученная в результате кластерного анализа дендрограмма показала высокий уровень дифференциации образцов.

SSR (Simple Sequence Repeats, SSRs, микросателлитные последовательности ДНК) - это одна из наиболее информативных ДНК-систем молекулярного маркирования.

Микросателлитные последовательности распространены повсеместно в ДНК высших растений. Они были обнаружены у 34 видов. Средняя частота встречаемости на ДНК – каждые 50 килобаз. Обследование баз данных для 54 видов растений показало, что среди SSR последовательностей в геноме ядра преобладают ди-, три- и тетрануклеотидные повторы (Diwan *et al.*, 1997). Источник полиморфизма этих последовательностей – в сайт-специфическом варьировании длины повтора, что в свою очередь обусловлено различием в числе единиц повтора. SSR-маркеры стабильны в соматических клетках, их наследование носит кодоминантный характер, распределены по всему геному (Дубина, 2011). Микросателлиты высоко полиморфны, так как эволюционируют быстрее, чем остальная ДНК, что делает их перспективными молекулярными маркерами (Nguyen *et al.*, 2005; Paniego *et al.*, 2005).

SSR-метод включает в себя проведение ПЦР с фланкирующими праймерами к короткому мини- и микросателлитному повтору и позволяет выявлять маркеры с кодоминантным наследованием и, соответственно, удобен для выявления гетерозигот по данному локусу (Календарь *и др.*, 2002).

Метод SSR применялся при изучении генетического разнообразия многих сельскохозяйственных культур. Так, Struss *et al.* (1998) изучили генетическое разнообразие ячменя (*Hordeum vulgare*) при помощи 15 высокополиморфных микросателлитных маркеров. Все использованные SSR-маркеры показали в среднем высокий уровень генетического разнообразия (0,64-0,88).

Была дана оценка генетическому разнообразию и популяционной структуре 370 образцов из core-коллекции цитрусовых (США) (Barkley *et al.*, 2006). Популяционный анализ выявил наличие пяти популяций цитрусовых в коллекции, кроме того, возникла гипотеза, что только несколько видов цитрусовых являются естественными, остальные виды имеют гибридное происхождение.

Dirlewanger *et al.* (2002) разработали 41 микросателлитный маркер для персика *Prunus persica* (L.). Далее маркеры были применены для изучения генетического разнообразия персика и черешни (*Prunus avium*L.). Только 13 SSR-маркеров выявили полиморфизм как на персике, так и на черешне. 19 SSR-маркеров оказались полиморфными только для персика, и только один – для черешни.

Manifesto *et al.* (2000) провели оценку генетического разнообразия 105 образцов аргентинской пшеницы (*Triticum aestivum* L.), полученных за 1932 – 1992 года, при помощи 10 высокополиморфных SSR-маркеров. Полученные данные показали, что аргентинская пшеница сохранила относительно постоянный уровень генетического разнообразия в течение последнего полувека.

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, полиморфизм длин амплифицированных фрагментов). Метод детекции полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (AFLP) разрабатывался в середине 90-х гг. и представляет собой комбинирование PCR и RFLP-методов (Vos *et al.*, 1995). Он основан на избирательной амплификации фрагментов, получаемых

при рестрикции геномной ДНК. Для постановки AFLP-анализа не требуется знания последовательности ДНК изучаемых объектов. Маркеры наследуются доминантно, удобны для построения генетических карт (Maliepaard *et al.*, 1998), для изучения генетического разнообразия (Goulão *et al.*, 2001; Venturi *et al.*, 2006) и для маркирования генов устойчивости яблони к различным болезням (Xu *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2001).

В качестве ДНК-матрицы здесь используются рестрицированные фрагменты, лигированные с адаптерными последовательностями. При этом праймер с одной стороны частично комплементарен сайту рестрикции, а с другой – структуре адаптера, а также обычно содержит дополнительно селективные 1-3 нуклеотида на 3' конце (рис.2). Несмотря на некоторую техническую сложность, этот метод получил широкое распространение, так как позволяет определять генетические изменения, вызванные точечными мутациями в сайтах рестрикции или делециями / инсерциями внутри рестрицированного фрагмента (Vos *et al.*, 1995).

Данная маркерная система является доминантной, хотя некоторые специалисты и отстаивают возможность идентификации гетерозигот.

На практике AFLP-метод использовался для анализа генетического полиморфизма и эволюционных отношений между современными сортами табака (*Nicotiana tabacum* L.) и дикими видами (Ren *et al.*, 2001). Показано также, что применение AFLP-технологии, в качестве высокоинформативного ДНК-фингерпринта, эффективно для изучения эволюции и филогении растений рода *Solanum* (McGregor *et al.*, 2000; Spooner *et al.*, 2005).

AFLP-маркеры были использованы в анализе меж- и внутриспецифичных различий 22 природных популяций 13 видов рода *Berberis* (барбарис) произрастающих в Патагонии (Аргентина), с возможностью выявления полиплоидных комплексов (Bottini *et al.*, 2002).

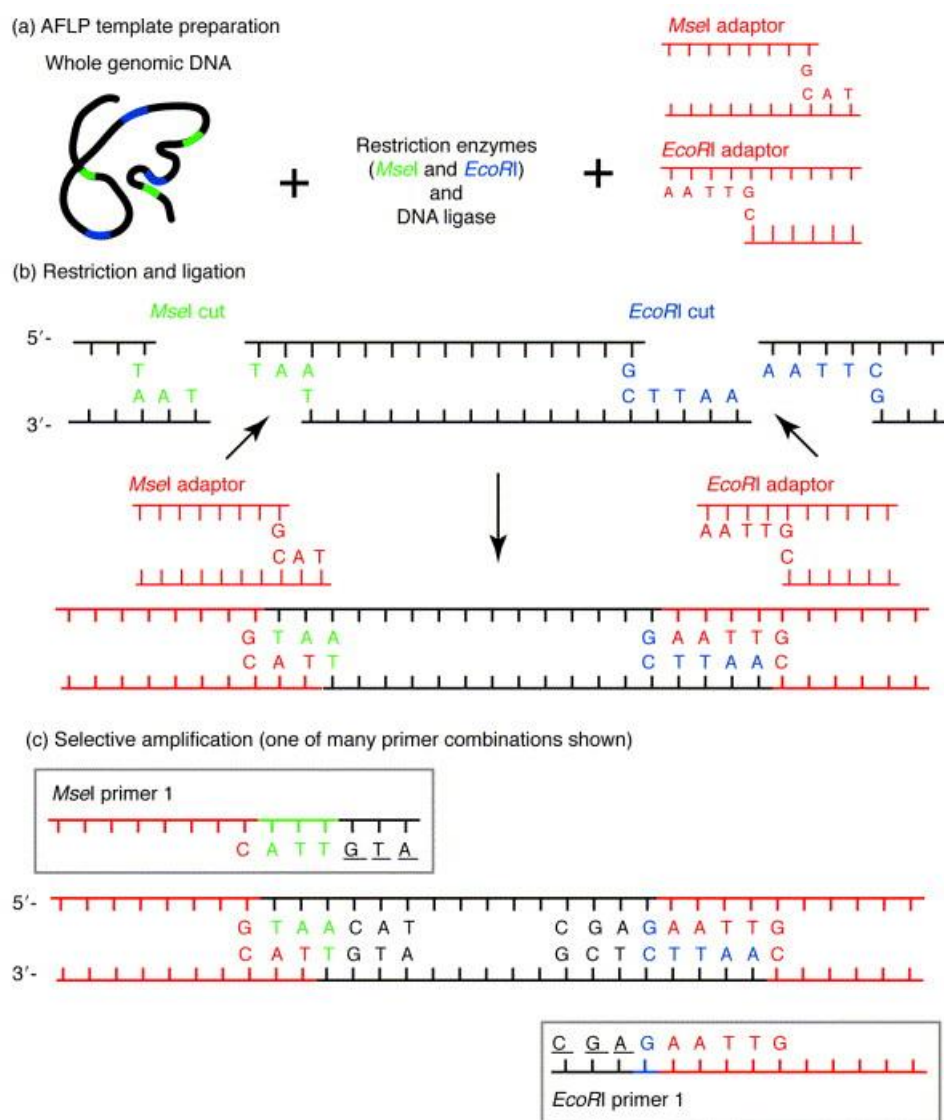


Рис.2. Схема проведения AFLP-маркирования (по Mueller *et al.*, 1999) (описание в тексте)

Метод AFLP был применен для изучения генетического разнообразия пяти видов рода *Prunus* (*P. cerasifera*, *P. domestica*, *P. insititia*, *P. spinosa*, and *P. fruticans*), произрастающих в Европе (Derupere *et al.* 2009).

В Китае десять видов груши, род *Pyrus*, были проанализированы при помощи AFLP-маркеров, уровень полиморфизма составил 79,2% (Shenghua *et al.*, 2001).

AFLP маркеры вместе с SSR и SNP-маркерами были использованы при построении генетической карты цикория (*Cichorium intybus* L. var. *sativum*).

Данная генетическая карта покрыла примерно 84 % генома цикория (Muys *et al.*, 2014).

ДНК-фингерпринт на основе ретротранспозонов.

Одним из наиболее перспективных типов генетических методов для решения вопросов изучения генетического разнообразия растений является маркеры на основе LTR-ретротранспозонов (Waugh *et al.*, 1997; Ellis *et al.*, 1998; Porceddu *et al.*, 2002; Tam *et al.*, 2005; Konovalov *et al.*, 2010; Melnikova *et al.*, 2012; Jiao *et al.*, 2014). Известно, что мобильные генетические элементы, в первую очередь LTR-ретротранспозоны, являются обязательным компонентом геномов растений (Velasco *et al.*, 2010) (рис. 3). У некоторых видов LTR-ретротранспозоны составляют более 70% всей нуклеотидной протяженности генома (Kumar *et al.*, 1999; Wicker *et al.*, 2007), поскольку репликативный способ перемещения позволяет накапливать большое количество копий элемента, таким образом, увеличивая размер генома растения (SanMiguel *et al.*, 1996; Pearce *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 1999).

Транспозонные инсерции являются устойчивыми в течение миллионов лет (Schulman *et al.*, 2004; Vitte *et al.*, 2004). Молекулярные маркеры, базирующиеся на ретротранспозонах, демонстрируют большую информативность, чем другие маркеры (Pearce *et al.*, 1999).

S-SAP (Sequence-specific amplification polymorphism, полиморфизм амплификации специфических последовательностей). Самым процессивным на сегодняшний день методом анализа полиморфизма сайтов встраивания ретротранспозонов является S-SAP (Waugh *et al.*, 1997, Schulman *et al.*, 2004). Этот метод является модификацией метода AFLP. Он основан на разрезании геномной ДНК эндонуклеазами рестрикции и создании основы для амплификации – между ретротранспозонами и адаптерами, которые лигируются с фрагментами рестрикции (рис. 3). Но чувствительность используемых эндонуклеаз рестрикции к метилированию ДНК-субстрата

может дать ложные результаты генотипирования, что стоит учитывать при проведении эксперимента.

К достоинствам метода можно отнести высокий уровень полиморфизма и хорошую, стабильную воспроизводимость спектров продуктов амплификации. Полиморфизм, выявляемый S-SAP, выше, чем при использовании других методов на тех же исследуемых образцах (Ellis *et al.* 1998; Berenyi *et al.* 2002; Syed *et al.* 2005; Tam *et al.* 2005; Lou *et al.*, 2007; Melnikova *et al.*, 2012).

Однако, для анализа полиморфизма необходимо знать последовательность ДНК применяемого ретротранспозона, или хотя бы последовательность его LTR.

В течение последнего десятилетия S-SAP-маркеры были успешно использованы для изучения многих сельскохозяйственных культур. Так, Waugh *et al.* (1997) дали оценку генетического полиморфизма ячменя на основе S-SAP-маркеров к LTR-ретротранспозону *BARE-1-like*.

Ellis *et al.* (1998) провели S-SAP-анализ 15 культурных сортов и 56 образцов дикого гороха (*Pisum*) на основе *Ty1-copia* LTR-ретротранспозона *PDR1*. Данные маркеры оказались более информативными, чем AFLP- или RFLP-маркеры, использованные ранее. Кластерный анализ выявил три главные группы в роде *Pisum*: *P. fulvum*, *P. abyssinicum* и все остальные виды рода *Pisum*. Все современные виды формировали собственный кластер.

Tam *et al.* (2005) сравнил результаты исследования генетического разнообразия томата и перца на основе S-SAP-, AFLP- и SSR-маркирования. S-SAP-метод оказался наиболее информативным анализом генетического разнообразия по сравнению с двумя другими, был рекомендован для изучения генетической вариабельности других представителей рода *Solanaceae*.

Konovalov *et al.* (2010) применили S-SAP-маркеры на основе *BARE-1* и *Jeli* ретротранспозонов для оценки филогенетических отношений диплоидных пшениц. Более высокая транспозиционная активность *Jeli* была связана с процессом видообразования *T. urartu*, в то время как *BARE-1* давал больше полиморфных инсерций, возникавших в процессе дальнейшей внутривидовой дифференциации. Таким образом, было установлено, что каждый ретротранспозон обеспечивает более информативные маркеры на соответствующем уровне филогенетических отношений.

He *et al.* (2012) успешно разработали семь новых S-SAP-маркеров на основе инсерционного полиморфизма LTR-ретротранспозона *FaRE1* земляники (*Fragaria × ananassa* Duch.). Филогенетический анализ показал, что генетический коэффициент у исследуемых образцов варьировался от 0.67 до 1.00. Результаты данного исследования показали, что разработанные S-SAP-маркеры выявили высокий уровень внутривидового полиморфизма в землянике.

IRAP (Inter-retrotransposon-amplified-polymorphism, полиморфизм амплифицированных последовательностей между ретротранспозонами). Данный метод обнаруживает инсерционный полиморфизм при помощи амплификации фрагментов ДНК между ретротранспозонами (Kalendar *et al.*, 1999; Kalendar *et al.*, 2006). Преимущество метода заключается в его простоте выполнения, включает проведение реакции ПЦР с последующим разделением фрагментов на электрофоретическом геле. IRAP может быть выполнен при наличии одного праймера, комплементарного к 5' или 3' концу LTR-ретротранспозона, но направленного от самого LTR, либо могут использоваться два праймера (рис. 3) (Kalendar *et al.*, 2010).

Метод IRAP имеет высокую разрешающую способность, дает результаты, стабильно воспроизводимые в различных лабораториях, характеризуется высоким уровнем стандартизации, как набора маркеров, так и техники выполнения анализа, и поддается автоматизации (Kalendar *et al.*, 2011).

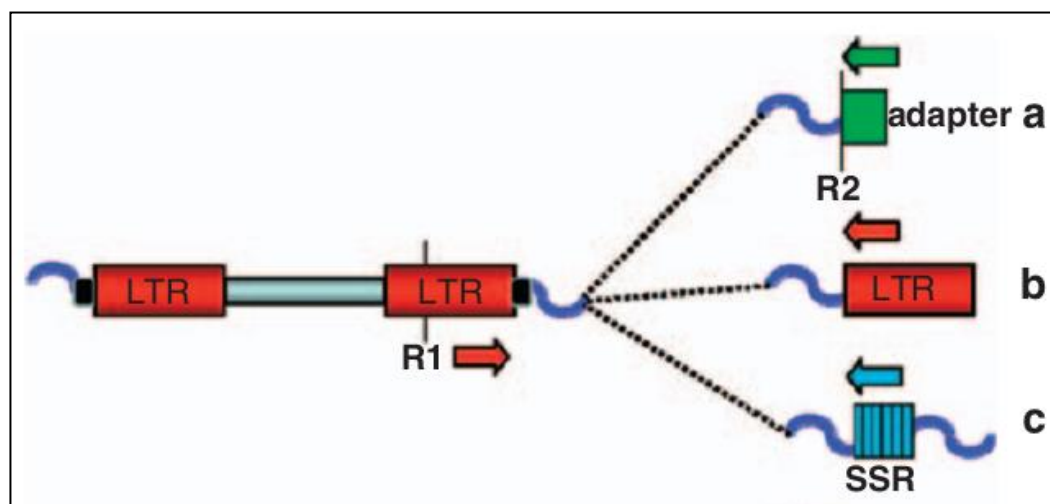


Рис. 3. Методы выявления полиморфизма на основе ретротранспозонов: SSAP, IRAP, REMAP (Kalendar *et al.*, 2011). (a) SSAP метод. Амплифицируется геномная ДНК, обработанная эндонуклеазами рестрикции (R1 и R2), с помощью двух праймеров (показаны стрелками) – к адаптеру (adapter), пришитому к сайту рестрикции R2, и обычно к LTR ретротранспозона; (b) IRAP метод. Амплифицируется участок между двумя сайтами посадки праймеров, оба из которых находятся на ретротранспозонах; (c) REMAP метод. Амплификация происходит между микросателлитом (SSR) и ретротранспозоном с использованием двух праймеров – к проксимальной части микросателлита и к ретротранспозону

REMAP (Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism). Данный метод впервые описан как метод ДНК «отпечатков» для ячменя. ПЦР проходит между праймером к фрагменту LTR ретротранспозона и праймером рядом расположенного простого микросателлитного повтора (SSR-праймер). В данном случае позиция амплифицируемого фрагмента ретротранспозона «заякоривается» путем использования праймера к микросателлитному локусу. В REMAP применяют варианты LTR-праймеров как для 5'-, так и для 3'-конца LTR, как и в IRAP (рис. 3) (Дубина *и др.*, 2011). К достоинствам

метода относятся относительная простота и потенциально большое количество комбинаций праймеров из различных ретротранспозонов и микросателлитов (REMAP) (Powell *et al.*, 1996).

Методы IRAP и REMAP были разработаны Kalendar *et al.* (1999) на основе инсерционного полиморфизма LTR-ретротранспозона ячменя *BARE-1*. Оба метода были использованы при изучении генетического разнообразия ячменя (*Hordeum vulgare*) и показали высокий уровень как внутривидового, так и межвидового полиморфизма.

NBS-профайлинг.

Растения зачастую используют механизм защиты, основанный на узнавании белком гена устойчивости специфичного авирулентного белка гена, обусловленного патогеном (модель ген-на-ген) (Flor, 1971; Keen, 1990).

Несколько десятков генов устойчивости растений были клонированы и секвенированы в течение последнего десятилетия (Hammond-Kosack *et al.*, 2003). Анализ последовательностей данных генов показал, что они являются высоко консервативными среди различных видов растений (Dangl *et al.*, 2001; Hammond-Kosack *et al.*, 2003).

Большинство охарактеризованных в настоящее время генов устойчивости являются членами семейства R-генов, содержащих нуклеотид-связывающий домен (nucleotide binding site, NBS) и домен, содержащий обогащенный лейцином повтор (leucine rich repeat, LRR) (Van der Linden *et al.*, 2004).

NBS-домен, входящий в состав R-генов и аналогов генов устойчивости (RGAs), имеет несколько высоко консервативных последовательностей. Это Р-петля (фосфат-связывающий сайт), киназный мотив и GLPL-мотив (Saraste *et al.* 1990; Traut, 1994; Meyers *et al.* 1999). Эти последовательности были широко использованы для клонирования NBS-региона для ряда видов, в основном, при помощи амплификации последовательности между двумя

мотивами с помощью вырожденных праймеров (Aarts *et al.* 1998; Collins *et al.* 1998; Leister *et al.* 1998; Shen *et al.* 1998; Mago *et al.* 1999; Deng *et al.* 2000; Noir *et al.* 2001; Vicente *et al.*, 2001).

RGAs часто расположены рядом с основными/главными генами устойчивости или локусами генов количественных признаков (QTL) (Speulman *et al.* 1998; Geffroy *et al.* 2000; Gebhardt *et al.*, 2001). Таким образом, они могут обеспечить интересные кандидаты в гены устойчивости, а также полезные молекулярные маркеры для маркер-опосредованной селекции (MAS). Они также дают информацию об организации и эволюции генов устойчивости, а также аналогов генов устойчивости (RGSs) в геномах растений (Grube *et al.* 2000; Pan *et al.* 2000; Bai *et al.* 2003; Meyers *et al.* 2003).

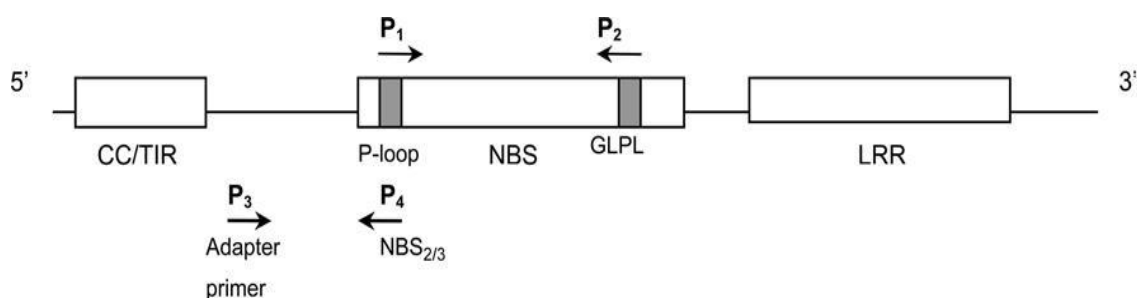


Рис. 4. Схематическое изображение структуры последовательностей нуклеотид-связывающего сайта (NBS) и обогащенного лейцином повтора (LRR). Экзоны представлены прямоугольниками, интроны представлены линиями между ними (экзоны и интроны не масштабированы). Затемненные прямоугольники обозначают консервативные мотивы/последовательности внутри NBS-кодирующего региона. Стрелки указывают позиции и направления двух различных наборов праймеров: P1 и P2 представляют праймеры, используемые, как правило, для амплификации NBS-кодирующих последовательностей; они предназначены для амплификации ДНК внутри NBS-кодирующей области. Праймеры P3 и P4 были разработаны для амплификации последовательности ДНК за пределами области NBS-кодирования, по направлению к 5'-концу последовательности ДНК (Calenge *et al.*, 2005)

Секвенирование геномов модельных растений позволило начать изучение RGA-генов однодольных и двудольных растений, в том числе *Arabidopsis thaliana* (Meyers *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2007), *Brassica rapa* (Mun

et al., 2009), *Carica papaya* (Ming *et al.*, 2008; Porter *et al.*, 2009), *Cucumis sativus* (Huang *et al.*, 2009), *Glycine max* (Schmutz *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2012), *Zea mays* (Schnable *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2012), *Medicago truncatula* (Ameline-Torregrosa *et al.*, 2008), *Oryza sativa* (Zhou *et al.*, 2004; Monosi *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 2005), *Populus trichocarpa* (Kohler *et al.*, 2008), *Sorghum bicolor* (Paterson *et al.*, 2009), *Vitis vinifera* (Velasco *et al.*, 2007; Jaillon *et al.*, 2007; Malacarne *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2008), *Brachypodium distachyon* (Li *et al.*, 2010; Vogel *et al.*, 2010), *Solanum tuberosum* (Xu *et al.*, 2011), и *Solanum lycopersicum* (Andolfo *et al.*, 2013).

В настоящее время разработан метод NBS-профайлинга (NBS-profiling), который воспроизводит большое количество R-генов устойчивости и кандидатов в гены устойчивости RGAs, дает оценку генетической вариабельности этих генов, таким образом, обеспечивая молекулярные маркеры, тесно сцепленные с R-генами и RGAs. NBS-профайлинг основан на амплификации фрагментов при помощи ПЦР от консервативных мотивов NBS к сайтам рестрикции (рис. 5). В результате получают фрагменты, большинство из которых связано с NBS содержащими R-генами или RGAs. Данный подход является универсальным и может быть применен для изучения широкого спектра сельскохозяйственных культур без изменений (Calenge *et al.*, 2005).

Brugmans *et al.* (2008) использовали метод NBS-профайлинга для маркирования RGAs в геноме картофеля. В общей сложности, 34 локуса RGAs было найдено, из них только 13 содержали последовательности, гомологичные тем RGAs, которые были обнаружены в геноме томата. Также была дана оценка генетической вариабельности образцов картофеля по генам устойчивости.

Mantovani *et al.* (2006) изучили генетическое разнообразие генов устойчивости 58 образцов твердой пшеницы с помощью NBS-профайлинга. В общей сложности, 96 маркеров из 190 показали хороший уровень

дифференцировки образцов (индекс полиморфизма колебался от 0.30 до 0.50). Полученные данные оказались близки к результатам по SSR- и AFLP-маркированию на том же наборе образцов, например, генетические расстояния различались незначительно ($r = 0.73$ и 0.76 , соответственно). Метод NBS-профайлинга был рекомендован для дальнейшего изучения генетического разнообразия твердых пшениц.

ITS spacer.

В настоящее время одним из наиболее популярных методов филогенетических исследований растений является изучение последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров рибосомальных генов (ITS - internal transcribed spacer) (Матвеева *и др.*, 2011). Рибосомальные гены представляют собой единый кластер ядерных генов, организованный в виде тандемно расположенных повторов. Каждый кластер рибосомальных генов состоит из транскрибируемой области (гены 18S, 5.8S и 26S рРНК), внутренних транскрибируемых спейсеров, расположенных по обе стороны от 5.8S рРНК (ITS1 и ITS2), и фланкирующих внешних транскрибируемых спейсеров — (ETS1 и ETS2) (рис. 5) (Alper *et al.*, 2011).

Одной из важных характеристик ITS-спейсеров является их высокая внутривидовая консервативность, но значительная вариабельность между видами, поэтому последовательность ITS-спейсера используют для филогенетических и биогеографических исследований (Baldwin *et al.*, 1995; Alvarez *et al.*, 2003).

В настоящее время последовательность ITS-спейсера широко используются для классификации растений на разных таксономических уровнях (родовом, видовом и подвидовом) в качестве филогенетического маркера (Feliner *et al.*, 2007). Помимо этого, ITS могут быть использованы и на более высоком уровне систематического анализа (Schultz *et al.*, 2006).

Тем не менее, у данного метода, столь удобного для филогенетических исследований, есть недостатки. Последовательности ITS могут варьировать

по длине и по количеству вставок и делеций. В пределах одного генома возможно присутствие паралогов, которые могут появляться в результате неполной согласованной эволюции (Burckler *et al.*, 1997; Alvarez *et al.*, 2003).

Таким образом, возможно наличие внутривидового или даже внутриорганизменного полиморфизма. Как правило, преобладает какой-либо один тип, тем не менее, в ряде случаев было выявлено присутствие нескольких функциональных копий (Rapini *et al.*, 2006).

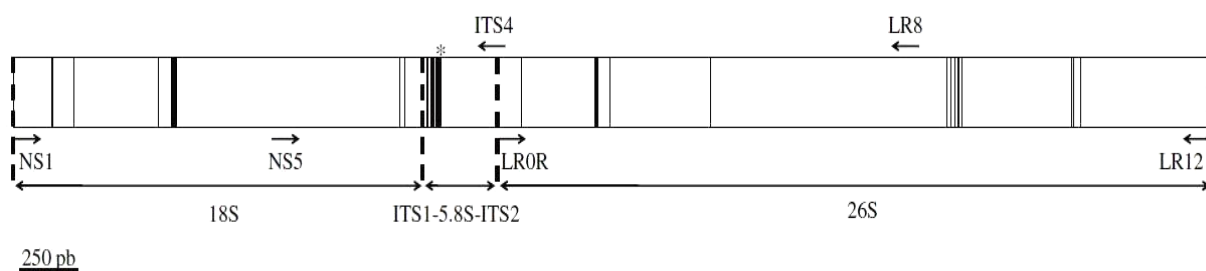


Рис. 5. Расположение универсальных праймеров (обозначено стрелками), используемых для ПЦР-амплификации рДНК и расположение полиморфных сайтов (вертикальные штриховые линии), находящиеся на участке 18S – ITS1 - 5.8S - ITS2 - 26S последовательности (5126 п.н.) вида *Geotrichum candidum*. Индель обозначена звездочкой (*) (Alper *et al.*, 2011)

Помимо этого, последовательности ITS характеризуются более высоким уровнем гомоплазии по сравнению с низкокопийными генами (Матвеева *и др.*, 2011). В некоторых случаях последовательности ITS могут оказаться недостаточно информативными для филогенетических исследований (Alvarez *et al.*, 2003; Матвеева *и др.*, 2011).

Несмотря на это, последовательности ITS в настоящее время являются одними из самых востребованных маркеров для изучения филогении растений (Матвеева *и др.*, 2011).

1.3.3. Метод, основанный на применении ДНК-чипов. SNP

SNP (Single-nucleotide polymorphism – однонуклеотидный полиморфизм) представляют собой сайты в геноме, где последовательность

ДНК отличается одним нуклеотидом при сравнении двух или более образцов (Wang *et al.*, 1998). Они могут отвечать за конкретные признаки или фенотипы, или могут представлять нейтральный вариант, который является полезным для оценки полиморфизма в контексте эволюции (Abdel-Mawgood, 2012). SNPs на данный момент являются наиболее распространенным типом вариаций в последовательности генома, которые обнаружены до сих пор; примерно 90% всех вариабельных последовательности в геноме человека различаются однонуклеотидными заменами ДНК (Collins *et al.*, 1998).

Метод SNP в качестве молекулярных маркеров используют такие дисциплины, как популяционная экология и сохранение видов, эволюционная генетика, так как SNP многочисленны, стабильны, их потенциально легче обнаружить, чем микросателлиты; также метод SNP использовался при генетическом картировании генома человека (Cargill *et al.*, 1999). Как правило, SNP являются наиболее многочисленной формой генетической изменчивости в геномах эукариот, более того, они встречаются как в кодирующих, так и в некодирующих областях ядерной и пластидной ДНК (Kwok *et al.*, 1996).

SNP широко используются в селекционных программах, таких как маркер опосредованная селекция, QTL картирование, позиционное клонирование, анализ гаплотипа и родословных, тестирование чистоты семян, идентификация генетического разнообразия (Xu *et al.*, 2008; Moose *et al.*, 2008; Bernardo, 2008; Jannink *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010; McCouch *et al.*, 2010).

Хотя SNP обладают рядом преимуществ по сравнению с другими молекулярными маркерами, существуют ограничения применения данного типа маркирования на не модельных организмах. Это связано с расходами, и техническими трудностями, связанными при выявлении SNP в настоящее время (Seddon *et al.*, 2005).

1.4. Современное состояние молекулярно-генетических исследований рода *Malus* Mill.

Род *Malus* очень разнообразен по морфологии в природе, виды представляют собой непростую систему экотипов, форм, вариаций (Yunong, 1996). Генетическая природа таксона в основном изучена лишь на основе анализа небольшого ограниченного числа фенотипических признаков и физиологических свойств, и в настоящее время нет исчерпывающих данных о происхождении многих видов. По мнению некоторых систематиков, список видов рода *Malus* должен быть сокращен, так как описанные ранее виды на самом деле являются разновидностями. Критический пересмотр всего видового состава рода яблони позволит более четко представлять потенциал рода *Malus* с целью полного использования его в селекции (Forte *et al.*, 2002).

В связи с этим, применение методов молекулярного анализа ДНК имеет огромное значение изучения генетического разнообразия яблони на межвидовом и внутривидовом уровнях, а также уточнения филогенетических отношений между видами.

В настоящее время геном домашней яблони полностью секвенирован (Velasco *et al.*, 2010), что облегчает его изучение и маркирование молекулярно-генетическими методами.

Основные направления молекулярных исследований яблони в настоящее время сводятся к следующим: создание генетических карт на основе молекулярных маркеров (Fernandez-Fernandez *et al.*, 2012; Weeden *et al.*, 1994); изучение генетического разнообразия (Guilford *et al.*, 1997; Nokanson *et al.*, 1998; Jiao *et al.*, 2014; Perazzolli *et al.*, 2014), идентификация сортов (Ye *et al.*, 2006) и установление филогенетических отношений между различными сортами и видами яблони (Landry *et al.*, 1994; Pereira-Lorenzo *et al.*, 2007; Cornille *et al.*, 2012), многие из которых являются донорами ценных признаков; а также идентификация генов, контролирующих хозяйственно-

важные признаки, и поиск и создание маркеров для их исследования (например, ген компактной формы кроны яблони (*Co*) (Hemmat *et al.*, 1997) и гены устойчивости к различным вредителям.

Большинство молекулярных исследований яблони нацелено на идентификацию генетических маркеров для выявления различных генов устойчивости к сельскохозяйственным вредителям и болезням яблони (Bus *et al.*, 2005). Данные, полученные в результате подобных исследований, применяются для маркер-опосредованной селекции (MAS) при выведении новых, более устойчивых к болезням и неблагоприятным условиям среды сортов яблони, обладающих ценными вкусовыми свойствами. Картирование генов устойчивости/генных локусов устойчивости показывает, что они часто сцеплены (Hemmat *et al.* 2003; Bus *et al.* 2005) или формируют часть генного кластера (Vinatzer *et al.* 2001; Xu *et al.*, 2002).

Ранее были проведены исследования по устойчивости яблони к парше, вызываемой *Venturia inaequalis* (Boone *et al.*, 1957; Williams *et al.*, 1957; Bagga *et al.*, 1968), устойчивости к заражению ржавчиной *Gymnosporangium juniperi virginianae* (McNew, 1938; Niederhauser *et al.*, 1940; Aldwinckle, 1975), устойчивости к тле *Eriosoma lanigerum* (Giliomee *et al.* 1968; Sandanayaka *et al.* 2003).

RFLP-маркеры являлись первой ДНК-маркерной системой, использованной для идентификации и характеристики сортов яблони, подвоев и сеянцев (Nybom *et al.*, 1990; Watillon *et al.* 1991). Ishikawa *et al.* (1992) использовал систему RFLP маркеров для обнаружения полиморфизма хлоропластной и митохондриальной ДНК среди 18 сортов яблони и трех подвоев.

Conner *et al.* (1997) применил RAPD-маркеры для построения генетических карт трех культурных сортов яблони (*Malus × domestica* Borkh.: Wijcik McIntosh, NY 75441-67 и NY 75441-58). Карты содержали RAPD-маркеры, а также шесть изоферментных локусов и четыре маркера

морфологических признаков (R_f - окрас плода, V_f - устойчивость к парше, Co – колоновидный тип роста, Ma – кислый вкус плода). Генетическая карта для Wijcik McIntosh содержала 238 маркеров, расположенных в 19 группах сцепления, 1206 сМ. Генетическая карта для сорта NY 75441-67 содержала 110 маркеров в 16 группах сцепления, и для сорта NY 75441-58 генетическая карта содержала 183 маркера в 18 группах сцепления. Среднее расстояние между маркерами составляло ≈ 5.0 сМ.

Hemmat *et al.* (1998) идентифицировал RAPD-маркеры, тесно сцепленные с геном устойчивости к парше (V_f) у яблони (*Malus*). В результате на основе данных маркеров, а также изоферментного локуса *Pgm-1*, была построена сцепленная карта V_f -региона.

Также Conner *et al.* (1998) использовал RAPD для оценки положения и эффекта QTL, влияющих на ювенильный рост и развитие дерева, и обнаружили, что признаки могли различаться в связи с положением доминантного гена колоновидности *Co*.

Khadivi-Khub *et al.* (2013) изучил генетическое разнообразие 23 местных генотипов яблони с использованием одиннадцати RAPD- и четырех сpRFLP-маркеров. Уровень полиморфизма при анализе RAPD составил 68.14 %. Уровень генетического сходства между изученными генотипами яблони колебался от 0,38 до 0,72. Кластерный анализ выявил генетическое разнообразие, а также высокую внутривидовую изменчивость иранских генотипов яблони.

Goulão *et al.* (2001) использовал ISSR-маркеры для изучения генетического разнообразия 41 сорта яблони домашней *M. domestica*. Уровень полиморфизма составил 89,1%. Полученные данные сравнили с предыдущими исследованиями яблони (AFLP, RAPD, SSR).

В роде *Malus* ядерная ДНК наследуется от обоих родителей, а цитоплазматическая ДНК (хлоропластная и митохондриальная ДНК) наследуется по материнской линии (Hu *et al.* 2008). Таким образом,

хлоропластный геном позволяет получать данные об эволюционных взаимоотношениях по материнской линии, в то время как ядерная ДНК предоставляет независимые данные о наследовании от обоих родителей (Nikiforova *et al.*, 2013). В комбинации оба вида данных позволяют выяснить происхождение яблони домашней *M. domestica* и дать информацию о процессе одомашнивания яблони (Harris *et al.*, 1991).

Так, был проведен филогенетический анализ 47 хлоропластных геномов различных видов яблони, принимавших участие в формировании генома яблони домашней *M. domestica*. Полученные данные показали, что значительную часть хлоропластного генома яблони домашняя получила от дикого вида *M. sylvestris* (Nikiforova *et al.*, 2013).

Микросателлитные маркеры (SSR) были широко использованы для изучения рода *Malus*. Например, Gianfranceschi *et al.* (1998) разработал 16 микросателлитных маркеров с помощью которых были получены все аллели от 19 сортов, гибридов и *M. floribunda* 821. Два выбранных маркера определили все сорта, кроме “Starking” и “Red Delicious”. Hokanson *et al.* (1998) провел скрининг образцов из core-коллекции хранилища гермплазмы с помощью 8 SSR-маркеров. Данная система маркеров дифференцировала практически все исследуемые образцы.

Liebhart *et al.* (2002) разработал 140 новых микросателлитных маркеров яблони (*Malus* x *domestica* Borkh.). Высокий уровень полиморфизма выражается в среднем по 6.1 аллелей на локус, уровень гетерозиготности (H) составил 0.74. 115 SSR-маркеров были помещены на карту сцепления. В результате были идентифицированы все 17 групп сцепления, соответствующих 17 хромосомам яблони. Каждая хромосома несла как минимум по два SSR-маркера.

Проводился микросателлитный анализ европейских популяций вида *M. sylvestris* (Cornille *et al.*, 2013). Было использовано 26 микросателлитных

маркеров. Результат показал, что примерно 61% своего генома яблоня домашняя из Европейской части получила именно от вида *M. sylvestris*.

SSR-маркеры были применены для изучения популяций *M. sieversii*, являющимся одним из предков культурных сортов яблони, на территории природного ареала распространения вида – Казахстана. Собранные образцы *M. sieversii* пяти популяций региона послужили источником создания банка геномной ДНК, при проведении оценки генетического полиморфизма дикой яблони при помощи SSR-маркеров, был выявлен высокий уровень генетического разнообразия (Omasheva *et al.*, 2015). Кроме того, SSR-маркеры были применены для изучения генетического разнообразия различных сортов вида *M. domestica*, для проведения идентификации различных сортов яблони, а также для уточнения вопросов доместикации яблони (Gross *et al.*, 2014).

В последнее время S-SAP-маркеры находят свое применение и для изучения рода *Malus*. Три полноразмерных LTR-ретротранспозона в миниатюре (TRIM) были изолированы из генома яблони с использованием метода универсальных праймеров (Antonius-Klemola *et al.*, 2006). Другой полноразмерный LTR-ретротранспозон dem1 был успешно изолирован из генома яблони (Yao *et al.*, 2001), с последующей разработкой S-SAP-метода на основе последовательности данного ретротранспозона для характеристики почковых клонов яблони (Venturi *et al.*, 2006). В 2007 году был выделен *Ty1-copia-like* LTR-ретротранспозон (Zhao *et al.*, 2007). В 2010 году было выделено еще два *Ty1-copia-like* LTR-ретротранспозона яблони - STcrn1 and STcrn2 при помощи метода «прогулки по геному» (Zhao *et al.*, 2010).

Метод SNP также применялся для изучения геномных вариантов генов, связанных с ценными хозяйственными признаками, на некоторых сортах яблони (Zhang *et al.*, 2014). Результаты этого исследования показали наличие геномных вариаций в этих сортах, были даны рекомендации по использованию данных сортов в дальнейших скрещиваниях для выведения

новых сортов яблони с ценными сельскохозяйственными признаками, такими как устойчивость к болезням, наличием коротких междоузлий и высокими вкусовыми качествами.

Когда стала доступной последовательность генома яблони, появилась возможность анализа больших семейств генов, таких как семейства генов устойчивости (R), что может способствовать пониманию основных событий, ответственных за молекулярную эволюцию.

Было проведено исследование семейства кандидатов в гены устойчивости (RGAs) яблони вида *M. domestica*, сорт Golden Delicious, а также было изучено эволюционное развитие данного семейства в роде *Malus* (Perazzolli *et al.*, 2014). Было идентифицировано 868 RGAs в геноме яблони (*Malus × domestica* Borkh.), сорт Golden Delicious. Они составили примерно 1.51% от общего количества генов устойчивости данной культуры.

Jia *et al.* (2015) изучили полногеномные сиквенсы представителей пяти различных родов семейства Rosaceae, включая род *Malus* с целью изучения эволюционной модели развития NBS-кодирующих генов и сравнить их подобными моделями из нескольких родов семейства *Cucurbitaceae* (тыква). Были обнаружены значительные различия в количестве копий NBS-кодирующих генов. Колоссальное количество таких генов было обнаружено именно у яблони (1303, 2,05%), что говорит о быстрой экспансии, а также наличия процессов адаптивной эволюции данного класса генов в роде *Malus*.

Таким образом, многие молекулярно-генетические маркеры нашли широкое применение в изучении генетического разнообразия рода *Malus*, при построения генетических карт, уточнения вопросов филогении и систематики рода, а также для выявления многих хозяйственно-ценных признаков для маркер-опосредованной селекции. Однако, до сих пор многие вопросы процесса одомашнивания и эволюционного процесса яблони, межвидовых и внутривидовых отношений внутри рода *Malus* являются спорными.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Исходный материал

Объектами исследования были выбраны представители рода *Malus* Mill. – дикие виды, сорта яблони домашней, сорта народной селекции Антоновки (Табл. 1). Коллекция образцов была предоставлена Всероссийским научно-исследовательским институтом генетики и селекции плодовых растений имени И.В. Мичурина (ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина), Майкопской опытной станцией Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства им Н.И. Вавилова (Майкоп – Санкт-Петербург), а также Главным ботаническим садом им. Н.В. Цицина РАН (ГБС РАН). При отборе образцов для изучения генетического разнообразия главной задачей было максимально охватить все разнообразие видов рода *Malus*.

Полученный материал представлен 133 образцами, включая 9 форм Антоновок российской народной селекции, 34 культурных сорта *M. domestica* Borkh., 59 образцов диких видов яблони, 31 образец межвидовых гибридов яблони (в соответствии с классификацией ВНИИР (Барсукова, 2012):

- Section *Docyniopsis* – *M. sikkimensis* (Wenz.) Koehne.;
- Section *Sorbomalus* - *M. florentina* (Zucc.) C. K. Schneid., *M. fusca* C. K. Schneid., *M. honanensis* Rehd., *M. kansuensis* (Batal.) C. K. Schneid., *M. sargentii* Rehd., *M. sieboldii* (Regel.) Rehd., *M. transitoria* (Batal.) C. K. Schneid., *M. toringoides* (Rehd.) Hughes.;
- Section *Gymnomeles* - *M. baccata* Borkh., *M. hupehensis* (Pamp.) Rehd., *M. mandshurica* (Maxim.) Kom., *M. pallasiana* Juz., *M. sachalinensis* (Kom.) Juz.;
- Section *Malus* – *M. domestica* Borkh., *M. asiatica* Nakai., *M. caspiensis* Langenf., *M. niedzwetzkyana* (Dieck.) C. K. Schneid., *M. orientalis* (Uglitz.)

Juz., *M. sylvestris* (L.) Mill., *M. pumila* Mill., *M. ringo* Siebold. ex Carrière, *M. sieversii* (Ledeb.) M. J. Roem., *M. turkmenorum* Juz. et M. Pop.;

- Section *Chloromeles* - *M. coronaria* (L.) Mill., *M. ioensis* (Wood.) Britt.;
- Гибриды - *M. sargentii* × Ренет Симиренко, *M. sieboldii* × Спартан, *M. × arnoldiana* Rehd. (*M. × floribunda* × *M. baccata*), *M. × cerasifera* Spach. (с участием *M. baccata*), *M. × denticulata* Lavall. (с участием видов секции *Sorbomalus*), *M. × floribunda* Sieb. (*M. baccata* × *M. sieboldii*), *M. × platycarpa* Rehd. (*M. coronaria* × *M. pumila*), *M. × prunifolia* (Willd.) Borkh. (*M. domestica* × *M. baccata*), *M. × purpurea* (Barbier.) Rehd. (при участии видов разных секций), *M. × robusta* (Carr.) Rehd. (*M. baccata* × *M. × prunifolia*), *M. × scheideckerii* Spaeth. (*M. × floribunda* × *M. × prunifolia*), *M. × soulardii* (Bailey) Britt. (*M. ioensis* × *M. pumila*), *M. × spectabilis* (Ait.) Borkh. (при участии видов разных секций), *M. × zumi* (Matsum.) Rehder. (*M. mandshurica* × *M. sieboldii*).

В качестве внешних групп были выбраны представители семейства розоцветных – груша (*Pyrus communis* L., сорт Бессемянка) и слива (*Prunus salicina* Lindl., сорт Красный шар).

Таблица 1. Список использованных в работе образцов рода *Malus* Mill. и аутгрупп

Вид / сорт/ форма	Каталожный номер (если имеется)	Коллекция	ITS-анализ/ № в анализе	S-SAP-анализ/ № в анализе	AFLP-анализ/ № в анализе	NBS-профайлинг/ № в анализе
1	2	3	4	5	6	7
Сорта народной селекции Антоновки						
Антоновка из Дондуковской	10856	Майкопская опытная станция		1	1	1
Антоновка Каменичка	64	То же		2	2	2
Антоновка обыкновенная	21190	>>	3	3	3	3
Антоновка Ольгинская	56	>>		4	4	4
Антоновка Полуторафунтовая	76	>>		5	5	5
Антоновка Зимняя	13400	>>		6	6	6
Антоновка из Севастопольской	8920	>>	7	7	7	7
Антоновка Красная	21652	>>		8	8	8
Антоновка Краснобочка	66	>>		9	9	9

продолжение Таблицы 1

1	2	3	4	5	6	
Сорта вида <i>M. domestica</i> Borkh. (яблоня домашняя)						
<i>M.domestica</i> Borkh. Golden Spayer	1601	Майкопская опытная станция		10	10	10
<i>M.domestica</i> Borkh. Golden Delishes	17477	То же	11	11	11	11
<i>M.domestica</i> Borkh. Spay Gold	29529	>>		12	12	12
<i>M.domestica</i> Borkh. Golden Rezistern	31482	>>		13	13	13
<i>M.domestica</i> Borkh. Jonagold	43508	>>		14	14	14
<i>M.domestica</i> Borkh. Golden Spur	25083	>>		82	82	82
<i>M.domestica</i> Borkh. Goldspur	28762	>>		15	15	15
<i>M.domestica</i> Borkh. Ренет Симиренко	65	>>		16	16	16

продолжение Таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7
<i>M.domestica</i> Borkh. Кавказская самоплодная		ВНИИГиСПР им. И. В. Мичурина		17	17	17
<i>M.domestica</i> Borkh. Juliet		То же		18	18	18
<i>M.domestica</i> Borkh. Сочи 26/1		>>		90		90
<i>M.domestica</i> Borkh. Fostbite		>>		19	19	19
<i>M.domestica</i> Borkh. Rowile		>>		20	20	20
<i>M.domestica</i> Borkh. Chestnut crab		>>		21	21	21
<i>M.domestica</i> Borkh. Гала		>>		22	22	22
<i>M.domestica</i> Borkh. Дочь Коричного		>>		23	23	23
<i>M.domestica</i> Borkh. Сябрына		>>		24	24	24
<i>M.domestica</i> Borkh. Курнаковское		>>		25	25	25

продолжение Таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7
<i>M.domestica</i> Borkh. Рождественское		>>		26	26	26
<i>M.domestica</i> Borkh. Hidden rose		>>		27	27	27
<i>M.domestica</i> Borkh. Скала		>>		28	28	28
<i>M.domestica</i> Borkh. Fireside		>>		29	29	29
<i>M.domestica</i> Borkh. Haralson		>>		30	30	30
<i>M.domestica</i> Borkh. Лигол		>>		31	31	31
<i>M.domestica</i> Borkh. Бессемянка Мичуринская		>>		32	32	32
<i>M.domestica</i> Borkh. Фрегат		>>		33	33	33
<i>M.domestica</i> Borkh. Белорусская сладкая		>>		34	34	34
<i>M.domestica</i> Borkh. Топаз		>>		35	35	35

продолжение Таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7
<i>M.domestica</i> Borkh. Академик Казаков		>>		83	83	
<i>M.domestica</i> Borkh. Антоновка Безлепестная		>>		36	36	36
<i>M.domestica</i> Borkh. Бреберн		>>		37	37	37
<i>M.domestica</i> Borkh. Флорина		>>		38	38	38
(форма) Якутская		>>		39	39	39
<i>M. domestica</i> Borkh. SR-0523	14694A	Майкопская опытная станция		96		
Виды секции <i>Malus</i>						
<i>M. sargentii</i> Rehd. × Ренет Симиренко		То же		97		
<i>M. sieboldii</i> (Regel.) Rehd. × Спарган		>>		98		
<i>M. × arnoldiana</i> Rehd.	2312	>>	40	40	40	40

продолжение Таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7
<i>M. asiatica</i> Nakai.	2343	>>	41	41	41	41
<i>M. × cerasifera</i> var. <i>adarata</i> Spach.	2332	>>		99		
<i>M. × cerasifera</i> Spach.	29494	>>	42	42	42	42
<i>M. × cerasifera</i> var. <i>hiemalis</i> Spach.	2342	>>		43	43	43
<i>M. × cerasifera</i> var. <i>aurantiaca</i> Spach.	2314	>>		44	44	44
<i>M. × cerasifera</i> Spach.		>>		100		
<i>M. × denticulata</i> Lavall.	29416	>>	132			
<i>M. × floribunda</i> Sieb.	2346	>>	45	45	45	45
<i>M. × floribunda</i> Sieb.		ГБС РАН		101		
<i>M. × platycarpa</i> Rehd.	29489	Майкопская опытная станция	46	46	46	46
<i>M. × prunifolia</i> (Willd.) Borkh.	2430	То же	47	47	47	47

продолжение Таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7
<i>M. × prunifolia</i> (Willd.) Borkh.	2454	>>		102		
<i>M. × prunifolia</i> (Willd.) Borkh.	2450	>>		103		
<i>M. × prunifolia</i> (Willd.) Borkh.	2460	>>		104		
<i>M. × purpurea</i> var. <i>aldenhamensis</i> (Willd.) Borkh.	2393	>>	48	48	48	48
<i>M. × purpurea</i> (Barbier.) Rehd.	2392	>>	49	49	49	49
<i>M. × purpurea</i> var. <i>pendula</i> (Barbier.) Rehd.	2396	>>		50	50	50
<i>M. × purpurea</i> (Barbier.) Rehd.		ГБС РАН		105		
<i>M. × purpurea</i> var. <i>eleyi</i> (Barbier.) Rehd.	2394	Майкопская опытная станция		106		
<i>M. × robusta</i> (Carr.) Rehd.	43199	То же	84	84	84	
<i>M. × robusta</i> (Carr.) Rehd.		ВНИИГиСПР им. И. В. Мичурина		107		

продолжение Таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7
<i>M. × robusta</i> var. <i>persicifolia</i> (Carr.) Rehd.	41279	Майкопская опытная станция		91		91
<i>M. × scheideckerii</i> Spaeth.	2407	То же	85	85	85	
<i>M. × soulardii</i> (Bailey.) Britt.	2414	>>	51	51	51	51
<i>M. × spectabilis</i> var. <i>albi plena</i> (Ait.) Borkh.	2416	>>		52	52	52
<i>M. × spectabilis</i> var. <i>rubra</i> <i>plena</i> (Ait.) Borkh.	24945	>>		53	53	53
<i>M. × spectabilis</i> (Ait.) Borkh.	2415	>>	92	92	92	92
<i>M. × zumi</i> (Matsum.) Rehder.		ГБС РАН	108	108		
<i>M. × zumi</i> (Matsum.) Rehder.	2427	Майкопская опытная станция		109		
<i>M. baccata</i> var. <i>coerulescens</i> Borkh.	2333	То же	54	54	54	54
<i>M. baccata</i> Borkh.	41281	>>		110		

продолжение Таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7
<i>M.baccata</i> Borkh.		ГБС РАН		111		
<i>M.baccata</i> Borkh.	2319	Майкопская опытная станция		93		93
<i>M.baccata</i> Borkh.	2316	То же		55	55	55
<i>M.baccata</i> var. <i>genuina</i> Borkh.	2324	>>		56	56	56
<i>M.baccata</i> Borkh.	14207	>>		112		
<i>M.baccata</i> Borkh.	2317	>>		113		
<i>M.caspiensis</i> Langenf.	14942	>>		57	57	57
<i>M.caspiensis</i> Langenf.	14943	>>	114	114		
<i>M.coronaria</i> (L.) Mill.	2336	>>	58	58	58	58
<i>M.florentina</i> (Zucc.) C. K. Schneid.		ГБС РАН		115		
<i>M.florentina</i> (Zucc.) C. K. Schneid.	2345	Майкопская опытная станция	59	59	59	59
<i>M.fusca</i> (Raf.) C. K. Schneid.		ГБС РАН		116		

продолжение Таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7
<i>M.honanensis</i> Rehd.	13103	Майкопская опытная станция	117	117		
<i>M.hupehensis</i> (Pamp.) Rehd.	14945A	То же	60	60	60	60
<i>M.hupehensis</i> (Pamp.) Rehd.		ГБС РАН		118		
<i>M.ioensis</i> (Wood.) Britt.	2352	Майкопская опытная станция	61	61	61	61
<i>M.kansuensis</i> (Batal.) C. K. Schneid.	2355	То же		62	62	62
<i>M.mandshurica</i> (Maxim.) Kom.	14947A	>>	86	86	86	
<i>M.mandshurica</i> (Maxim.) Kom.	41277	>>		94		94
<i>M.niedzwetzkyana</i> (Dieck.) C. K. Schneid.	29422	>>		63	63	63
<i>M.niedzwetskyana</i> (Dieck.) C. K. Schneid.	13279	>>		64	64	64
<i>M.niedzwetskyana</i> (Dieck.) C. K. Schneid.	29429	>>	119	119		

продолжение Таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7
<i>M.niedzwetskyana</i> (Dieck.) C. K. Schneid.		ГБС РАН		120		
<i>M.orientalis</i> (Uglitz.) Juz.	29484	Майкопская опытная станция	65	65	65	65
<i>M.orientalis</i> (Uglitz.) Juz.	49478	То же		121		
<i>M.orientalis</i> (Uglitz.) Juz.	29476	>>		66	66	66
<i>M.orientalis</i> (Uglitz.) Juz.		ГБС РАН		122		
<i>M.orientalis</i> (Uglitz.) Juz.	41623	Майкопская опытная станция		67	67	67
<i>M.orientalis</i> (Uglitz.) Juz.	29460	То же		123		
<i>M. orientalis</i> NR-12740-7A (Uglitz.) Juz.	41636	>>		124		
<i>M.pallasiana</i> Juz.	14957A	>>	68	68	68	68
<i>M. ringo</i> Siebold. ex Carrière	41280	>>	133			
<i>M.sylvestris</i> var. <i>praecox</i> (L.) Mill.	14958A	>>		69	69	69

продолжение Таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7
<i>M.pumila</i> var. <i>gallica</i> Mill.	2385	>>	70	70	70	70
<i>M.pumila</i> Mill.	2383	>>	71	71	71	71
<i>M.sachalinensis</i> (Kom.) Juz.	41275	>>	125	125		
<i>M.sachalinensis</i> (Kom.) Juz.	25951	>>		72	72	72
<i>M.sachalinensis</i> (Kom.) Juz.	25950	>>		126		
<i>M.sargentii</i> Rehd.		ГБС РАН		127		
<i>M.sargentii</i> Rehd.	2428	Майкопская опытная станция	73	73	73	73
<i>M.sieboldii</i> (Regel.) Rehd.		ГБС РАН		128		
<i>M.sieboldii</i> (Regel.) Rehd.	2322	Майкопская опытная станция	74	74	74	74
<i>M.sieversii</i> (Lebed.) M. J. Roem.	13280	То же	75	75	75	75
<i>M.sieversii</i> (Lebed.) M. J. Roem.	29425	>>		87	87	

продолжение Таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7
<i>M.sieversii</i> (Lebed.) M. J. Roem.	11975	>>		76	76	76
<i>M.sieversii</i> (Lebed.) M. J. Roem.		ГБС РАН		129		
<i>M.sieversii</i> (Lebed.) M. J. Roem.	29493	Майкопская опытная станция		130		
<i>M.sikkimensis</i> (Wenz.) Koehne.	2412	То же	88	88	88	
<i>M.sylvestris</i> (L.) Mill.	41639	>>	77	77	77	77
<i>M.sylvestris</i> 123 (L.) Mill.	14981A	>>	78	78	78	78
<i>M.sylvestris</i> 73 (L.) Mill.	14983A	>>		79	79	79
<i>M.transitoria</i> (Batal.) C. K. Schneid.	2424	>>	80	80	80	80
<i>M.toringoides</i> (Rehd.) Hughes.	3109	>>	81	81	81	81
<i>M.turkmenorum</i> Juz. et M. Pop.	13282	>>		89	89	
<i>M.turkmenorum</i> Juz. et M. Pop.		ГБС РАН		131		

продолжение Таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7
<i>M.turkmenorum</i> Juz. et M. Pop.	13283	Майкопская опытная станция	95	95		95
Аутгруппы						
<i>Prunus salicina</i> Lindl. (сорт Красный шар)		ВНИИГиСПР им. И. В. Мичурина		135		135
<i>Pyrus communis</i> L. (сорт Бессемянка)		То же		134	134	134

2.2. Выделение ДНК образцов яблони

ДНК образцов выделяли из почек и листьев после отращивания черенков представителей различных видов и сортов рода *Malus* по методике Puchooa (2004), адаптированной для работы с растительным материалом с высоким содержанием фенольных соединений. Концентрацию выделенной ДНК определяли при сравнении с ДНК фага λ известной концентрации (“Fermentas”) после электрофореза в агарозном геле. В качестве буферной системы использовали 1x TBE. Для приготовления геля использовали агарозу (“Helicon”) в конечной концентрации 1%. Для визуализации ДНК в гель добавляли раствор бромистого этидия до конечной концентрации 0,005%. Напряженность электрического поля при электрофорезе составляла 4,4 В/см. После электрофореза гели анализировали в ультрафиолетовом свете с использованием трансиллюминатора и фотографировали с использованием цифровой фотокамеры Canon EOS 20D.

Таким образом, была составлена коллекция ДНК 133 образцов рода *Malus* и представителей двух аутгрупп (Табл. 1).

2.3. Секвенирование и статистический анализ нуклеотидных последовательностей участка ITS1-5.8S ядерного генома

В ходе работы были секвенированы и проанализированы последовательности района транскрибируемого спейсера ITS1 и гена 5.8S рРНК у 41 образца рода *Malus*. Отобранные для анализа представители яблони включали образцы видов различных секций, гибриды, сорта яблони домашней и сорта народной селекции Антоновки (Табл. 1).

Нами были использованы универсальные последовательности праймеров, предложенные White *et al.* (1990): ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC; ITS5: GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG. ПЦР проводили по стандартной методике Hsiao *et al.* (1994) с

использованием набора реактивов (“Диалат ЛТД”, Москва) в амплификаторе фирмы “ABI GenAMP 9700” (США). Секвенирование фрагментов проводили с теми же праймерами, использованными для амплификации, в секвенаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems согласно протоколу фирмы-производителя. Полученные последовательности выравнивали, далее их проанализировали с помощью программы MEGA 5.1 (Tamura *et al.*, 2011). Построение дендрограмм производили с использованием программы MEGA 5.1 методами объединения соседей (Neighbor-Joining, NJ). Индексы бутстрепа (ИБ) рассчитывали по 1000 репликам.

2.4. Проведение AFLP-, S-SAP-анализа, а также NBS-профайлинг образцов рода *Malus*

AFLP. Для исследования отобрали 90 наиболее распространенных образцов рода *Malus* из пяти секций, включая сорта яблони домашней *M. domestica*, а также гибридные виды (Табл. 1).

Таким образом, было максимально охвачено генетическое разнообразие рода *Malus*. В качестве аутгруппы был выбран образец груши *Pyrus communis* L., сорт Бессемянка и слива *Prunus salicina* Lindl. (сорт Красный шар).

Выполнение AFLP-анализа проводили в соответствии со стандартной методикой, разработанной Vos *et al.* (1995). ДНК образцов (300 нг) гидролизовали с помощью рестриктаз EcoRI и MseI (“Fermentas”), лигировали с соответствующими адаптерами (“Fermentas”). ПЦР проводили в два последовательных этапа: первый - преамплификация с использованием праймеров, комплементарных сайту рестрикции и последовательности адаптера с единственным дополнительным нуклеотидом на 3' - конце, второй – селективная амплификация с праймерами, имеющих по 2-3 дополнительных нуклеотида на 3' - конце (Табл. 2).

Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием наборов реактивов производства “Диалат ЛТД” (Москва) по стандартным методикам в термоциклере PCT 150™ (MJResearch Inc., США) (Дрейпер *и др.*, 1991).

Таблица 2. Адаптеры и праймеры для преамплификации и селективной амплификации, использованные при AFLP-анализе образцов рода *Malus* (Vos *et al.*, 1995)

Адаптер/праймер	Код	Нуклеотидная последовательность
Адаптеры		
EcoRI-адаптер		5'- CTC GTA GAC TGC GTA CC - 3' 3'- CAT CTG ACG CAT GGT TAA - 5'
MseI-адаптер		5' – GAC GAT GAG TCC TGAG – 3' 3' – TAC TCA GGA CTC AT -5'
Праймеры для преамплификации		
EcoRI-праймер + А	E ₀₁	5' - GAC TGC GTA CCA ATT C + А - 3'
MseI-праймер + С	M ₀₂	5' - GAT GAG TCC TGA GTA А + С - 3'
Праймеры для селективной амплификации		
EcoRI-праймер + А + AAC	E ₃₂	5' - GAC TGC GTA CCA ATT C + AAC - 3'
EcoRI-праймер + А + ACA	E ₃₅	5' - GAC TGC GTA CCA ATT C + ACA - 3'
EcoRI-праймер + А + ATG	E ₄₅	5' - GAC TGC GTA CCA ATT C + ATG - 3'
MseI-праймер + С + CAT	M ₅₀	5' - GAT GAG TCC TGA GTA А + CAT - 3'
MseI-праймер + С + CCC	M ₅₂	5' - GAT GAG TCC TGA GTA А + CCC - 3'
MseI-праймер + С + CTA	M ₅₉	5' - GAT GAG TCC TGA GTA А + CTA - 3'

Предварительное тестирование 17 пар универсальных праймеров позволило выбрать пять парных комбинаций праймеров, которые давали высоковоспроизводимые ДНК-спектры и позволили выявить межвидовой и внутривидовой полиморфизм: E₃₂/M₅₀, E₃₂/M₅₂, E₃₅/M₅₀, E₄₅/M₅₀, E₄₅/M₅₉ (Табл. 2).

S-SAP. Для исследования было выбран 131 образец различных видов и сортов рода *Malus* (Табл. 1). Для проведения S-SAP-анализа был использован протокол согласно Konovalov *et al.* (2010). Данный протокол был создан на основе NBS-профайлинга по Van der Linden *et al.* (2004) с небольшими модификациями.

Рестрикционная обработка ДНК проводилась с использованием эндонуклеазы рестрикции TaqI (“BioLabs”), количество ДНК составляло 300 нг.

Далее полученные фрагменты лигировали с адаптерными олигонуклеотидами с добавлением T4 ДНК-лигазы (Invitrogen).

Таблица 3. Последовательности адаптеров и адаптерного праймера, использованных при S-SAP-анализе образцов рода *Malus* (Konovalov *et al.*, 2010)

Адаптер/праймер	Нуклеотидная последовательность
Адаптер (lower strand)	5' - PO ₄ – CGTGGGATCTATACTT - (C6 linker) - NH ₂
Адаптер (upper strand)	5' - АСТСГАТТСТСААСССГАААГТАТАГАТСССА
Адаптерный праймер	5' - GTTТАСТСГАТТСТСААСССГАААГ

В качестве адаптера, который лигировался с концами рестрикционных фрагментов, использовали смесь (конечной концентрации каждого составляющего 50 пмоль/мкл) из двух цепей ДНК – короткой (адаптер lower strand) и длинной (адаптер upper strand) (Табл. 3). После приготовления эту

смесь инкубировали 3 минуты при 90°C, а затем охлаждали до комнатной температуры.

Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием наборов реактивов производства “Диалат ЛТД” (Москва) по стандартным методикам в термоциклере PCT 150™ (MJResearch Inc., США) (Дрейпер *и др.*, 1991).

Таблица 4. Последовательности разработанных LTR-праймеров, использованных при S-SAP-анализе образцов рода *Malus*

Источник последовательности LTR-ретротранспозона	Номер GenBank	Тип и название LTR-ретротранспозона	Название LTR-праймера	Нуклеотидная последовательность LTR-праймера (5'-3')
Yao <i>et al.</i> , 2001	AJ291492	<i>Ty3-gypsy-like</i> , dem1	dem1_ATAG	tttgaacgggctgtgacaata g
Yao <i>et al.</i> , 2001	AJ291492	<i>Ty3-gypsy-like</i> , dem1	dem1_GTCC	tttgaacgggctgtgacagtc c
Yao <i>et al.</i> , 2001	AJ291492	<i>Ty3-gypsy-like</i> , dem1	dem1_GCGT	tttgaacgggctgtgacagc gt
Antonius-Klemola <i>et al.</i> , 2006	AY603367	TRIM2	TRIM_CCGA	ggc gatgtgggatgttacacc ga
Antonius-Klemola <i>et al.</i> , 2006	AY603367	TRIM2	TRIM_TAG	ggc gatgtgggatgttacatag

В качестве мишени для S-SAP-анализа были использованы уже известные последовательности LTR-ретротранспозонов яблони: *Ty3-gypsy-like* (dem1) (Yao *et al.*, 2001) и TRIM2 (Antonius-Klemola *et al.*, 2006). К 5'-концам LTR этих ретротранспозонов были подобраны праймеры с тремя или четырьмя различными случайными якорными нуклеотидами на 3'-конце (Табл. 4). Данные праймеры давали высоковоспроизводимые ДНК-спектры и позволили выявить межвидовой и внутривидовой полиморфизм.

NBS-профайлинг. Для исследования было выбрано 89 образцов различных видов и сортов рода *Malus*, принадлежащим к четырем различным секциям (Табл. 1). NBS-профайлинг и последующее разделение фрагментов на ПААГ проводили согласно методике, описанной van der Linden *et al.* (2004).

Рестрикционная обработка ДНК проводилась с использованием эндонуклеазы рестрикции *MseI* (“Fermentas”), количество ДНК составляло 300 нг.

Далее полученные фрагменты лигировали с адаптерными олигонуклеотидами с добавлением Т4 ДНК-лигазы (Invitrogen). Для реакции лигирования реакцию смесь в объеме 10 мкл добавляли к ДНК, обработанной эндонуклеазой рестрикции. Реакцию проводили в объеме 50 мкл.

Таблица 5. Последовательности праймеров и адаптерного праймера, использованных при проведении NBS-профайлинга образцов рода *Malus* (van der Linden *et al.*, 2004)

Адаптер/ праймер	T _a	Нуклеотидная последовательность
Адаптер long arm		5'-ACTCGATTCTCAACCCGAAAGTATAGATCCCA- 3'
Адаптер short arm		5'-TGGGATCTATACTT-3' (with 3' amino group)
Адаптерный праймер		5' - GTTACTCGATTCTCAACCCGAAAG - 3'
NBS 2	55 °C	5' - GTWGTYTTCYRAICCISSCAT - 3'
NBS 5	60 °C	5' - YYTKRTHGTMITKGATGATGTITGG- 3'

В качестве адаптера, который лигировался с концами рестрикционных фрагментов, использовали смесь (конечной концентрации каждого составляющего 50 пмоль/мкл) из двух цепей ДНК – короткой (адаптер short arm) и длинной (адаптер long arm) (Табл. 5). После приготовления эту смесь инкубировали 5 минут при 95°C, а затем медленно охлаждали до комнатной температуры.

В результате тестирования пяти праймеров было выбрано два наиболее высокополиморфных праймера (Табл. 5).

Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием наборов реактивов производства “Диалат ЛТД” (Москва) по стандартным методикам в термоциклере PCT 150™ (MJResearch Inc., США) (Дрейпер *и др.*, 1991).

2.5. Электрофорез амплифицированных фрагментов ДНК

Фракционирование продуктов реакции амплификации проводили путем электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в камере Sequi-Gen® GT Sequencing Cell (BIO-RAD) с использованием источника питания 3000/300 POWER SUPPLY (BIO-RAD) по протоколу фирмы-производителя. В качестве буферной системы использовали TBE. Проявляли гель по методу 3 из работы Vaudoin *et al.* (2007). Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали маркер молекулярной массы 100bp DNA ladder (Invitrogen) (0,05 г/л).

Для подготовки образцов к электрофорезу к амплификату добавляли равный объем денатурирующего буфера для нанесения на гель. Помещали образцы в термостат на 99°C, на 10 минут. 10bp DNA ladder помещали на 99°C на 3 минуты. Быстро охлаждали, поместив образцы в емкость со льдом на 10 минут.

Состав денатурирующего буфера для нанесения на гель:

98% формамид

0,01 М ЭДТА (динатриевая соль)

3,61 mM бромфеноловый синий

4,64 mM кселенцианол

После просушивания геля просматривали его на световом столике, фотографировали и анализировали.

2.6. Анализ результатов и статистическая обработка данных

В статистический анализ были включены только четкие, воспроизводимые фрагменты.

Данные, полученные в результате AFLP-, S-SAP-анализа и при проведении NBS-профайлинга были обработаны методом PCO (principal coordinates analysis – метод анализа главных координат), выполненным в программе PAST 3.10 (Hammer *et al.*, 2001).

Для проведения кластеризации и оценки генетического расстояния между образцами в S-SAP-анализе использовалась программа PAST 3.10 (Hammer *et al.*, 2001).

Для проведения оценки результатов NBS-профайлинга методом двумерного кластерного анализа в лаборатории генетики растений ИОГен РАН был разработан алгоритм статистической программы на базе программы STATISTICA v. 6 (StatSoft I. N. S., 2001). Данный алгоритм позволяет обработать большие объемы полученных в ходе исследования данных.

Генетические расстояния для PCO-анализа и при проведении кластеризации, а также при обработке данных методом двумерного кластерного анализа были рассчитаны автоматически по коэффициенту Дайса. Статистическая оценка достоверности была подсчитана методом бутстреп-анализа по 1000 репликам.

Коэффициент Дайса (Dice coefficient, известен как коэффициент Нея и Ли) рассчитывается по формуле:

$$D=2a/(2a+b+c);$$

где a - число общих соответствий (1,1), b и c - это количество несоответствий (1,0 или 0,1), и d - число одновременных отсутствий (0,0) в сравнении между индивидуумами (Laurentin, 2009). Эти показатели могут принимать значения от 0 (образцы сильно отличаются) до 1 (одинаковые образцы). Наиболее очевидное различие в этих формулах связано с фактором d .

Коэффициент соответствия Дайса учитывает одновременное отсутствие полосы как показатель сходства для сравнения образцов (Bussell *et al.*, 2005; Laurentin, 2009).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. ITS-анализ образцов рода *Malus* Mill.

Последовательности ITS в настоящее время широко используются для изучения филогении растений.

В работу был отобран 41 образец различных видов и сортов рода *Malus*, относящихся к пяти различным секциям *Malus*, *Gymnomeles*, *Sorbomalus*, *Chloromeles*, *Dosyniopsis* (табл. 1). В качестве внешней группы были взяты последовательности ITS1 и гена 5.8S двух образцов из GenBank: *Pyrus* (*Pyrus dimorphophylla* EU149953) и *Spiraea salicifolia* JQ041777.

Нуклеотидные последовательности района транскрибируемого спейсера ITS1 и гена 5.8S рРНК у отобранных образцов рода *Malus* были секвенированы (рис. 7) и далее они были депонированы в базе данных GenBank под номерами: KF186578, KF186579, KF186580, KF186581, KF186582, KF186583, KF186584, KF186585, KF186586, KF186587, KF186588, KF186589, KF186590, KF186591, KF186592, KF186593, KF186594, KF186595, KF186596, KF186597, KF186598, KF186599, KF186600, KF186601, KF186602, KF186603, KF186604, KF186605, KF186606, KF186607, KF186608, KF186609, KF186610, KF186611, KF186612, KF186613, KF186614, KF186615, KF186616, KF186617, KF186618.

Длина гена 5.8S рРНК у всех проанализированных представителей рода яблони составила 165 п.н., на всем протяжении полиморфизма выявлено не было (Табл. 6). Длина ITS1 последовательности у рассмотренных видов *Malus* составляет 224 п.н., за исключением *M. caspiciensis* и *M. sylvestris*, у которых протяженность этого участка равна 227 п.н. В последовательности фрагмента ITS1 было выявлено 32 переменных сайта (Табл. 6). Таким образом, уровень нуклеотидного полиморфизма изучаемого фрагмента составил 14%.

При анализе ITS1 последовательностей представителей рода *Malus* было обнаружено несколько видоспецифичных замен (рис. 7). Так, например, у *M. honanensis* обнаружена замена T50A. Для *M. soulardii* и *M. florentina* были характерны видоспецифичные замены G42T и G70A соответственно.

Таблица 6. Характеристика нуклеотидных последовательностей ITS1 и гена 5.8S образцов рода *Malus*

	Длина	Число вариабельных сайтов	Число парсимони- информативных сайтов	GC состав (%)	Транзиции/ Трансверсии
ITS1	224- 227	32	25	67,5 %	7 (22%) \ 25 (78%)
5.8S	165	0	0	58,8 %	-

Помимо единичных нуклеотидных замен в последовательности внутреннего транскрибируемого спейсера ITS1 был выявлен ряд замен, характерных для групп видов *Malus*. Так, замена A106G была выявлена только у видов *M. sargentii*, *M. × zumi* и *M. × platycarpa*. Для 17 видов в положениях 112 и 113 были выявлены динуклеотидные замены GA, в то время как у остальных видов в этом положении детектировался динуклеотид TT. У гибридных видов *M. × cerasifera*, *M. × purpurea*, *M. × robusta* в положении 113 была замена оснований T на A (табл. 3). Помимо замен в последовательности ITS 1 были также идентифицированы индели. Так, динуклеотидная инсерция AA была характерна для последовательностей видов *M. pumila* var. *gallica*, *M. sylvestris* 41639, *M. hupehensis*, *M. coronaria*, а инсерция (ATC) характерна для видов *M. caspiensis* и *M. sylvestris* 123, которые относятся к одной секции *Malus*. Кроме того, у вида *M. honanensis* обнаружена видоспецифичная мононуклеотидная инсерция (A). Данный вид

произрастает на центральных высокогорных территориях Китая, относится к секции *Sorbomalus*.

Отдельный интерес представлял вид *M. turkmenorum*, произрастающий на территориях Ирана, Кавказа, Турции. Ранее данный вид не включался в молекулярные исследования и таксономический статус его неоднозначен. Так, В. Т. Лангенфельд (1991) в своей классификации с одной стороны выделяет *M. turkmenorum* как самостоятельный вид, с другой – замечает о его сходстве и близком родстве с еще одним видом *M. orientalis*, который имеет сходный ареал произрастания. Однако, Барсукова (2012) говорит о *M. turkmenorum* как об отдельном виде. По нашим данным *M. turkmenorum* не является отдельным видом, это вид *M. orientalis* (Восточные яблони), так как ITS1 последовательности *M. turkmenorum* оказались полностью идентичны *M. orientalis*.

Также была установлена идентичность ITS1 последовательности четырех видов яблони: *M. baccata*, *M. mandshurica*, *M. pallasiana*, *M. sachalinensis* (секция *Gymnomeles*). Согласно классификации GRIN (2013), виды *M. mandshurica* и *M. sachalinensis* являются синонимами, и вместе с видами *M. baccata* и *M. pallasiana* образуют секцию *Gymnomeles*.

На основе анализа последовательностей ITS1 были рассчитаны межвидовые генетические расстояния и построена дендрограмма методом объединения ближайших соседей (Neighbor-Joining) с использованием в качестве внешней группы ITS1 последовательностей *Pyrus dimorphophylla* (EU149953) и *Spiraea salicifolia* (JQ041777). На дендрограмме все анализируемые виды *Malus* с бутстреп-поддержкой, равной 76, объединены в один обширный кластер (рис. 8). Внутри виды яблони группировались в отдельные подкластеры, однако в большинстве случаев такие субкластеры имели низкую (<50) бутстреп-поддержку, показанную также в других молекулярных исследованиях рода *Malus* (Robinson *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2002), что говорит как о схожести геномов образцов яблони, так и о наличии

межвидовой гибридизации. Подобные результаты также могли быть вызваны небольшой длиной секвенированных последовательностей, использованных для анализа. В анализ был взят гибридный вид, ранее не включавшийся в молекулярные исследования, – *M. × denticulata*. По данным анализа варибельности ITS1, виды *M. × denticulata* и *M. sieversii* объединяются в один кластер (БП = 66). При этом, по словам О. Н. Барсуковой (2012), *M. × denticulata* является гибридом, в происхождении которого прослеживается участие ягодных и рябиновидных яблонь, а В. Т. Лангенфельд (1991) о подобном виде не упоминает.

Сорт домашней яблони *M. domestica* Golden Delishes группируется вместе с секцией *Malus*, как и ожидалось. Здесь же находятся и сорта народной селекции - Антоновка из Севастопольской и Антоновка обыкновенная. Можно с уверенностью говорить об их принадлежности к секции *Malus*.

В один субкластер (БП = 59) вошли виды *M. ioensis* и *M. coronaria*. Данные виды составляют североамериканскую секцию яблонь *Chloromeles*.

Таким образом, на основе нуклеотидной последовательности фрагмента ITS1-5.8S рибосомного оперона был проведен анализ образцов рода *Malus*. Данная последовательность достаточно вариабельна для изучения межвидовых отношений в пределах рода и в настоящее время широко используется во многих работах по молекулярно-филогенетическому анализу. Сравнительно небольшой процент варибельности района ITS1 демонстрирует как схожесть геномов образцов яблони, так и наличие межвидовой гибридизации. Подобный результат может быть вызван небольшой длиной секвенированных последовательностей, использованных для анализа. Подтверждено объединение видов по секциям (*M. baccata*, *M. mandshurica*, *M. pallasiana*, *M. sachalinensis*) и сделано предположение об объединении видов *M. orientalis* и *M. turkmenorum* в один вид на основании анализа секвенированных последовательностей.

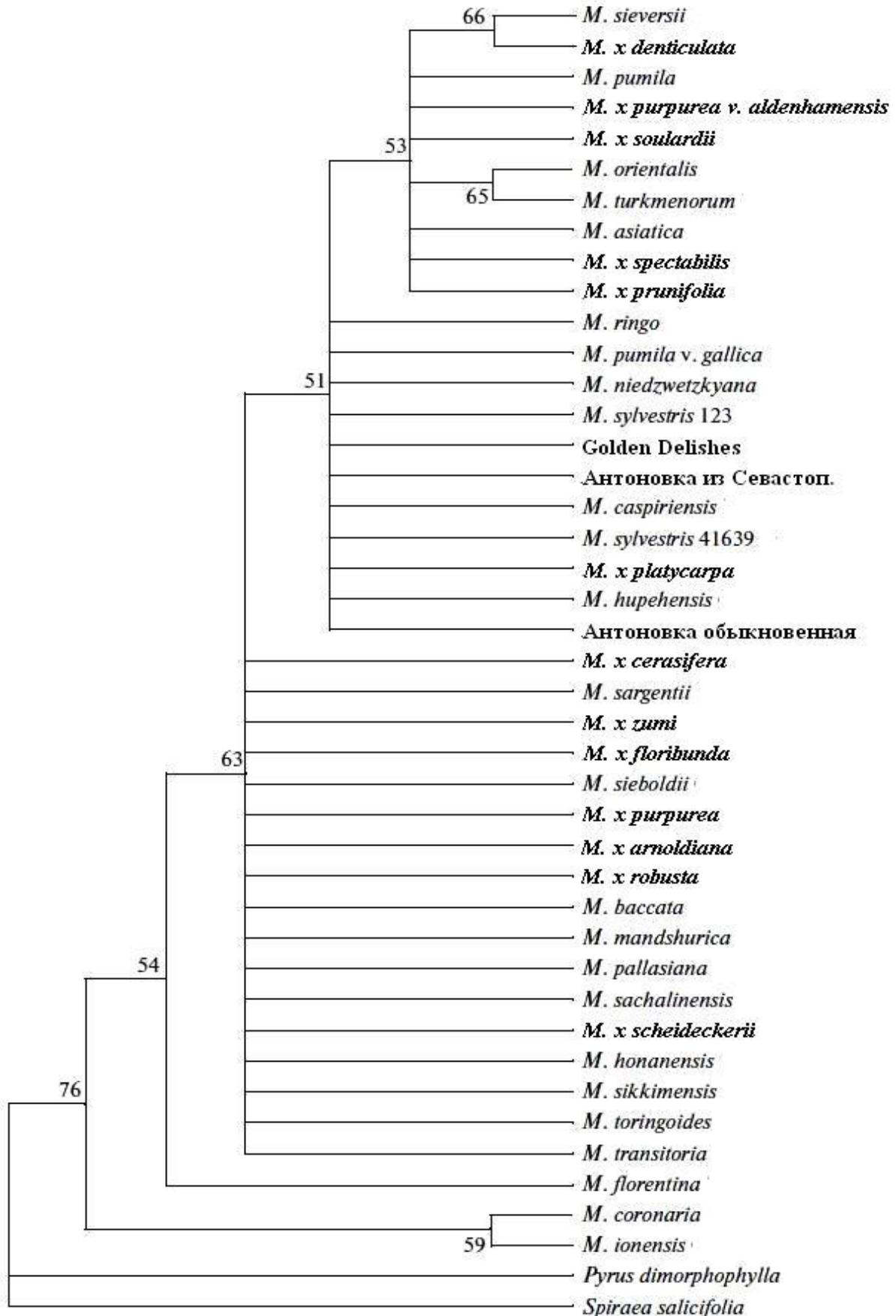
Рис. 7. Вариабельные последовательности внутреннего транскрибируемого спейсера ITS1 в 41 образце видов *Malus*

Образец	11	13	15	33	42	50	51	61	63	67	70	80	106	112	113	125	126	127	140	141	142	147	148	154	162	164	165	185	199	200	208	210	211	212	213		
<i>M. asiatica</i>	A	G	C	C	G	T	—	C	T	C	G	C	A	T	T	T	G	T	T	C	T	G	A	C	C	C	C	C	C	G	T	A	—	—	—		
<i>M. ringo</i>	—	G	—	—	—
<i>M. sieversii</i>	.	.	G	.	.	.	—	—	—	—
<i>M. pumila</i>	—	—	—	—
<i>M. pumila</i> v. <i>gallica</i>	—	G	A	A	—	
<i>M. niedzwetzkyana</i>	—	G	—	—	—
<i>M. x purpurea</i>	—	T	G	A	T	G	.	.	.	A	G	—	—	—	
<i>M. x purpurea</i> v. <i>aldenhamensis</i>	—	—	—	—
<i>M. orientalis</i>	—	T	—	—	—
<i>M. turkmenorum</i>	—	T	—	—	—
<i>M. sylvestris</i> 123	—	G	A	T	C	
<i>M. sylvestris</i> 41639	—	G	A	A	A	—	
Golden Delishes	—	G	—	—	—
<i>M. caspiensis</i>	—	G	C	A	.	A	T	C		
<i>M. x prunifolia</i>	—	A	T	—	—	—	
<i>M. x spectabilis</i>	—	T	—	—	—	
<i>M. baccata</i>	—	T	G	G	A	.	C	A	G	.	.	.	T	—	—	—		
<i>M. mandshurica</i>	—	T	G	G	A	.	C	A	G	.	.	.	T	—	—	—		
<i>M. pallasiana</i>	—	T	G	G	A	.	C	A	G	.	.	.	T	—	—	—		
<i>M. sachalinensis</i>	—	T	G	G	A	.	C	A	G	.	.	.	T	—	—	—		

Рис. 7. Вариабельные последовательности внутреннего транскрибируемого спейсера ITS1 в 41 образце видов *Malus* (продолжение)

Образец	11	13	15	33	42	50	51	61	63	67	70	80	106	112	113	125	126	127	140	141	142	147	148	154	162	164	165	185	199	200	208	210	211	212	213	
<i>M. x cerasifera</i>	—	T	G	A	G	—	—	—	
<i>M. x denticulata</i>	.	.	G	.	.	.	—	—	—	—
<i>M. x robusta</i>	—	T	G	A	.	C	A	G	.	.	.	T	—	—	—	
<i>M. hupehensis</i>	—	.	G	C	A	A	—	
<i>M. sieboldii</i>	.	.	G	G	.	.	—	.	G	.	.	.	G	A	.	.	C	.	.	.	T	G	A	G	.	.	.	T	—	—	—	
<i>M. sargentii</i>	—	T	G	.	.	G	G	A	.	.	C	.	.	.	T	G	A	.	.	C	.	—	—	—		
<i>M. x zumi</i>	.	.	G	.	.	.	—	T	G	.	.	G	G	A	.	.	C	.	.	.	T	G	A	.	.	.	T	—	—	—		
<i>M. x scheideckerii</i>	—	T	G	.	T	.	G	A	G	.	T	.	T	—	—	—		
<i>M. x arnoldiana</i>	—	T	G	.	.	.	G	A	.	.	C	A	.	.	.	T	—	—	—		
<i>M. x floribunda</i>	—	T	G	.	.	.	G	A	.	.	C	.	.	.	T	G	A	.	.	C	.	—	—	—		
<i>M. toringoides</i>	—	T	G	.	T	.	G	A	.	T	.	.	.	C	.	.	.	T	C	.	—	—	—		
<i>M. transitoria</i>	.	A	—	T	G	.	T	.	G	A	C	T	C	.	—	—	—	
<i>M. honanensis</i>	.	A	.	.	.	A	A	.	G	.	T	.	G	A	.	.	C	A	.	.	.	G	.	T	.	T	—	—	—			
<i>M. x soulardii</i>	G	.	.	.	T	.	—	—	—	—	
<i>M. coronaria</i>	G	A	.	A	.	.	—	G	T	.	T	.	G	A	A	A	C	C	C	A	A	—		
<i>M. ioensis</i>	G	A	c	.	.	.	—	G	T	.	T	.	G	A	A	A	C	—	—	—		
<i>M. x platycarpa</i>	—	T	G	.	.	G	A	T	.	.	.	C	.	—	—	—		
<i>M. florentina</i>	—	T	G	T	A	T	.	G	A	A	A	.	.	.	C	T	—	—	—		
<i>M. sikkimensis</i>	A	—	T	G	.	.	.	G	A	G	.	.	.	A	.	T	.	C	.	—	—	—			
Антоновка обыкновенная	—	T	G	C	T	—	—	—		
Антоновка из Севастоп.	—	G	—	—	—		

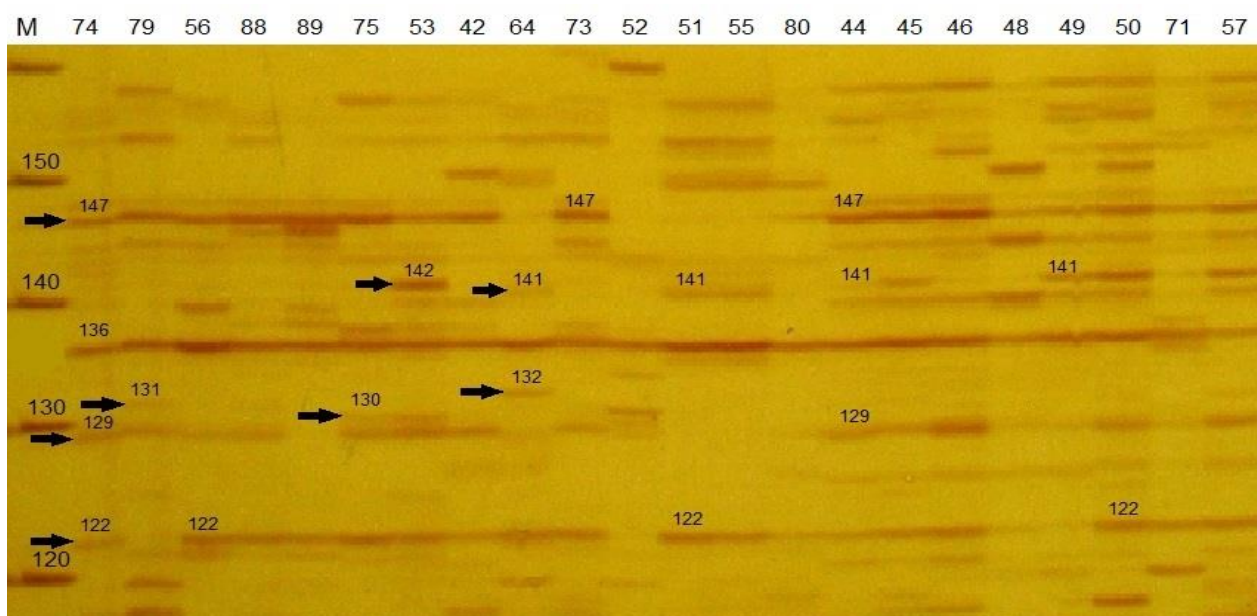
Рис. 8. Кластерный анализ методом объединения ближайших соседей (Neighbour-Joining) для 41 образца рода *Malus*



3.2. AFLP-анализ образцов рода *Malus* Mill.

AFLP-анализ 90 образцов коллекции рода *Malus* позволил идентифицировать 399 фрагментов, из которых 360 оказались полиморфными (рис. 9). Таким образом, уровень полиморфизма составил 90.2%.

Рис. 9. Фрагмент профиля, полученного с помощью комбинации AFLP праймеров E45 / M59 (Табл. 2). Нумерация образцов согласно табл. 1. М – маркер молекулярного веса; стрелками обозначены примеры полиморфных фрагментов на геле; фрагмент длиной 136 п.н. имеется у всех образцов



Результаты анализа были суммированы в виде бинарной матрицы (1/0) в программе Microsoft Excel. Далее был проведен многомерный анализ по двум главным координатам (PCO) в программе PAST 3.10, в которой автоматически были рассчитаны коэффициенты попарного генетического сходства/различия между образцами (использовался коэффициент Дайса – Dice coefficient) (Hammer *et al.*, 2001). Величина коэффициента генетических расстояний (GD) варьировала от 0,419 (*M. sylvestris* v. *praecox* (69) и *M. ioensis* (61) до 0,964 (*M. ioensis* (61) и *M. coronaria* (58) и в среднем составила 0,668.

Полученная в результате РСО-анализа диаграмма представлена на рис. 10. На диаграмме можно выделить несколько облаков концентрации образцов яблони (группы А (подгруппы a1 и a2), В, С, D).

Группа А расположена в левой нижней части диаграммы. В нее входят виды секции *Malus* (настоящие яблони). Здесь заметно выделяются два полюса концентрации образцов. Слева (подгруппа a1) располагаются виды секции *Malus* Европейского и Центрально-Азиатского регионов произрастания – *M. pumila* (70, 71), *M. sylvestris* (69, 77-79), *M. caspiensis* (57), а также сорта яблони домашней *M. domestica* (10–38, 82, 83).

Необходимо отметить, что сорта вида *M. domestica* являются ядром подгруппы a1, расположены очень близко друг от друга. Все сорта народной селекции Антоновки (1–9) находятся в группе А вместе с сортами яблони домашней *M. domestica* (подгруппа a1). Таким образом, можно с полной уверенностью говорить о принадлежности Антоновок к виду яблоня домашняя *M. domestica*. Особое внимание к исследованию этих сортов народной селекции объясняется наличием у них хозяйственно-ценных признаков, таких как устойчивость ко многим сельскохозяйственным вредителям, а также устойчивость к низким температурам (Visser *et al.*, 1974; Calenge *et al.*, 2004; Dunemann *et al.*, 2010).

Образцы вида *M. pumila* (70, 71) расположены в подгруппе a1. Лангенфельд (1991) упоминает, что название *M. pumila* используется в классификациях различных систематиков как “эпитет” для обозначения того или иного вида секции *Malus*. Самостоятельным видом, по его мнению, *M. pumila* не является (Лангенфельд, 1991).

Вид *M. sylvestris* (69, 77-79), яблоня лесная, распространен в лесах Центральной и Северной Европы и предположительно принимал участие в формировании геномов целого ряда среднерусских сортов культурной яблони (Барсукова, 2012). На диаграмме образцы вида *M. sylvestris* кластеризуются вместе с сортами яблони домашней *M. domestica*.

Подгруппа a2 включает виды *M. asiatica* (41), *M. orientalis* (65-67), *M. turkmenorum* (89). Вид *M. orientalis* произрастает на более увлажненных территориях Кавказа, относится к ирано-кавказскому ареалу произрастания яблонь. Данный вид сыграл важную роль в формировании генома домашней яблони в результате распространения домашней яблони по “Шелковому пути” из Среднеазиатского региона в Европейский (Cornille *et al.*, 2012). *M. turkmenorum* (90) также относится к ирано-кавказскому ареалу произрастания яблонь секции *Malus*, однако занимает, в отличие от *M. orientalis*, более восточные засушливые области Кавказа; кроме того, встречается в Иране. Таким образом, расположение образцов этих двух видов на диаграмме в подгруппе a2 указывает на их близость. Образцы вида *M. sieversii* на диаграмме расположены в обеих подгруппах a1 (76, 87) и a2 (75) и покрывают все разнообразие видов секции *Malus*, группа А. Вид *M. sieversii* являлся диким предшественником яблони домашней *M. domestica*, на что указывают как морфологические признаки (Robinson *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2002; Coart *et al.*, 2003), так и молекулярно-генетические данные (Velasco *et al.*, 2010). Наличие образцов вида *M. sieversii* в подгруппе a1 на диаграмме вместе с образцами яблони домашней подтверждает данные о том, что *M. sieversii* являлся главным предковым видом *M. domestica*. Кроме того, наличие образца вида *M. sieversii* и в подгруппе a2 дает возможность говорить о его близости с ирано-кавказскими видами. Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что вид *M. sieversii* являлся предковым для всех видов группы А (секции *Malus*). Дополнительным подтверждением этого предположения служит расположение образцов вида *M. niedzwetzkyana* (63, 64) в подгруппе a1, смещены к верхней части. Данный вид многими систематиками нередко объединяется в один вид с *M. sieversii* (Лангенфельд, 1991; Барсукова, 2012).

Справа в нижней части диаграммы расположена группа образцов В, в которую входят виды секции *Gymnomeles*: *M. hupehensis* (60), *M. pallasiana*

(68), *M. baccata* (54–56), *M. mandshurica* (86), *M. sachalinensis* (72) (Zohary *et al.*, 2000). Сюда же входят и некоторые межвидовые гибриды, полученные с участием видов секции *Gymnomeles* – *M. × arnoldiana* (40, *M. × floribunda* × *M. baccata*), *M. × robusta* (84, *M. baccata* × *M. × prunifolia*). Здесь также оказалась форма яблони Якутская (39), которая ранее считалась формой вида *M. domestica*. Наши данные показывают, что Якутская является результатом одомашнивания одного из видов ягодных яблонь секции *Gymnomeles*; скорее всего, это вид *M. baccata*, так как на диаграмме образец формы Якутская (39) тесно группируется именно с этим видом. Образцы *M. sieboldii* (74) и *M. sargentii* (73) располагаются также в группе В, данные виды традиционные систематики относят к секции *Sorbomalus* (Лангенфельд, 1991). На диаграмме они группируются вместе с видами секции *Gymnomeles*. Систематик Г.Г. Тарасенко (1941) объединяет данные два вида в одну группу с видом *M. baccata* секции *Gymnomeles* по географическому принципу и признакам строения органов. Для уточнения систематического положения видов *M. sieboldii* и *M. sargentii* следует провести дополнительные исследования.

Группа образцов С на диаграмме включает виды секции *Sorbomalus*, которые произрастают на территории Восточной Азии: *M. toringoides* (81), *M. transitoria* (80), *M. kansuensis* (62). Единственным видом группы С, не произрастающим на территории Восточной Азии, является вид *M. florentina* (59), который распространен на территории Северной Италии и Югославии (Барсукова, 2012). Систематическое положение вида до сих пор вызывает вопросы. Так, Cheng *et al.* (2001) выделяет вид в отдельную секцию *Florentinae*. В базе данных GRIN (2013) данный вид относится к секции *Sorbomalus*. Robinson *et al.* (2001) в своей работе утверждает, что вид *M. florentina* не может принадлежать секции *Sorbomalus*, так как генетическое расстояние между видом *M. florentina* и другими видами секции *Sorbomalus* довольно велико. Наш анализ образцов рода *Malus* методом AFLP-

маркирования показал, что вид *M. florentina* достоверно принадлежит секции *Sorbomalus*, что согласуется с мнением Лангенфельда (1991).

В группе С также располагается вид *M. sikkimensis* (88), произрастающий в Восточных Гималаях и горных лесах Сиккима, который относится к древней секции яблонь *Dosyniopsis* (Лангенфельд, 1991). Межвидовой гибрид *M. × soulardii* (51) относится к группе С.

На диаграмме отделилась группа североамериканских яблонь секции *Chloromeles* – *M. ioensis* (61) и *M. coronaria* (58) – группа D. Данные виды обладают устойчивостью к мучнистой росе и парше, что делает их привлекательными для использования в селекции новых сортов яблони. В настоящее время американские яблони используются в основном как декоративные растения (Барсукова, 2012).

Характерно, что гибридные виды, в формировании которых участвовали виды из групп А и В, на диаграмме занимают промежуточное положение между этими группами (на рис. 10 обозначены треугольниками). Это *M. × cerasifera* (42 - 44), *M. × prunifolia* (47), *M. × purpurea* (48–50), *M. × scheideckerii* (85), *M. × spectabilis* (52, 53, 92), *M. × floribunda* (45), *M. × platycarpa* (46). Эти виды возникли на границах ареалов произрастания различных видов яблони и являются более устойчивыми к патогенам и к неблагоприятным условиям среды, чем негибридные виды (Урбанович и др., 2010). Можно сказать, что гибридный вид *M. × platycarpa* (46) расположен довольно обособленно между группами А и D и был получен в результате скрещивания видов *M. pumila* (группа А) и *M. coronaria* (группа D). Подобное расположение гибридных образцов на диаграмме еще раз указывает на обоснованность использования AFLP-анализа для изучения филогении рода *Malus*.

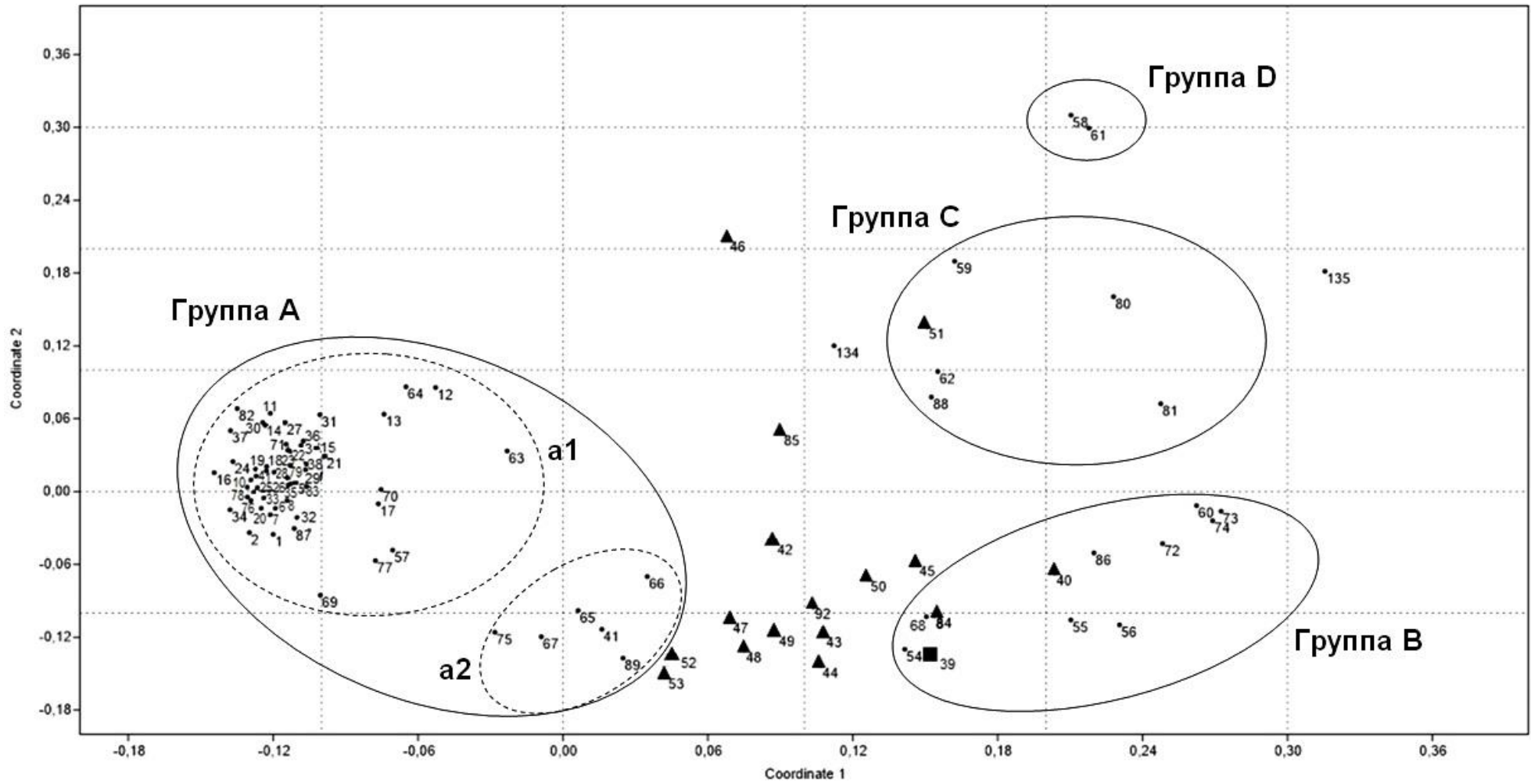
Таким образом, результат молекулярно-генетического анализа видов рода *Malus* методом AFLP-маркирования показал, что в целом классическая систематика рода *Malus*, выделяющая секции на основании различий по

морфологическим признакам и эколого-географическим признакам, правомерна и вполне может быть использована для классификации яблони.

AFLP-анализ позволил уточнить филогенетические связи внутри рода и решить некоторые спорные вопросы систематики. Так, удалось установить видовую принадлежность сортов народной российской селекции Антоновок – все они относятся к виду *M. domestica*. Яблоня Якутская, ранее считавшаяся домашней яблоней, является одомашненным видом секции *Gymnomeles*, предположительно вид *M. baccata*. Виды *M. sargentii* и *M. sieboldii* вероятно относятся к секции *Gymnomeles*. С помощью AFLP-анализа удалось подтвердить гибридность многих видов. Важным результатом работы стали данные, характеризующие разнообразие вида *M. sieversii*. Эти данные свидетельствуют еще раз о том, что именно вид *M. sieversii* был предком не только яблони домашней, но и других видов секции *Malus*.

Рис. 10. РСО-анализ образцов рода *Malus* по данным AFLP-анализа;

▲ - гибридные виды; ■ - яблоня Якутская



3.3. S-SAP-анализ образцов рода *Malus* Mill.

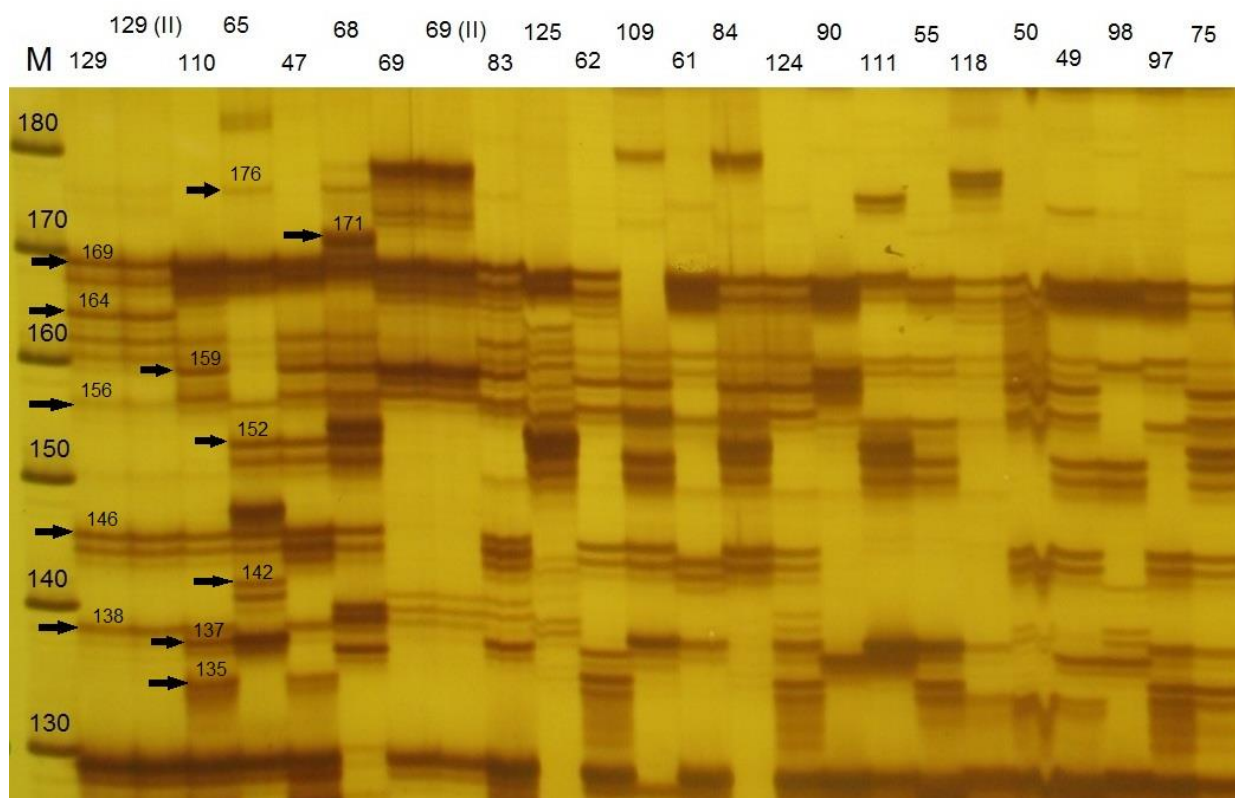
Генетические маркеры, основанные на полиморфизме по сайтам интеграции LTR-ретротранспозонов, широко используются при изучении разнообразия, филогении или паспортизации растений (Kononov *et al.*, 2010; Kalendar *et al.*, 2011; Melnikova *et al.*, 2012; Jiao *et al.*, 2014). В настоящей работе впервые было изучено генетическое разнообразие рода *Malus* при помощи S-SAP-анализа сайтов встраивания LTR-ретротранспозонов *Ty3-gypsy-like dem1* (Yao *et al.*, 2001) и TRIM2 (Terminal-repeat retrotransposon in miniature) (Antonius-Klemola *et al.*, 2006) с последующей оценкой родственных связей на межвидовом и внутривидовом уровнях.

S-SAP-анализ 131 образца из пяти секций рода *Malus* позволил идентифицировать 708 фрагментов, из них 679 полиморфных фрагментов (264 фрагмента – для LTR-ретротранспозона TRIM2 и 415 полиморфных фрагментов, полученных для LTR-ретротранспозона *dem1*) (рис. 11). Таким образом, уровень межвидового полиморфизма составил 95,9 %.

Результаты анализа были суммированы в виде бинарных матриц (1/0) в программе Microsoft Excel отдельно для LTR-ретротранспозона *dem1* и TRIM2. Далее был проведен многомерный анализ по двум главным координатам (PCO) в программе PAST 3.10 также отдельно для каждого ретротранспозона, в которой автоматически были рассчитаны коэффициенты попарного генетического сходства/различия между образцами (использовался коэффициент Дайса – Dice coefficient) (Hammer *et al.*, 2001). Для LTR-ретротранспозона *dem1* величина коэффициента генетических расстояний (GD) варьировала от 0,072 (*M. hupehensis* (60) и *M. coronaria* (58)) до 0,985 (*M. domestica* Golden Spur (82) и *M. domestica* Spay Gold (12)) и в среднем составила 0,467. Для LTR-ретротранспозона TRIM2 величина коэффициента генетических расстояний (GD) варьировала от 0,072 (*M.*

florentina (87) и *M. sachalinensis* (72) до 0,983 (Антоновка Зимняя (6) и Антоновка из Севастопольской (7) и в среднем составила 0,509.

Рис. 11. Фрагмент профиля, полученного с помощью LTR-праймера dem1_АТАГ (табл. 4). Нумерация образцов согласно табл. 1. М – маркер молекулярного веса; стрелками обозначены примеры полиморфных фрагментов на геле



В результате проведения РСО-анализа были получены две диаграммы (рис. 12 для LTR-ретротранспозона dem1 и рис. 13 для LTR-ретротранспозона TRIM2).

РСО-анализ образцов рода *Malus*, основанный на данных по LTR-ретротранспозону TRIM2, позволил выделить несколько облаков концентрации образцов на диаграмме, хотя в целом расположение образцов говорит о слабой генетической дифференциации внутри рода *Malus* (рис. 13).

Группа А включает сорта вида *M. domestica* (10-38, 82, 83, 90, 96), образцы вида *M. sieversii* (75, 76, 87, 129, 130), *M. orientalis* (65-67, 121-123),

M. turkmenorum (89, 95, 131), *M. neidzwetskyana* (63, 64, 119, 120), *M. sylvestris* (69, 77-79) и *M. asiatica* (41), а также гибридный вид *M. × spectabilis* (53).

Группа В включает образцы вида *M. baccata* (54-56, 110-113, 93), *M. hupehensis* (60, 118), *M. pallasiana* (68), *M. sieboldii* (74, 128), *M. mandshurica* (86, 94), *M. sachalinensis* (72, 125, 126), *M. sargentii* (73, 127), *M. sikkimensis* (88), *M. florentina* (115). Здесь же находятся три гибридных вида: *M. × robusta* (107) и *M. × zumi* (108, 109).

Группы С заметно отделяется от общей протяженности образцов, в неё входят как истинные виды, так и некоторые гибридные виды: *M. transitoria* (80), *M. kansuensis* (62), *M. honanensis* (117), *M. florentina* (59), *M. fusca* (116), *M. × platycarpa* (46), *M. × scheideckerii* (85), *M. × soulardii* (51).

Кроме того, на рис. 13 отчетливо отделилась подгруппа американских яблонь – *M. ioensis* (61) и *M. coronaria* (58) – с1.

Промежуточное положение между группами занимают виды *M. × cerasifera* (42-44, 99, 100), *M. × spectabilis* (52, 92), *M. × purpurea* (48-50, 105, 106), *M. × prunifolia* (47, 102-104), *M. × arnoldiana* (40), *M. × floribunda* (45, 101), а также *M. sargentii* × сорт Ренет Симиренко (97), *M. sieboldii* × сорт Спартан (98) и сорт народной селекции Антоновка Ольгинская (4). Следует отметить, что вышеуказанные виды имеют гибридное происхождение. Происхождение Антоновки Ольгинской неизвестно.

На рис. 13 восемь сортов народной селекции Антоновки попадают в группу А, объединяясь вместе с сортами яблони домашней *M. domestica*. Следует отметить, что яблоня Якутская (39) попадает в группу В.

Результаты распределения видов на основании полиморфизма по сайтам интеграции LTR-ретротранспозона dem1 представлены на рис. 12. Все исследованные образцы на диаграмме образуют единую слабо генетически дифференцированную область, распределение на отдельные группы здесь менее выраженное, границы групп сильно размыты. Кроме того, образцы секции *Cloromeles* (58, 61) находятся вместе с образцами секции *Sorbomalus*,

группа С. На рис. 12 сорт народной селекции Антоновка Ольгинская (4) объединяется вместе с видами гибридного происхождения. Яблоня Якутская (39) на рис. 12 попадает в группу В, объединяясь с видами секции *Gymnomeles*.

Далее была проведена Neighbour-Joining (NJ) кластеризация образцов рода *Malus* в программе PAST 3.10, генетические расстояния были рассчитаны автоматически. Данный анализ проводился только для LTR-ретротранспозона TRIM2, поскольку маркеры на основе данного ретротранспозона являлись более информативными, чем *dem 1*, для оценки полиморфизма исследуемых образцов яблони.

Результаты NJ кластеризации для всех образцов рода *Malus* представлены на рис. 14. В качестве аутгруппы использовалась китайская слива *Prunus salicina*, сорт Красный шар (135) и груша *Pyrus communis*, сорт Бессемянка (134). Однако, данный анализ также не позволил выявить четкой группировки образцов, поскольку бутстреп-поддержка кластеров в главных узлах имела невысокие значения (БП = 0 – 26). Далее была проведена еще одна NJ кластеризация, для которой были исключены гибридные образцы яблони, а также были смоделированы обобщенные генотипы истинных видов. Такой генотип характеризовался наиболее частым для вида состоянием по каждому из 264 маркеров ретротранспозона TRIM2. Результаты этого анализа представлены на рис. 15. В целом, группировка видов на дендрограмме совпадает с результатами РСО-анализа.

В один кластер с БП = 100 объединяются образцы секции *Malus*– *M. pumila*, *M. niedzvetskyana*, *M. sieversii*, *M. turkmenorum*, *M. orientalis*, *M. caspiensis*, сорта вида *M. domestica*, *M. sylvestris*, *M. asiatica*. Сорта народной селекции Антоновок также входят в данную группу.

Образцы секции *Gymnomeles* (*M. hupehensis*, *M. mandshurica*, *M. sachalinensis*, *M. baccata*, *M. pallasiana*) образуют кластер с БП = 66. Здесь же

находится и яблоня Якутская. Интересно отметить, что два вида *M. sargentii* и *M. sieboldii* также группируются с образцами секции *Gymnomeles*.

Также необходимо отметить, что североамериканские виды *M. coronaria* и *M. ioensis* группируются вместе с видами секции *Sorbomalus* (БП = 94), следовательно, подтверждено происхождение североамериканских яблонь от рябиновидных.

Полученные результаты подтверждают, что S-SAP-маркеры чрезвычайно эффективны при изучении филогении и генетического разнообразия растений. Каждый LTR-ретротранспозон имеет собственную историю заселения генома растения, и потому всегда можно выбрать тот ретротранспозон, который был наиболее активен в момент дивергенции рода (Gao *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2011). Маркер на основе такого ретротранспозона будет достаточно информативным при описании генетического разнообразия. Так, в нашей работе S-SAP маркеры, созданные на основе LTR-ретротранспозона TRIM2 (рис. 13) лучше дифференцировали образцы рода *Malus*, чем маркеры, созданные на основе LTR-ретротранспозона dem1 (рис. 12), хотя в целом оба транспозона дают не противоречивые результаты.

S-SAP-анализ коллекции позволил выделить несколько облаков концентрации образцов яблони, связанных как эколого-географической общностью, так и филогенетическим родством.

Так, группа А (рис. 12 и 13) включает виды европейского и центрально-азиатского региона, относящихся к секции *Malus* - *M. sieversii* (75, 76, 87, 129, 130), *M. orientalis* (65-67, 121-123), *M. turkmenorum* (89, 95, 131), *M. neidzwetskyana* (63, 64, 119, 120), *M. sylvestris* (69, 77-79) и *M. asiatica* (41), сорта вида *M. domestica* (10-38, 82, 83, 90, 96). Как уже было отмечено выше, Н.И. Вавилов определил Центральную Азию, в том числе и современную территорию Тянь-Шаня на границе с Казахстаном, Узбекистаном, Киргизией и Китаем в качестве центра происхождения домашней яблони *M. domestica*. (Vavilov, 1930). Одомашнивание яблони началось примерно 4000 лет назад

на территории Ближнего Востока (Zohary *et al.*, 2000) с последующим распространением плодовой культуры по Шелковому пути в Европу и Северную Африку (Juniper *et al.*, 2006). Основным предком яблони домашней *M. domestica* является вид *M. sieversii*, что подтверждается не только сравнением по морфологическим признакам, но и исследованиями последовательностей ДНК двух видов (Watkins *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 2000; Robinson *et al.*, 2001; Forte *et al.* 2002; Harris *et al.*, 2002, Cornille *et al.*, 2012). Популяции вида *M. sieversii* в дикой природе встречаются в горных областях Тянь-Шаня в Центральной Азии. В нашем анализе образцы этого вида также попадают в группу А, объединяются вместе с образцами вида *M. domestica*.

Результаты нашего анализа показывают, что большинство сортов народной селекции Антоновки группируются вместе с образцами сортов домашней яблони на диаграмме РСО-анализа (рис. 13). Исключение составляет Антоновка Ольгинская (4), которая при РСО-анализе по обоим ретротранспазонам выпадает из пула домашних яблонь. Судя по положению на рис. 12 и рис. 13 Антоновка Ольгинская является гибридным видом, в формировании которого принимал участие какой-то вид из секции *Gymnomeles*. Следует отметить, что сорта народной селекции Антоновки по ряду хозяйственных характеристик отличаются от типичных сортов домашних яблонь. Особое внимание к исследованию этих яблонь объясняется наличием у них таких хозяйственно-ценных признаков, как устойчивость ко многим сельскохозяйственным вредителям, а также устойчивость к низким температурам (Visser *et al.*, 1974; Calenge *et al.*, 2004; Dunemann *et al.*, 2010).

Группа В (рис. 12, 13) включает виды, относящиеся к секции *Gymnomeles* - *M. baccata* (54-56, 110-113, 93), *M. mandshurica* (86, 94), *M. sachalinensis* (72, 125, 126), *M. hupehensis* (60, 118). Ареал произрастания видов данной секции - Восточная Сибирь, Приморье, Северный Китай,

Монголия, Тибет и Гималаи (Барсукова, 2012). Кроме того, в группу В попадают гибридные виды, такие как *M. × robusta* (66), *M. × zumi* (73, 74).

В группу В (рис. 12, 13) также попали виды *M. sargentii* (73, 127) и *M. sieboldii* (74, 128). Традиционные систематики относят эти виды к секции *Sorbomalus*, например, Лангенфельд (1991) данные виды считает экологически и морфологически обособленными разновидностями вида *M. toringo*, секция *Sorbomalus*. Однако, систематик Тарасенко (1941) объединяет данные два вида в одну группу с видом *M. baccata* секции *Gymnomeles* по эколого-географическому принципу и признакам строения органов. Наши данные больше подтверждают последнее предположение.

Также в группу В попал вид *M. pallasiana* (68), который по мнению ряда авторов (Барсукова, 2012) является одной из форм яблонь секции *Sorbomalus*. Данный вид представляет интерес как декоративное растение. На основании результатов наших исследований мы подтверждаем, что вид *M. pallasiana* относится к секции *Gymnomeles*.

Наш анализ позволил также выявить единственную форму одомашненной яблони, который не относится к виду *M. domestica*. Это яблоня Якутская (39), обладающий повышенной зимостойкостью. Во всех случаях анализа Якутская попадает в группу В, включающую виды секции *Gymnomeles*. Следовательно, данная форма не относится к виду *M. domestica*, как считалось ранее, а является результатом одомашнивания одного из видов ягодных яблонь.

Виды, представляющие группу С, входят в секцию *Sorbomalus*, произрастают на территории Центральной Азии - *M. honanensis* (117) и Восточной Азии - *M. transitoria* (80), *M. kansuensis* (62), североамериканский вид *M. fusca* (116). Данные виды сильно отличаются по хозяйственно-ценным признакам и устойчивости к патогенам от европейско-азиатского пула, в культуре известны в основном благодаря своим декоративным характеристикам. Филогенетически секция делится на три ветви – серии

Yunnanenses, *Kansuenses* и *Toringonae* (Лангенфельд, 1991). Отдельно стоит отметить вид *M. florentina* (59, 115) - яблоня флорентийская, которая в диком виде распространена в Северной Италии, встречается в Югославии (Барсукова, 2012). Происхождение и филогенетическое положение вида до сих пор не выяснено, многие авторы утверждают, что *M. floribunda* является гибридом видов секций *Malus* и *Sorbomalus*. Phipps *et al.* (1990) даже выделяет вид *M. florentina* в отдельную секцию *Florentinae*. Cheng *et al.* (2001) описал *M. florentina* как китайский вид, также выделяя его в новую секцию *Florentinae*, однако точного описания секции не приводит. Лангенфельд (1991) относит данный вид к секции *Sorbomalus* на основании морфологических и эколого-географических признаков. Однако, Robinson *et al.* (2001), опираясь на данные молекулярных исследований вида, говорит о наличии больших генетических различий между *M. florentina* и видами секции *Sorbomalus*, что делает невозможным включение данного вида в эту секцию. В наших исследованиях оба образца *M. florentina* (59, 115) группируются вместе с образцами *Sorbomalus*, следовательно, данный вид относится именно к этой секции.

Представляет интерес вид *M. sikkimensis* (88), секция *Docyniopsis*, произрастающий в Восточных Гималаях и горных лесах Сиккима (Барсукова, 2012). Это секция включает наиболее древние по происхождению яблони, которые относят к первичным яблоням, так как они сочетают в себе наиболее примитивные признаки из всех ныне существующих видов рода *Malus*. Следует отметить, что существуют исследования, предполагающие, что *M. sikkimensis* довольно близок к виду *M. baccata* из секции *Gymnomeles* (Krusmann, 1984-1986; Forsline *et al.*, 2003). При РСО-анализе *M. sikkimensis* (88) попадает в группу В, которая включает виды секции *Gymnomeles* (рис. 12, 13). Таким образом, необходимо провести дополнительные исследования вида *M. sikkimensis* с привлечением большего числа образцов.

Подгруппа c1 включает виды секции *Chloromeles* – *M. ioensis* (61) и *M. coronaria* (58). Это яблони Северной Америки, исторически произрастающие в Центральном и Восточном штатах США и на юге Канады. Это особая ветвь эволюции яблони в Северной Америке, имевшая здесь широкое распространение. Данные яблони приспособились к распространению семян с помощью наземных животных (Лангенфельд, 1991).

Образцы гибридных видов на всех диаграммах занимают промежуточное положение между основными группами. Гибридные виды образовались на границах ареалов произрастания негибридных видов, являются более устойчивыми к патогенам и к неблагоприятным условиям среды, чем истинные виды (Урбанович и др., 2010). К таким видам относятся *M. × cerasifera* (42-44, 99, 100), *M. × spectabilis* (52, 92), *M. × purpurea* (48-50, 105, 106), *M. × prunifolia* (47, 102-104), *M. × arnoldiana* (40), *M. × floribunda* (45, 101), а также гибриды с участием яблони домашней *M. sargentii* × сорт Ренет Симиренко (97) и *M. sieboldii* × сорт Спартан (98).

Таким образом, нами были разработаны высоко-полиморфные S-SAP-маркеры на основе сайтов встраивания LTR-ретротранспозонов dem1 и TRIM2. Данные маркеры были успешно использованы для изучения генетического разнообразия образцов рода *Malus*, а также для уточнения некоторых вопросов филогении и таксономии рода *Malus*. Также была подтверждена видовая принадлежность сортов народной селекции Антоновок и формы яблони Якутская. Показано, что виды *M. sargentii* (73, 127) и *M. sieboldii* (74, 128) достоверно относятся к секции *Gymnomeles*. Помимо этого, подтверждено, что гибридные виды образовались в результате скрещивания истинных видов на границе ареалов их естественного распространения

Рис. 12. PCO-анализ образцов рода *Malus* по данным S-SAP-маркирования на основе сайтов встраивания LTR-ретротранспозона dem1.

▲ - гибридные виды; ● - сорта народной селекции Антоновки; ■ - яблоня Якутская

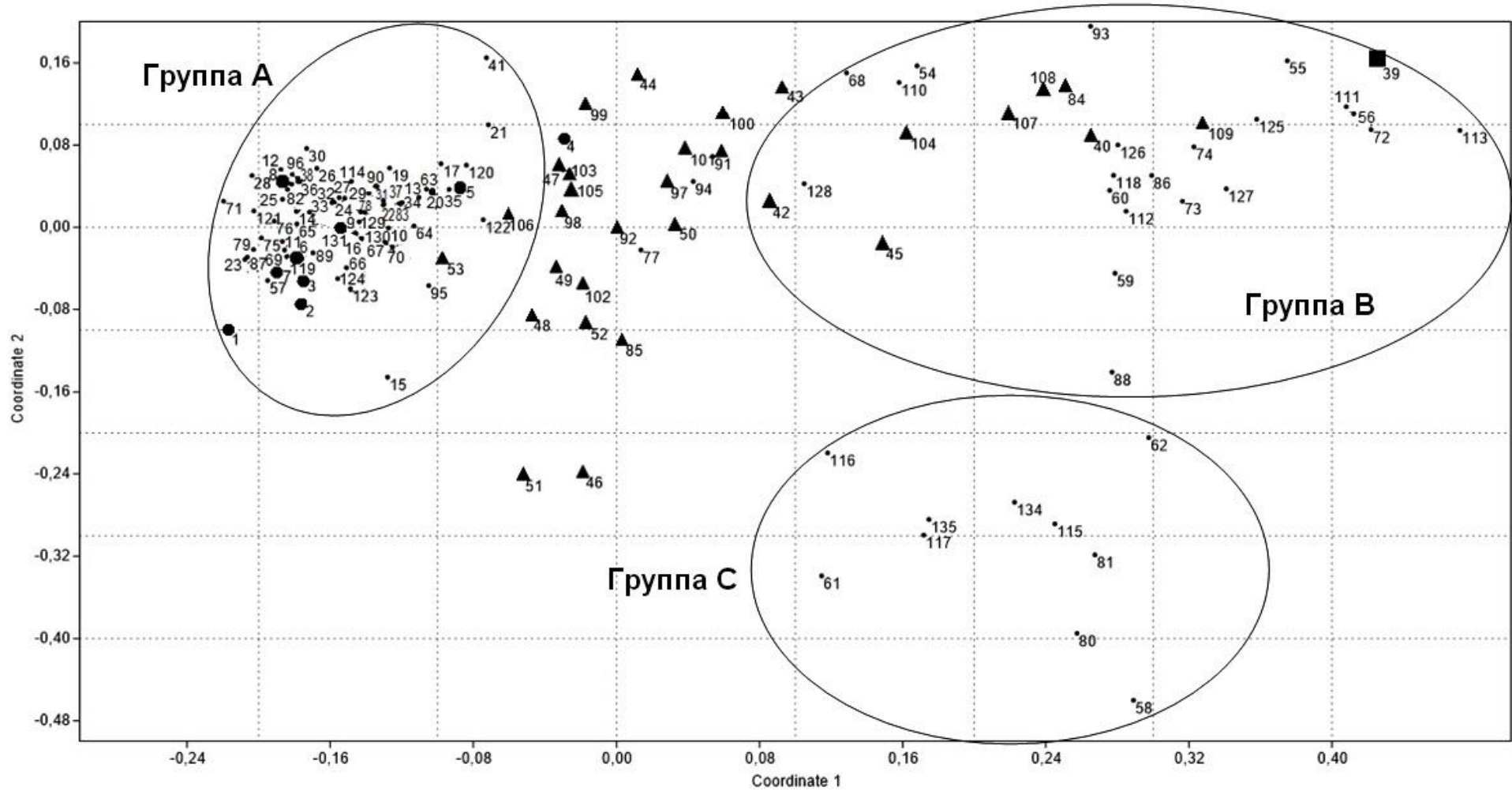


Рис. 14. Neighbour-Joining кластеризация образцов рода *Malus* по данным S-SAP-маркирования на основе сайтов встраивания LTR-ретротранспозона TRIM2

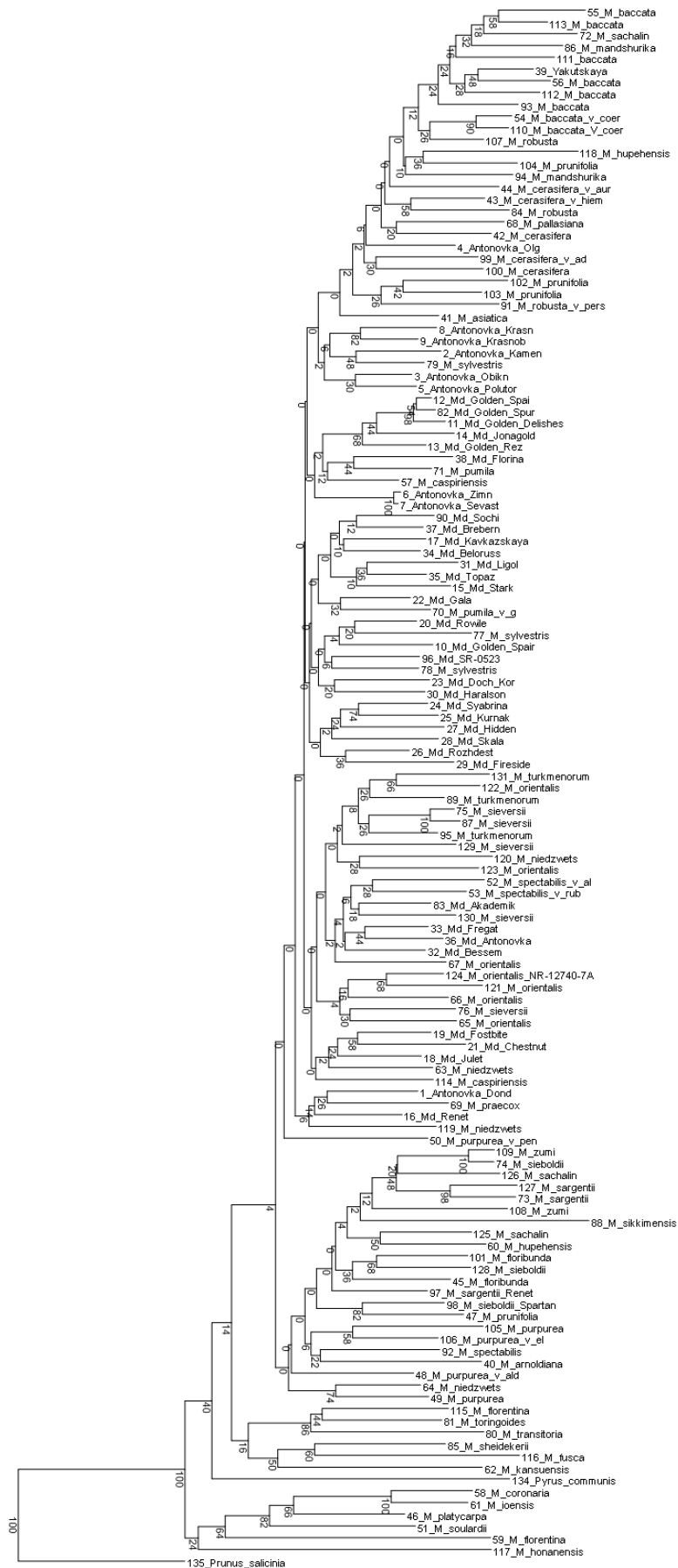
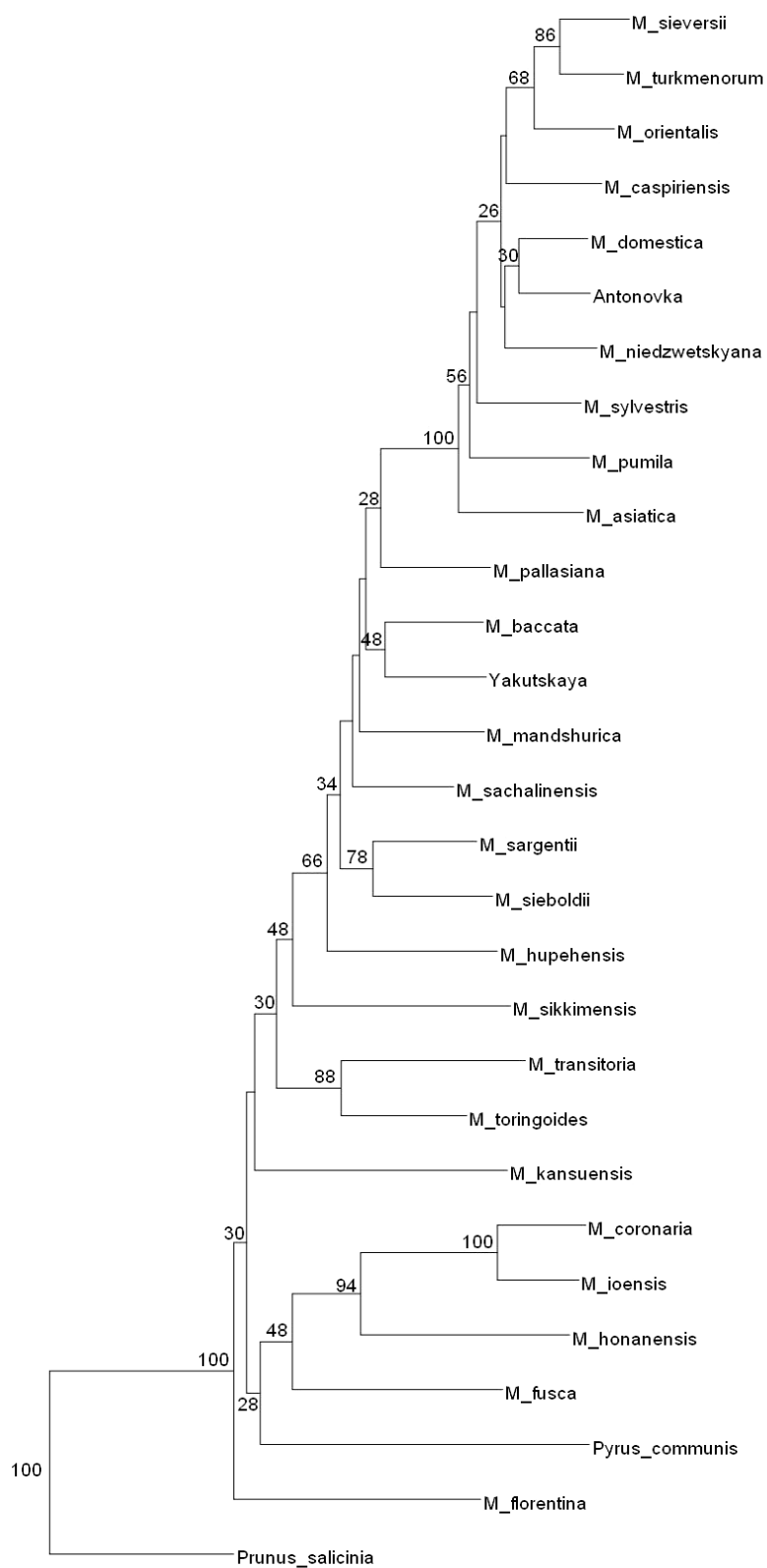


Рис. 15. Neighbour-Joining кластеризация образцов рода *Malus* по данным S-SAP-маркирования на основе сайтов встраивания LTR-ретротранспозона TRIM2 методом обобщенного генотипа



3.4. NBS-профайлинг образцов рода *Malus Mill.*

NBS-профайлинг (nucleotide binding site - нуклеотид связывающий домен) является сравнительно новой технологией молекулярного маркирования (van der Linden *et al.*, 2004), и в настоящее время широко используется для анализа внутри- и межвидового полиморфизма последовательностей семейства NBS-LRR генов резистентности (R-генов) у различных видов растений (Wang *et al.*, 2008; Calenge *et al.*, 2005; Syed *et al.*, 2006).

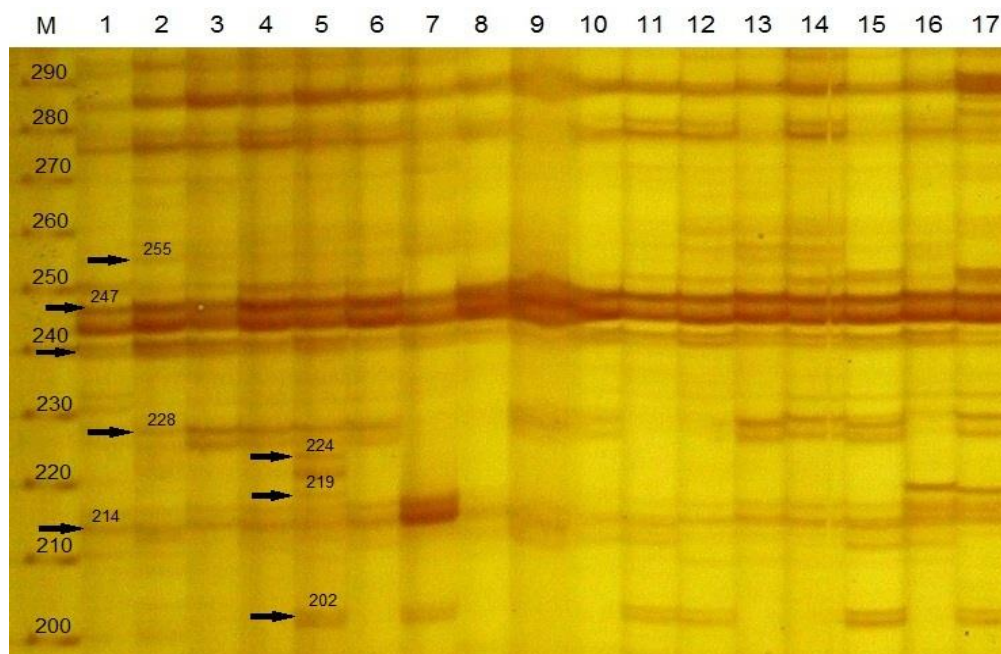
В настоящей работе был использован метод NBS-профайлинга для анализа полиморфизма и филогенетических отношений последовательностей семейства NBS-LRR генов устойчивости к заболеваниям у различных видов рода *Malus*.

NBS-профайлинг 89 образцов коллекции рода *Malus* позволил идентифицировать 209 фрагментов (83 фрагмента для праймера NBS 2 и 126 фрагментов для праймера NBS 5), из которых 165 оказались полиморфными (рис. 16). Таким образом, уровень полиморфизма составил примерно 79 %.

Результаты анализа были суммированы в виде бинарной матрицы (1/0) в программе Microsoft Excel. Далее был проведен многомерный анализ по двум главным координатам (PCO) в программе PAST 3.10, в которой автоматически были рассчитаны коэффициенты попарного генетического сходства/различия между образцами (использовался коэффициент Дайса – Dice coefficient) (Hammer *et al.*, 2001). Величина коэффициента генетических различий (GD) варьировала от 0,573 (*M. soulardii* (51) и *M. sieboldii* (74) до 0,967 (*M. domestica* Golden Rezistern (13) и *M. domestica* Spay Gold (12) и в среднем составила 0,797.

В целом, полученные данные по NBS-профайлингу образцов рода *Malus* совпадают с данными, полученными в результате AFLP- и S-SAP-маркирования. Полученная диаграмма представлена на рис. 17.

Рис. 16. Фрагмент профиля, полученного с помощью праймера NBS 5 (табл. 5).
Нумерация образцов согласно табл. 1. М – маркер молекулярного веса; стрелками
обозначены примеры полиморфных фрагментов на геле



На полученной диаграмме можно выделить облака концентрации образцов яблони, такие как группы (А (подгруппа a1), В, С, D).

Группа А включает виды секции *Malus*: *M. asiatica* (41), *M. sieversii* (75, 76), *M. sylvestris* (69, 77-79), *M. orientalis* (65 - 67), *M. turkmenorum* (95), *M. caspiensis* (57), *M. pumila* (70, 71), *M. niedzwetskyana* (63, 64), а также сорта вида *M. domestica* (10 – 38, 82).

Все дикие виды секции *Malus* смещены к нижнему полюсу группы, в то время как сорта яблони домашней смещены к верхнему полюсу на диаграмме.

Интересно отметить, что сорта народной селекции Антоновки также находятся в группе А, однако большинство из них занимает центральное положение в группе (1-7), не смешиваясь с сортами яблони домашней или дикими видами. Антоновка Красная (8) и Антоновка Краснобочка (9), смещены к полюсу с сортами яблони домашней *M. domestica*. Наши предыдущие исследования показали, что данные сорта народной селекции

можно достоверно отнести к секции *Malus*. Результаты NBS-профайлинга еще раз указывают на уникальность Антоновок, как ценного генетического материала, они обладают отличным от яблони домашней набором генов устойчивости к широкому спектру заболеваний, могут служить ценным генетическим материалом при проведении селекционных скрещиваний для получения новых сортов яблони.

Следует также отметить еще один образец из коллекции сортов яблони домашней – Сочи 26/1 (90). На рис. 17 он объединяется вместе с сортами народной селекции Антоновки, подгруппа a1. Данный образец относится к элитной форме (то есть обладает ценными хозяйственными признаками), при прохождении государственного сортоиспытания может получить статус сорта. Сочи 26/1 обладает иммунитетом к парше яблони, в дальнейшем может использоваться как родительская форма для создания новых сортов.

Кроме того, в группу А попадают два вида *M. × cerasifera* (42) и *M. × arnoldiana* (40), их положение смещено к нижнему полюсу группы. Оба вида являются гибридными, образовались с участием видов из разных секций, в том числе секции *Malus*.

Группа В на диаграмме (рис. 17) включает виды секции *Gymnomeles*: *M. baccata* (54-56, 93), *M. mandshurica* (94), *M. sachalinensis* (72), *M. pallasiana* (68), *M. hupehensis* (60). Следует отметить, что яблони Якутская (39) также входит в группу В. Ранее считалось, что данная форма относится к яблоне домашней. Якутская обладает сходными R-генами с видами секции *Gymnomeles* и может использоваться в селекционном процессе для выведения новых сортов яблони. Помимо этого, в группу В входят *M. sargentii* (73), *M. sieboldii* (74), которые традиционные систематики относят к секции *Sorbomalus* (Барсукова, 2012). По результатам филогенетических отношений последовательностей семейства NBS-LRR генов резистентности данные виды оказались ближе к видам секции *Gymnomeles*.

Группа С включает виды секции *Sorbomalus*: *M. florentina* (59), *M. kansueinsis* (62), *M. toringoides* (81), *M. transitoria* (80). Также в данную группу входят два гибридных вида *M. × floribunda* (45) и *M. × prunifolia* (47).

В группу D входят два североамериканских вида секции *Chloromeles* - *M. coronaria* (58), *M. ioensis* (61). Данные виды устойчивы к парше и мучнистой росе, используются в основном как декоративные растения (Барсукова, 2012).

Гибридные виды яблони занимают в основном промежуточное положение между группами на диаграмме: *M. × cerasifera* (43, 44), *M. × purpurea* (48-50), *M. × spectabilis* (52, 53, 92), *M. × platycarpa* (46), *M. × robusta* var. *persicifolia* (91), *M. × soulardii* (51). Как было указано ранее, они возникли на границах ареалов произрастания видов яблони из различных секций и являются более устойчивыми к патогенам и к неблагоприятным условиям среды, чем негибридные виды (Барсукова, 2012).

Как уже было замечено выше, на диаграмме рис. 17, полученной в результате РСО-анализа образцов рода *Malus*, сорта народной селекции Антоновки занимают промежуточное положение между дикими видами секции *Malus* и сортами яблони домашней *M. domestica*. Таким образом, цель дальнейшего анализа Антоновок состояла в поиске уникальных последовательностей, которые позволили объединить практически все Антоновки в единую группу. Для этого полученные по NBS-профайлингу данные были проанализированы методом двумерного кластерного анализа (Neighbour-Joining), генетические расстояния были рассчитаны автоматически по коэффициенту Дайса. Разработка данного алгоритма программы была сделана в лаборатории генетики растений ИОГен РАН на базе программы STATISTICA v. 6 (StatSoft I. N. S., 2001). Таким образом, была получена двумерная матрица, которая позволила выявить фрагменты максимального сходства образцов яблони (рис. 18). На полученной матрице выделяются две группы фрагментов (выделены пунктиром, группа 1 –

фрагменты (п.н.): 196, 144, 142, 81, 156, 208, группа 2 – фрагменты (п. н.):109, 315), которые не только четко выделяют кластер Антоновок от остальных сортов яблони домашней, но и возможно являются маркерами уникальных генов устойчивости к заболеваниям. Дальнейшее исследование данных уникальных фрагментов, вероятно, позволит выявить новые гены устойчивости к заболеваниям яблони, что является логическим продолжением данной работы. Таким образом, Антоновки могут быть рекомендованы для использования в маркер-опосредованной селекции (MAS) при создании новых более устойчивых к заболеваниям сортов яблони.

Данные, полученные в результате NBS-профайлинга, во многом подтверждают и дополняют данные, полученные нами ранее в результате исследований образцов рода *Malus*. Метод NBS-профайлинга может успешно применяться для анализа полиморфизма последовательностей семейства NBS-LRR генов устойчивости у видов рода *Malus* и, в целом, для изучения генетического разнообразия рода *Malus*.

Рис. 17. PCO-анализ образцов рода *Malus* по данным NBS-профайлинга.

▲ - гибридные виды; ● - сорта народной селекции Антоновки; ■ - яблоня Якутская

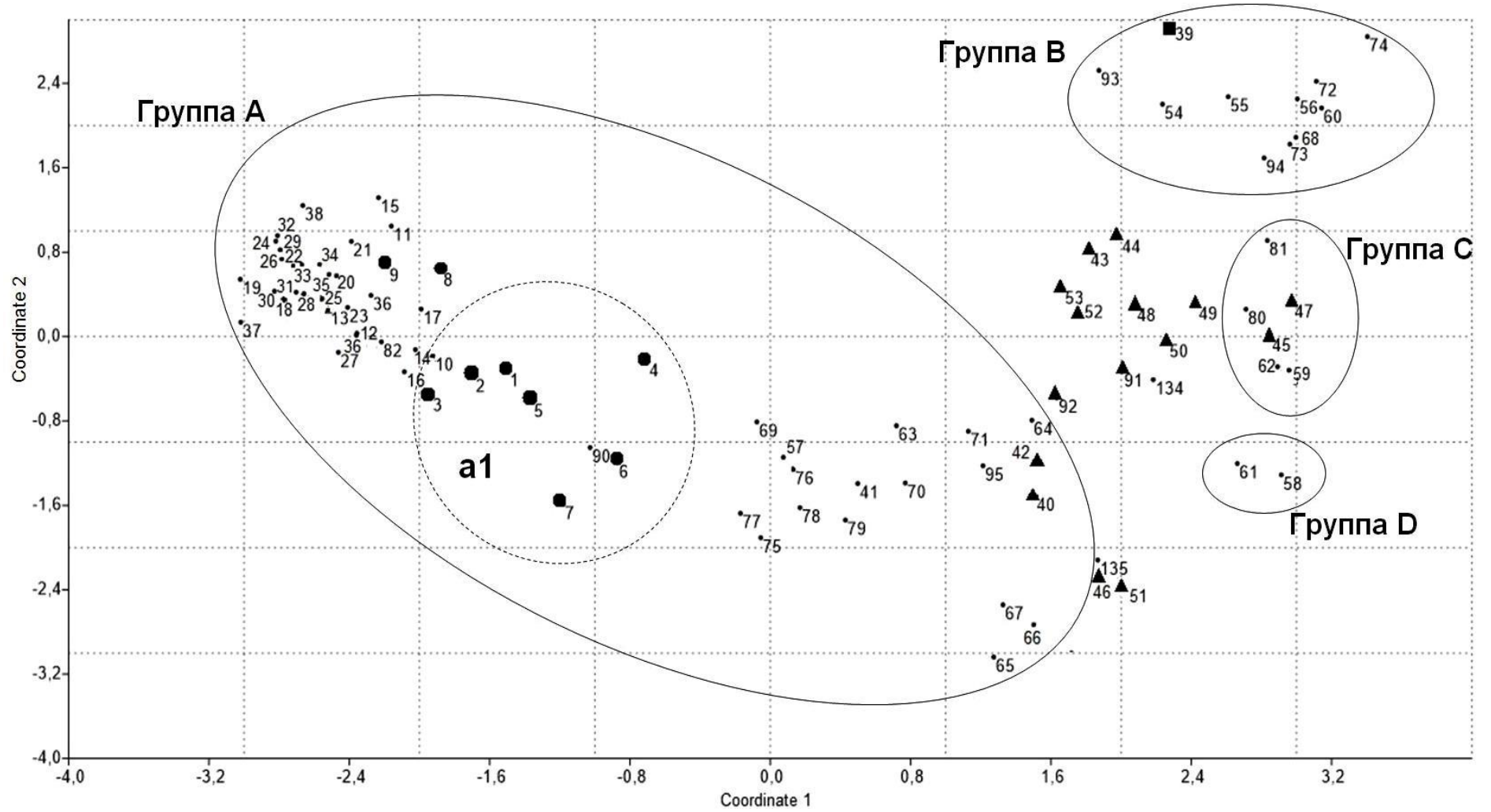
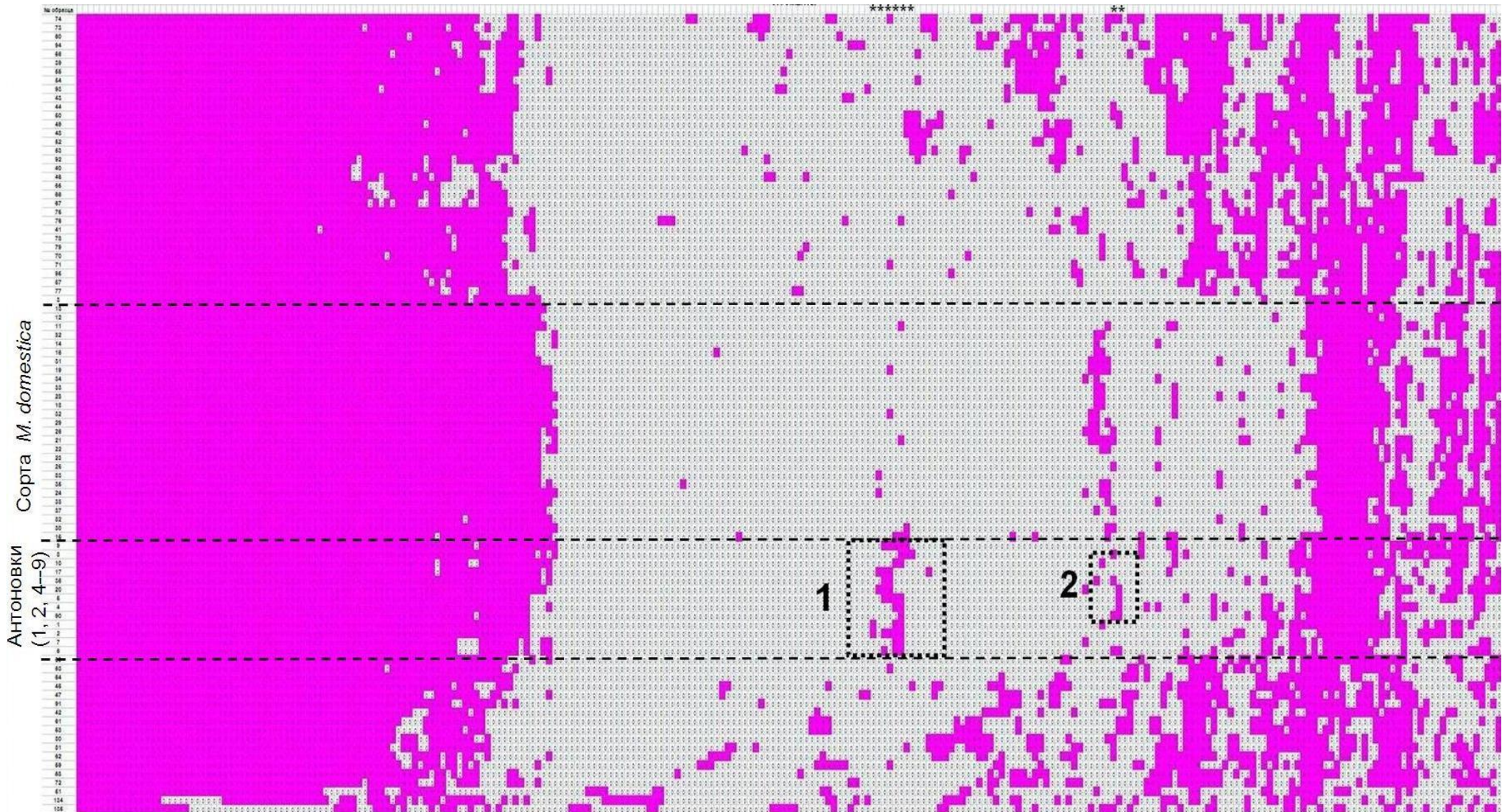


Рис. 18. Матрица, полученная методом двумерного кластерного анализа по данным NBS-профайлинга образцов рода *Malus*



3.5. Обсуждение полученных материалов

Нами было проведено изучение генетического разнообразия рода *Malus* при помощи различных видов молекулярного анализа. Полученные результаты были обработаны, проанализированы, проведено сравнение с ранее выполненными исследованиями по генетической вариабельности рода, уточнены некоторые вопросы филогении и систематики рода.

Для исследования было использовано несколько различных маркерных систем (AFLP, S-SAP, NBS-профайлинг), а также был использован метод анализа секвенированных последовательностей района транскрибируемого спейсера ITS1 и гена 5.8S. Мы были заинтересованы не только в получении определенных результатов по филогении и систематике яблони, но и в сравнении самих молекулярных методов анализа для выявления наиболее информативного и надежного. Также в задачи исследования входило создание рекомендаций по использованию диких видов и сортов яблони в маркер-опосредованной селекции для выведения новых, более устойчивых сортов яблони домашней.

Каждый метод давал достоверные, информативные, воспроизводимые результаты.

Наиболее полиморфными оказались S-SAP-маркеры (95,9%), AFLP-маркеры (90,2%). NBS-маркеры, основанные на последовательностях NBS-LRR генов устойчивости, показали также высокий уровень межвидового полиморфизма (79%). Самый невысокий уровень полиморфизма (14%) был обнаружен для секвенированных последовательностей района транскрибируемого спейсера ITS1 и гена 5.8S, данный район оказался недостаточно вариабельным у изученных образцов рода *Malus*.

PCO-анализ по данным AFLP, S-SAP и NBS-профайлингу также дал сходные результаты, отражающие эволюционные и таксономические взаимоотношения в роде *Malus*. На полученных диаграммах можно выделить несколько облаков концентрации образцов, обозначенные в работе как

группы, включающие представителей пяти различных секций рода *Malus* (*Malus*, *Sorbomalus*, *Cloromeles*, *Gymnomeles*, *Docyniopsis*). Однако в целом все исследованные образцы слабо генетически дифференцированы. Были получены новые данные о видах *M. sargentii* и *M. sieboldii*. На основании полученных нами результатов по AFLP- и S-SAP-маркерам данные виды относятся к секции *Gymnomeles*, а не *Sorbomalus*, как считалось ранее.

Таким образом, проведенный нами PCO-анализ по данным различных маркерных систем в целом подтвердил правомерность использования традиционной классификации рода *Malus*, основанной на морфологических и эколого-географических критериях. Положение гибридных видов на каждой диаграмме подтверждает их происхождение.

Положение сортов народной селекции Антоновок на диаграммах различается. Так, в результате PCO-анализа по данным NBS-профайлинга некоторые Антоновки занимают обособленную позицию в группе А, в то время как на диаграммах по AFLP- и S-SAP-маркерам Антоновки расположены вместе с сортами яблони домашней *M. domestica*. NBS-маркеры достоверно показали, что сорта народной селекции Антоновки обладают уникальным набором генов устойчивости к заболеваниям, отличающимся от яблони домашней. Этот результат особенно важен для главного метода молекулярной селекции – маркер-опосредованной селекции (Marker assisted selection – MAS). Разработка NBS-маркеров особенно важна для поиска генов, контролирующих хозяйственно-ценные признаки, главным из которых в настоящее время является устойчивость к различным заболеваниям яблони.

Маркерные системы (AFLP, S-SAP), а также метод анализа секвенированных последовательностей района транскрибируемого спейсера ITS1 и гена 5.8S, использованные в работе, отразили эволюционные взаимоотношения в роде *Malus*, данные могут использоваться для оценки генетического разнообразия рода, уточнения вопросов филогении.

Сравнительный анализ данных по NBS-, AFLP- и S-SAP-маркерам может дать полезную информацию о роли генов устойчивости в видообразовании, а также найти их применение в селекционных программах.

В целом, полученные нами результаты показали, что только комплексное использование различных методов молекулярно-генетического анализа для изучения генетического разнообразия рода *Malus* дает достоверные практические результаты, которые также могут найти применение в селекционном процессе выведения новых сортов яблони.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе настоящей работы был проведен анализ внутривидового и межвидового генетического разнообразия образцов рода *Malus* из отечественных коллекций при помощи высокоинформативных AFLP-, S-SAP- и NBS-маркеров с последующей оценкой родственных связей и уточнением вопросов филогении и систематики внутри рода. Также в ходе работы впервые были секвенированы и проанализированы последовательности района транскрибируемого спейсера ITS1 и гена 5.8S рРНК у образцов рода *Malus* отечественных коллекций.

Сравнительный анализ полученных результатов показал, что в целом традиционная классификация рода *Malus*, основанная на морфологических и эколого-географических критериях, может быть использована в дальнейшем для систематики яблони.

Сделаны уточнения по филогенетическим отношениям внутри рода *Malus*. Были даны рекомендации по рациональному использованию генетического разнообразия рода в селекционных программах при выведении новых более устойчивых к заболеваниям сортов яблони. Так, особое внимание было также уделено генетическому разнообразию и филогенетическому статусу отечественных сортов народной селекции Антоновок, которые могут послужить новыми источниками хозяйственно-ценных признаков в селекции яблони.

ВЫВОДЫ

1. Использованные в работе ДНК-маркеры оказались эффективными для анализа внутривидового и межвидового генетического разнообразия в роде *Malus*. Наиболее полиморфными оказались S-SAP- (95,9%) и AFLP-маркеры (90,2%). NBS-маркеры показали также высокий уровень межвидового полиморфизма (79%). Секвенированные последовательности района ITS1 – 5.8S. показали невысокий уровень полиморфизма (14%).
2. Анализ генетического разнообразия рода *Malus* с использованием ДНК-маркеров показал, что род в целом распадается на четыре группы истинных видов. При этом распределение по группам по генетическим признакам соответствует традиционной ботанической систематике, основанной на морфологических и эколого-географических критериях.
3. Подтверждено гибридное происхождение ряда видов, образовавшихся на границах ареалов произрастания истинных видов.
4. Сорты народной селекции Антоновки достоверно относятся к виду яблоня домашняя *M. domestica*, секция *Malus*. Антоновки могут служить ценным генетическим материалом при создании новых более устойчивых сортов яблони, так как они, вероятно, обладают уникальным набором генов устойчивости, отличающим их от селекционных сортов яблони домашней.
5. Форма яблони Якутская достоверно относится к виду *M. baccata*, секция *Gymnomeles*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

1. БП – бутстреп-поддержка
2. ВНИИР им. Н. И. Вавилова – Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства имени Н.И. Вавилова РАН
3. ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина – Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и селекции плодовых растений имени И.В. Мичурина РАН
4. В/см – вольт на сантиметр; напряженность электрического поля
5. ГБС – Главный Ботанический Сад имени Н.В. Цицина РАН
6. ИБ – индекс бутстрепа
7. MAS – marker assisted selection; маркер-опосредованная селекция
8. ПААГ – полиакриламидный гель
9. п.н. – пар нуклеотидов
10. ПЦР – полимеразная цепная реакция
11. сМ – сантиморганид
12. ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
13. AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism; полиморфизм длин амплифицированных фрагментов
14. bp – base pair; пара оснований
15. cpRFLP – Chloroplast restriction fragment length polymorphism; полиморфизм длин рестрикционных хлоропластных фрагментов
16. СТАВ – Cetyltrimethylammonium bromide; гексадецил триметил бромид аммония
17. ETS – external transcribed spacer; внешний транскрибируемый спейсер
18. FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations; Продовольственная и сельскохозяйственная организация объединенных наций

19. GD – Genetic Distance; генетические расстояния
20. GLPL – Gly-Leu-pro-Leu-мотив
21. GRIN – Germplasm Resources Information Network; Информационная сеть генетических ресурсов; информационный проект, предоставляющий генетическую и другую информацию о живых организмах в режиме он-лайн под руководством Департамента сельского хозяйства США.
22. H – heterozygous; уровень гетерозиготности
23. IRAP – Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism; анализ полиморфных участков ДНК, амплифицированных между ретротранспозонами
24. ISSR – Inter Simple Sequence Repeats; анализ полиморфных участков ДНК, амплифицированных между простыми повторяющимися последовательностями-микросателлитами
25. ITS – internal transcribed spacer; внутренний транскрибируемый спейсер
26. LRR – leucine-rich repeat; обогащенный лейцином повтор
27. LTR – long terminal repeats; длинные концевые повторы
28. NBS – nucleotide binding site; нуклеотид связывающий домен
29. NJ - Neighbor-Joining; метод объединения ближайших соседей
30. PCO – principal coordinats analysis; метод главных координат
31. PVP – polyvinyl pyramidon; поливинил пирамидон
32. PVX – Potato Virus X; X вирус картофеля
33. QTL – Quantative Trait Loci; локусы количественных признаков
34. R-гены – Resistance; гены устойчивости
35. RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA; произвольно амплифицируемая полиморфная ДНК
36. RBIP – Retrotransposon Based Insertion Polymorphism; полиморфизм на основе инсерций ретротранспозонов

37. REMAP – Retrotransposon- Microsatellite Amplified Polymorphism; анализ полиморфных участков, амплифицированных между ретротранспозоном и микросателлитом
38. RFLP; ПДРФ – Restriction Fragment Length Polymorphism; полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
39. RGA – Resistance Gene Analogs; аналоги генов устойчивости
40. S-аллели – self-incompatibility alleles – аллели самонесовместимости
41. SNP – Single-Nucleotide Polymorphism; однонуклеотидный полиморфизм
42. S-SAP – Sequence-Specific Amplification Polymorphism; полиморфизм амплификации специфических последовательностей
43. SSR – Simple Sequence Repeat; простая повторяющаяся последовательность
44. STR – Simple Tandem Repeat; простой тандемный повтор, или микросателлит
45. TBE – Tris / Borate / EDTA-buffer; трис-боратный ЭДТА-буфер
46. TRIM – terminal-repeat retrotransposons in miniature; ретротранспозоны с концевыми повторами в миниатюре
47. UPGMA-анализ – Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, метод невзвешенного попарного среднего

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи из перечня рецензируемых научных журналов:

1. Савельева, Е. Н. AFLP-анализ генетического разнообразия в роде *Malus* Mill. (Яблоня) / Е. Н. Савельева, А. М. Кудрявцев // Генетика. – 2015. – Т. 51. – № 10. – С. 1126–1133.
2. Савельева, Е. Н. Сравнительный анализ последовательностей внутреннего транскрибируемого спейсера ITS1 и рибосомного гена 5.8S у видов рода *Malus* / Е. Н. Савельева, Е. З. Кочиева, А. М. Кудрявцев // Генетика. – 2013. – Т. 49. – № 11. – С. 1345–1352.

Тезисы докладов:

1. Savelyeva, E. Analysis of structure ribosomal DNA spacer region (ITS1-5.8S gene) of the genus *Malus* / E. Savelyeva, K. Boris, E. Kocheiva, A. Kudryavtsev. – Plant Genetics and Breeding Technologies, Vienna International Plant Conference Association (VIPCA). Вена. – 2013. – С. 43.
2. Савельева Е. Н. Генетическое разнообразие рода *Malus* по сайтам интеграции LTR-ретротранспозонов AJ291492 и AY603367 / Е. Н. Савельева, А. В. Калегина, А. М. Кудрявцев. – VI Съезд ВОГиС и ассоциированные генетические симпозиумы. Ростов-на-Дону. – 2014. – С. 17-18.
3. Savelyeva E. N. Phylogenetic study of genus *Malus*. SSAP profiling / E. N. Savelyeva, A. M. Kudryavtsev. – XIV International Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics. Болонья. – 2015. – С. 147.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барсукова, О.Н. Генофонд дикорастущих видов яблони / О. Н. Барсукова. – Майкоп: Издательство Майкопской опытной станции ВНИИР им. Н.И. Вавилова, 2012. – 159 с.
2. Булат, С. А. Полимеразная цепная реакция с универсальными праймерами для изучения геномов / С. А. Булат, О. К. Кабоев, Н. В. Мироненко, Л. А. Лучкина // Генетика. – 1992. – Т. 28. – № 5. – С.19-28.
3. Глазко, В. И. Генетически детерминированный полиморфизм ферментов у некоторых сортов сои (*Glicine max*) и дикой сои (*Glicine soja*) / В. И. Глазко // Цитология и генетика. – 2000. – Т. 34. – № 2. – С. 83-90.
4. Глазко, В. И. Генетические взаимоотношения между сортами сои, оцененные с использованием ISSR маркеров / В. И. Глазко, А. В. Дубин, Р. Н. Календарь, Г. В. Глазко, В. И. Шерепитко, А. А. Созинов // Цитология и генетика. – 1999. – Т. 33. – № 5. – С. 47.
5. Дрейпер, Д. Генная инженерия растений / Д. Дрейпер, Р. Скотт, Ф. Армитидж, Г. Дьюри, Л. Джэкоб, Р. Уолден, Р. М. Джефферсон. – Лабораторное руководство. Учебное издание. – М.: Мир, 1991. – 408 с.
6. Дубина, Е. В. Молекулярные маркеры и их использование в селекционно-генетических исследованиях / Е. В. Дубина, Ж. М. Мухина // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2011. – №. 66.
7. Календарь, Р. Н. Типы молекулярно-генетическим маркеров и их применение / Р. Н. Календарь, В. И. Глазко // Физиология и биохимия культурных растений. – 2002. – Т. 34. – № 4.
8. Лангенфельд, В. Т. Яблоня. Морфологическая эволюция, филогения, география, систематика / В. Т. Лангенфельд. – Латвийский университет: Riga “Zinatne”, 1991. – 235 с.

9. Матвеева, Т. В. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений / Т. В. Матвеева, О. А. Павлова, Д. И. Богомаз, А. Е. Демкович, Л. А. Лутова // Экологическая генетика. – 2011. – Т. 9. – №. 1. – С. 32-43.
10. Пономаренко, В.В. Критический обзор системы видов рода *Malus* Mill. (Rosaceae) / В. В. Пономаренко // Сб. научных трудов по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 1992. – Т. 146. – С. 1-10.
11. Седов, Е.Н. Яблоня / Е. Н. Седов. – Помология в 55ти томах. Т. I. ВНИИСПК, 2005. - 151 с.
12. Тарасенко, Г.Г. Яблоня / Г. Г. Тарасенко. – М., 1941. – 171 с.
13. Урбанович, О. Ю. Молекулярные методы и идентификации и генотипирования яблони и груши / О. Ю. Урбанович. – Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск: Право и экономика, 2013. – 210 с.
14. Урбанович, О.Ю. Анализ полиморфизма SSR-локусов видов *Malus* / О. Ю. Урбанович, З. А. Козловская, А. А. Хацкевич, Н. А. Картель // Вести Национальной академии наук Беларуси. Серия биол. наук. – 2010. – № 1. – С. 12-17.
15. Хлесткина, Е. К. Молекулярные методы анализа структуро-функциональной организации генов и геномов высших растений / Е. К. Хлесткина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – Т. 15. - № 4. – С. 757-768.
16. Aarts, M. G. M. Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana* // M. G. M. Aarts, B. Lintel Hekkert, E. B. Holub, J. L. Beynon, W. J. Stiekema, A. Pereira // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 1998. – Т. 11. – №. 4. – С. 251-258.
17. Abdel-Mawgood, A.L. DNA based techniques for studying genetic diversity in microorganisms / A.L. Abdel-Mawgood // INTECH Open Access Publisher. – 2012. – С. 95-122.

18. Aldwinckle, H. S. Pathogenic races of *Gymnosporangium juniperi-virginianae* on apple / H. S. Aldwinckle // *Phytopathology*. – 1975. – T. 65. – №. 9. – C. 958-961.
19. Alper, I. Ribosomal DNA polymorphisms in the yeast *Geotrichum candidum* / I. Alper, M. Frenette, S. Labrie // *Fungal biology*. – 2011. – T. 115. – №. 12. – C. 1259-1269.
20. Álvarez, I. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference / I. Álvarez, J. F. Wendel // *Molecular phylogenetics and evolution*. – 2003. – T. 29. – №. 3. – C. 417-434.
21. Ameline-Torregrosa, C. Identification and characterization of nucleotide-binding site-Leucine-rich repeat genes in the model plant *Medicago truncatula* / C. Ameline-Torregrosa, B.-B. Wang, M. S. O’Bleness, S. Deshpande, H. Zhu, B. Roe, S. B. Cannon // *Plant physiology*. – 2008. – T. 146. – №. 1. – C. 5-21.
22. Andolfo, G. Overview of tomato (*Solanum lycopersicum*) candidate pathogen recognition genes reveals important *Solanum* R locus dynamics / G. Andolfo, W. Sanseverino, S. Rombauts, Y. Peer, J. M. Bradeen, D. Carputo, M. R. Ercolano // *New Phytologist*. – 2013. – T. 197. – №. 1. – C. 223-237.
23. Antonius-Klemola K. TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports / K. Antonius-Klemola, R. Kalendar, A.H. Schulman // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2006. – T. 112. – №. 6. – C. 999-1008.
24. Bagga, H. S. Genes in *Venturia inaequalis* controlling pathogenicity to crabapples / H. S. Bagga, D. M. Boone // *Phytopathology*. – 1968. – T. 58. – №. 8. – C. 1176.
25. Bai Y. QTLs for tomato powdery mildew resistance (*Oidium lycopersici*) in *Lycopersicon parviflorum* G1.1601 co-localize with two qualitative powdery mildew resistance genes / Y. Bai, C. C. Huang, R. van der Hulst, F.

Meijer-Dekens, G. Bonnema, P. Lindhout // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2003. – T. 16. – № 2. – C. 169-176.

26. Baldwin, B. G. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny / B. G. Baldwin, M. J. Sanderson, J. M. Porter, M.F. Wojciechowski, C. S. Campbell, M. J. Donoghue // *Annals of the Missouri Botanical Garden*. – 1995. – C. 247-277.

27. Baldwin, S. Development of robust genomic simple sequence repeat markers for estimation of genetic diversity within and among bulb onion (*Allium cepa* L.) populations / S. Baldwin, M. Pither-Joyce, K. Wright, L. Chen, J. McCallum // *Molecular Breeding*. – 2012. – T. 30. – № 3. – c. 1401-1411.

28. Barkley, N. A. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs) / N. A. Barkley, M. L. Roose, R. R. Krueger, C. T. Federici // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2006. – T. 112. – № 8. – C. 1519-1531.

29. Baudoin, J. P. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels / J. P. Baudoin, G. Mergeai, H. Benbouza, J. M. Jacquemin // *Base*. – 2007. – T. 10. - № 2.

30. Berenyi, M. *Ty1-copia* retrotransposon-based S-SAP (sequence-specific amplified polymorphism) for genetic analysis of sweetpotato / M. Berenyi, S. Gichuki, J. Schmidt, K. Burg // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2002. – T. 105. – № 6-7. – C. 862-869.

31. Bernardo, R. Molecular markers and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years / R. Bernardo // *Crop Science*. – 2008. – T. 48. – № 5. – C. 1649-1664.

32. Binneck, E. RAPD analysis on cultivar identification: a useful methodology? / E. Binneck, J. L. Nedel, O. A. Dellagostin // *Revista Brasileira de Sementes*. – 2002. – T. 24. – № 1. – C. 183-196.

33. Blair, M. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.) / M. W. Blair, O. Panaud, S. R. McCouch // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1999. – T. 98. – № 5. – C. 780-792.
34. Boone, D. M. *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. 12. Genes controlling pathogenicity of wild-typhelines / D. M. Boone, G. W. Keitt // *Phytopathology*. – 1957. – T. 47. – № 7. – C. 403-409.
35. Bottini, M. C. J. AFLP characterization of natural populations of *Berberis* (*Berberidaceae*) in Patagonia, Argentina / M. C. J. Bottini, A. De Bustos, N. Jouve, L. Poggio // *Plant Systematics and Evolution*. – 2002. – T. 231. – № 1. – C. 133-142.
36. Bretting, P. K. Genetic markers and plant genetic resources / P. K. Bretting, M. P. Widrechner // *Plant Breeding Reviews*. – 1995. – T. 13. – C. 11-86.
37. Brown, P. T. H. RFLP analysis of *Zea mays* callus cultures and their regenerated plants / P. T. H. Brown, E. Göbel, H. Lörz // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1991. – T. 81. – № 2. – C. 227-232.
38. Brown, T. A. The complex origins of domesticated crops in the Fertile Crescent / T. A. Brown, M. K. Jones, W. Powell, R. G. Allaby // *Trends in Ecology and Evolution*. – 2009. – T. 24. – № 2. – C. 103-109.
39. Brugmans, B. Genetic mapping and transcription analyses of resistance gene loci in potato using NBS-profiling // B. Brugmans, D. Wouters, H. van Os, R. Hutten, G. van der Linden, R. G. F. Visser, H. J. van Eck, E. A. G. van der Vossen // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2008. – T. 117. – № 8. – C. 1379-1388.
40. Buckler, E. S. The evolution of ribosomal DNA divergent paralogues and phylogenetic implications / E. S. Buckler, A. Ippolito, T. P. Holtsford // *Genetics*. – 1997. – T. 145. – № 3. – C. 821-832.

41. Bus, V. G. M. The Vh2 and Vh4 scab resistance genes in two differential hosts derived from Russian apple R12740-7A map to the same linkage group of apple / V. G. M. Bus, E. H. A. Rikkerink, W. E. van de Weg, R. L. Rusholme, S. E. Gardiner, H. C. M. Bassett, K. M. Plummer // *Molecular Breeding*. – 2005. – T. 15. – №. 1. – C. 103-116.

42. Bussell, J. D. Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic inference / J. D. Bussell, M. Waycott, J. A. Chappill // *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. – 2005. – T. 7. – №. 1. – C. 3-26.

43. Calenge, F. Quantitative trait loci (QTL) analysis reveals both broad_spectrum and isolate_specific QTL for scab resistance in an apple progeny challenged with eight isolates of *Venturia inaequalis* / F. Calenge, A. Faure, M. Goerre // *Phytopatology*. – 2004. – T. 94. – № 4. – C. 370-379.

44. Calenge, F. Resistance gene analogues identified through the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple / F. Calenge, C. G. van der Linden, E. van de Weg, H. J. Schouten, G. Van Arkel, C. Denance, C. E. Durel // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2005. – T. 110. – №. 4. – C. 660-668.

45. Cargill, M. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes / M. Cargill, D. Altshuler, J. Ireland, P. Sklar, K. Ardlie, N. Patil, L. Ziaugra // *Nature genetics*. – 1999. – T. 22. – №. 3. – C. 231-238.

46. Challice, J. S. *Rosaceae chemotaxonomy and the origins of the Pomoideae* / J. S. Challice // *Botanical Journal of the Linnean Society*. – 1974. – T. [69](#). – [№ 4](#). – C. 239-259.

47. Challice, J. S. Numerical taxonomic studies of the genus *Pyrus* using both chemical and botanical characters / J. S. Challice, M. N. Westwood // *Botanical Journal of the Linnean Society*. – 1973. – T. 67. – № 2. – C. 121-148.

48. Cheng, M. H. Study on the taxonomy of *Malus florentina* (Zuccagni) C. K. Schneid / M. H. Cheng, X. H. Yang, Y. G. Zhang, H. P. Deng, X. L. Li //

Journal of Southwest Agricultural University (China). – 2001. – T. 23 – C. 481-483.

49. Cheng, Y. Systematic analysis and comparison of nucleotide-binding site disease resistance genes in maize / Y. Cheng, X. Li, H. Jiang, W. Ma, W. Miao, T. Yamada, M. Zhang // FEBS Journal. – 2012. – T. 279. – №. 13. – C. 2431-2443.

50. Coart, E. Genetic variation in the endangered wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) in Belgium as revealed by amplified fragment length polymorphism and microsatellite markers / E. Coart, X. Vekemans, M. J. M. Smulders, I. Wagner, J. van Huylenbroeck, E. van Bockstaele, I. Roldn-Ruiz // Molecular Ecology. – 2003. – T. 12. – № 4. – C. 845-857.

51. Collins, F. S. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation / F. S. Collins, L. D. Brooks, A. Chakravarti // Genome research. – 1998. – T. 8. – №. 12. – C. 1229-1231.

52. Collins, N. C. The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize // N. c. Collins, C. A. Webb, S. Seah, J. G. Ellis, S. H. Hulbert, A. Pryor // Molecular plant-microbe interactions. – 1998. – T. 11. – №. 10. – C. 968-978.

53. Conner, P. J. Molecular-marker analysis of quantitative traits for growth and development in juvenile apple trees / P. J. Conner, S. K. Brown, N. F. Weeden // Theoretical and Applied Genetics. – 1998. – T. 96. – №. 8. – C. 1027-1035.

54. Conner, P. J. Randomly amplified polymorphic DNA-based genetic linkage maps of three apple cultivars / P. J. Conner, S. K. Brown, N. F. Weeden // Journal of the American Society for Horticultural Science (JASHS). – 1997. – T. 122. – № 3. – C. 350-359.

55. Cornille, A. Postglacial recolonization history of the European crabapple (*Malus sylvestris* Mill.), a wild contributor to the domesticated apple // A. Cornille, T. Giraud, C. Bellard, A. Tellier, B. Le Cam, M. J. M. Smulders, J.

kleinschmit, I. Roland-Ruiz, P. Gladieux // *Molecular Ecology*. – 2013. – T. 22. – № 8. – C. 2249-2263.

56. Cornille, A. The domestication and evolutionary ecology of apples // A. Cornille, T. Giraud, M. J. M. Smulders, I. Roldán-Ruiz, P. Gladieux // *Trends in Genetics*. – 2014. – T. 30. – № 2. – C. 57-65.

57. Cornille, A. New Insight into the History of Domesticated Apple: Secondary Contribution of the European Wild Apple to the Genome of Cultivated Varieties / A. Cornille, P. Gladieux, M. J. M. Smulders, I. Roldán-Ruiz, F. Lois Laurens, B. Le Cam, A. Nersesyan, J. Clavel, M. Olonova, L. Feugey, I. Gabrielyan, X. Zhang, M. I. Tenailon, T. Giraud // *PLoS Genet.* - 2012. – T. 8 - № 5. – C. e1002703.

58. Dangl, J. Plant pathogens and integrated defense responses to infection / J. Dangl, J. Jones // *Nature*. – 2001. – T. 411. – №. 6839. – C. 826-833.

59. Darlington, C. D. Primary and secondary chromosome balance in *Pyrus* /, C. D. Darlington, A. A. Moffett // *Significance*. – 1930. – T. 146. – №. 149. – C. 129-151.

60. Deng, Z. Cloning and characterization of NBS-LRR class resistance-gene candidate sequences in citrus / Z. Deng, S. Huang, P. Ling, C. Chen, C. Yu, C. A. Weber, G. A. Moore, F. G. Gmitter // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2000. – T. 101. – №. 5-6. – C. 814-822.

61. Depypere, L. A combined morphometric and AFLP based diversity study challenges the taxonomy of the European members of the complex *Prunus* L. section *Prunus* / L. Depypere, P. Chaerle, P. Breyne, K. Vander Mijnsbrugge, P. Goetghebeur // *Plant Systematics and Evolution*. – 2009. – T. 279. – № 1-4. – C. 219-231.

62. Derman, H. Are the pomes amphidiploid? A note on the origin of the *Pomoideae* / H. Derman // *Journal of Heredity*. – 1949. – T. 40. – № 8. – C. 221-222.

63. Diamond, J. Guns, germs, and steel: the fates of human societies / J. Diamond, L. E. Ford. – New York: W. W Norton, 1997.
64. Dirlewanger, E. Development of microsatellite markers in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch.) and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.) // E. Dirlewanger, P. Cosson, M. Tavaud, M. Aranzana, C. Poizat, A. Zanetto, P. Arús, F. Laigret // Theoretical and Applied Genetics. – 2002. – T. 105 – № 1. – C. 127-138.
65. Diwan, N. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean / N. Diwan, P. B. Cregan // Theoretical and applied genetics. – 1997. – T. 95. – №. 5-6. – C. 723-733.
66. Dunemann F. A major resistance gene from Russian apple “Antonovka” conferring field immunity against apple scab is closely linked to the *Vf* locus / F. A. Dunemann, J. Egerer // Tree Genetics and Genomes. – 2010. – T. 6. – № 5. – C. 627-633.
67. Dunemann, F. Genetic relationships in *Malus* evaluated by RAPD ‘Fingerprinting’ of cultivars and wild species / F. Dunemann, R. Kahnau, H. Schmidt // Plant Breeding. – 1994. – T. 113. – № 2. – C. 150-159.
68. Ellis T. H. N. Polymorphism of insertion sites of *Ty1-copia* class retrotransposons and its use for linkage and diversity analysis in pea / T. H. N. Ellis, S. J. Poyser, M. R. Knox, A. V. Vershinin, M. J. Ambrose // Molecular and General Genetics. – 1998. – T. 260. – № 1. – C. 9-19.
69. Emanuelli, F. Genetic diversity and population structure assessed by SSR and SNP markers in a large germplasm collection of grape / F. E. S. Lorenzi, L. Grzeskowiak, V. Catalano, M. Stefanini, M. Troglio, S. Myles, J. M. Martinez-Zapater, E. Zyprian, F. M. Moreira, M. S. Grandó // BMC Plant Biology. – 2013. – T. 13. – № 1. – C. 39.
70. FAOstat F. Agriculture organization of the United Nations // Statistical database. – 2013.

71. Feliner, G. N. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants / G. N. Feliner, J. A. Rosselló // *Molecular phylogenetics and evolution*. – 2007. – T. 44. – №. 2. – C. 911-919.
72. Fernández, M. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin / M. Fernández, A. Figueiras, C. Benito // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2002. – T. 104. – № 5. – C. 845-851.
73. Fernández-Fernández, F. A genetic linkage map of an apple rootstock progeny anchored to the *Malus* genome sequence / F. Fernández-Fernández, L. Antanaviciute, M. M. van Dyk, K. R. Tobutt, K.M. Evans, D. J. G. Rees, D. J. Sargent // *Tree genetics & genomes*. – 2012. – T. 8. – №. 5. – C. 991-1002.
74. Ferree, D. Apples: Botany, Production and Uses / D. Ferree, I. Warrington. – CABI publishing, 2003. – 672 c.
75. Feuillet, C. Cereal breeding takes a walk on the wild side / C. Feuillet, P. Langridge, R. Waugh // *Trends in Genetics*. – 2008. – T. 24. – № 1. – C. 24-32.
76. Flor, H. H. Current status of the gene-for-gene concept / H. H. Flor // *Annual review of phytopathology*. – 1971. – T. 9. – №. 1. – C. 275-296.
77. Forsline, P. H. L. Collection, maintenance, characterization, and utilization of wild apples of central Asia / P. H. L. Forsline, J. Janick // *Horticultural Reviews* – WESTPORT THEN NEW YORK: JohnWiley & Sons – 2003.– T. 29. – C. 1-62.
78. Forte, A.V. Phylogeny of the *Malus* (apple tree) species, inferred from the morphological traits and molecular DNA analysis / A. V. Forte, A. N. Ignatov, V. V. Ponomarenko, D. B. Dorokhov, N. I. Savelyev // *Russian Journal of Genetics*. – 2002. – T. 38 – № 10. – C.1150-1160.
79. Frascaroli, E. Genetic diversity analysis of elite European maize (*Zea mays* L.) inbred lines using AFLP, SSR, and SNP markers reveals ascertainment bias for a subset of SNPs / E. Frascaroli, T. A. Schrag, A. E.

Melchinger // Theoretical and Applied Genetics. – 2013. – T. 126. – № 1. – C. 133-141.

80. Gao, L. Evolutionary history of *Oryza sativa* LTR retrotransposons: a preliminary survey of the rice genome sequences / L. Gao, E. McCarthy, E. Ganko, J. McDonald // BMC Genomics. – 2004. – T. 5. – № 1. – C. 18.

81. Garcia, A. A. F. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines / A.A. F. Garcia, L. L. Benchimol, A. M. M. Barbosa, I. O. Geraldi // Genetics and Molecular Biology. – 2004. – T. 27. – № 4. – C. 579-588.

82. Gardiner, S. E. Chapter 1. Apple. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants / S. E. Gardiner, V. G. M. Bus, R. L. Rusholme, D. Chagn, E. H. A. Rikkerink, C. Kole // Fruits and Nuts. – 2007. – T. 4. – C. 1-62.

83. Gebhardt, C. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome / C. Gebhardt, J. P. T. Valkonen // Annual review of phytopathology. – 2001. – T. 39. – № 1. – C. 79-102.

84. Geffroy, V. Inheritance of partial resistance against *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris* and co-localization of quantitative trait loci with genes involved in specific resistance / V. Geffroy, M. Seignac, J. C. De Oliveira, G. Fouilloux, P. Skroch, P. Thoquet, P. Gepts, T. Langin, M. Dron // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2000. – T. 13. – № 3. – C. 287-296.

85. Gianfranceschi, L. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple / L. Gianfranceschi, N. Seglias, R. Tarchini, M. Komjanc, C. Gessler // Theoretical and Applied Genetics. – 1998. – T. 96. – № 8. – C. 1069-1076.

86. Giliomee, J. H. Northern Spy, Merton and Malling-Merton rootstocks susceptible to woolly aphid, *Eriosoma lanigerum*, in the Western Cape / J. H. Giliomee, D. K. Strydom, H. J. van Zyl // South African Journal of Agriculture Sciences. – 1968. – T. 11. – C. 183-186.

87. Goncalves, L. S. A. Heirloom tomato gene bank: assessing genetic divergence based on morphological, agronomic and molecular data using a Ward-

modified location model / L. S. A. Goncalves, R. Rodrigues, A. T. Amaral Junior, M. Karasawa // *Genetics and Molecular Research*. – 2009. – T. 8. – №. 1. – C. 364-374.

88. Goncalves, L. S. A. Divergencia genetica em tomate estimada por marcadores RAPD em comparacao com descritores multicategoryricos / L. S. A. Goncalves, C. P. Sudre, C. S. Bento, M. M. Moulin // *Horticultura Brasileira*. – 2008. – T. 26. – №. 3. – C. 362-368.

89. Gostimsky, S. A. Studying plant genome variation using molecular markers / S. A. Gostimsky, Z. G. Kokaeva, F. A. Konovalov, J. Rus // *Russian Journal of Genetics*. – 2005. – T. 41. – №. 4. – C. 378-388.

90. Goulão, L. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus × domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers / L. Goulão, C. M. Oliveira // *Euphytica*. – 2001. – T. 122. – № 1. – C. 81-89.

91. Germplasm Resources Information Network (GRIN). Taxonomy for Plants. United States Department of Agriculture // *GRIN Taxonomy species data*. – 2013.

92. Gross, B. R. Genetic diversity in *Malus × domestica* (Rosaceae) through time in response to domestication / B. R. Gross, A. D. Henk, C. M. Richards, G. Fazio, G. M. Volk // *American Journal of Botany*. – 2014. – T. 101. – № 10. – C. 1770-1779.

93. Grube, R. C. Comparative genetics of disease resistance within the *Solanaceae* / R. C. Grube, E. R. Radwanski, M. Jahn // *Genetics*. – 2000. – T. 155. – №. 2. – C. 873-887.

94. Guilford, P. Microsatellites in *Malus × domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification / P. Guilford, S. Prakash, J. M. Zhu, E. Rikkerink, S. Gardiner, H. Bassett, R. Forster // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1997. – T. 94. – № 2. – C. 249-254.

95. Hammer, Ø. PAST-PAlaeontological Statistics / Ø. Hammer, D. A. T. Harper, P. D. Ryan // [www. uv. es/~ pardomv/pe/2001_1/past/pastprog/past. pdf](http://www.uv.es/~pardomv/pe/2001_1/past/pastprog/past.pdf), acessado em. – 2001. – T. 25. – №. 07. – 2009.
96. Hammond-Kosack, K. E. Deciphering plant–pathogen communications: free perspectives for molecular resistance breeding / K. E. Hammond-Kosack, J. E. Parker // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2003. – T. 14. – №. 2. – C. 177-193.
97. Harris S. A. Chloroplast DNA and biosystematics: the effect of intraspecific diversity and plastid transmission / S. A. Harris, T. Ingram // *Taxon*. – 1991. – C. 393-412.
98. Harris, S. A. Genetic clues to the origin of the apple / S. A. Harris, J. P. Robinson, B. E. Juniper // *Trends in Genetics*. – 2002. – T. 18. – № 8. – C. 426-430.
99. He, P. Characterization of the hormone and stress-induced expression of *FaRE1* retrotransposon promoter in strawberry / P. He, Y. Ma, H. Dai, L. Li, Y. Liu, H. Li, Z. Zhang // *Journal of Plant Biology*. – 2012. – T. 55. – №. 1. – C. 1-7.
100. Hea, P. Development of *Ty1-copia* retrotransposon-based S-SAP markers in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) / P. Hea, Y. Maa, H. Daia, L. Li, Y. Liua, H. Li, G. Zhaoc, Z. Zhanga // *Scientia Horticulturae*. – 2012. – T. 137. – C. 43-48.
101. Hemmat, M. Molecular markers for the scab resistance (V_f) region in apple / M. Hemmat, N. F. Weeden, H. S. Aldwinckle, S. K. Brown // *Journal of the American Society for Horticultural Science*. – 1998. – T. 123. – № 6. – C. 992-996.
102. Hsiao, C. Phylogenetic relationships of 10 grass species: an assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in nuclear ribosomal DNA in monocots / C. Hsiao, N. J. Chatterton. K. H. Asay, K. B. Jensen // *Genome*. – 1994. – T. 37. – № 1. – C. 112-120.

103. Höfer, M. Analysis of simple sequence repeat markers in homozygous lines of apple / M. Höfer, A. Gomez, E. Aguiriano, J. A. Manzanera, M. A. Bueno // *Plant Breeding*. – 2002. – T. [121](#). – [№ 2](#). – C. 159-162.
104. Höfer, M. Genome Size Variation in *Malus* Species / M. Höfer, A. Meister // *Journal of Botany*. – 2010. – T. 2010. – C. 8.
105. Hokanson, S. C. Microsatellite (SSR) variation in a collection of *Malus* (apple) species and hybrids / S. C. Hokanson, W. F. Lamboy, A. K. Szewc-McFadden, J. R. McFerson // *Euphytica*. – 2001. – T. 118. – № 3. – C. 28-294.
106. Hokanson, S. C. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* Borkh. core subset collection / S. C. Hokanson, A. K. Szewc-McFadden, W. F. Lamboy, J. R. McFerson // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1998. – T. 97. – № 5-6. – C. 671-683.
107. Hu, Y. Occurrence of plastids in the sperm cells of *Caprifoliaceae*: biparental plastid inheritance in angiosperms is unilaterally derived from maternal inheritance / Y. Hu, Q. Zhang, G. Rao // *Plant and cell physiology*. – 2008. – T. 49. – №. 6. – C. 958-968.
108. Huang, S. The genome of the cucumber *Cucumis sativus* L. / S. Huang, R. Li, Z. Zhang, L. Li, X. Gu, W. Fan, Y. Ren // *Nature genetics*. – 2009. – T. 41. – №. 12. – C. 1275-1281.
109. Ignatov, A. *Malus* / A. Ignatov, A. Bodishevskaya // *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*, Springer Berlin Heidelberg. – 2011. – C. 45-64.
110. Ishikawa, S. Organelle DNA polymorphism in apple cultivars and rootstocks / S. Ishikawa, S. Kato, S. Imakawa, T. Mikami, Y. Shimamoto // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1992. – T. 83. – №. 8. – C. 963-967.
111. Jaillon, O. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla / O. Jaillon, J. M. Aury, B. Noel, A.

Policriti, C. Clepet, A. Casagrande, A. Vezzi // Nature. – 2007. – T. 449. – №. 7161. – C. 463-467.

112. Janick, J. Apples / J. Janick, J. N. Cummins, S. K. Brown, M. Hemmat // Fruit breeding, Tree and tropical fruits, Wiley: New York. – 1996. – T. 1. – C. 1–77.

113. Jannink, J. L. Genomic selection in plant breeding: from theory to practice / J. L. Jannik, A.J. Lorenz, H. Iwata // Briefings in functional genomics. – 2010. – T. 9. – №. 2. – C. 166-177.

114. Jia, Y. Extreme expansion of NBS-encoding genes in Rosaceae / Y. Jia, Y. Yuan, Y. Zhang, S. Yang, X. Zhang // BMC genetics. – 2015. – T. 16. – №. 1. – C. 48.

115. Jiao, Y. Development of *Ty1-copia* retrotransposon-based SSAP molecular markers for the study of genetic diversity in peach / Y. Jiao, R. J. Ma, Z. J. Shen, M. L. Yu // Biochemical Systematics and Ecology. – 2014. – T. 57. – C. 270-277.

116. Juniper, B. E. The story of the apple / B. E. Juniper, D. J. Mabberley. – Timber: Oregon, 2006. – 240 c.

117. Juniper, B. E. The origin of the apple / B. E. Juniper, R. Watkins, S. A. Harris // Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics 484. – 1996. – C. 27-34.

118. Kalendar, R. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation / R. Kalendar, K. Antonius, P. Smýkal, A. H. Schulman // Theoretical and applied genetics. – 2010. – T. 121. – №. 8. – C. 1419-1430.

119. Kalendar, R. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers / R. Kalendar, A. J. Flavell, T. H. N. Ellis, T. Sjakste, C. Moisy, A. H. Schulman // Heredity. – 2011. – T. 106. – №. 4. – C. 520-530.

120. Kalendar, R. IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques / R. Kalendar, T. Grob, M. Regina // Theoretical and Applied Genetics. – 1999. – T. 98 – C. 704-711.

121. Kalendar, R. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting / R. Kalendar, A. H. Schulman // Nature Protocols. – 2006. – T. 1. – №. 5. – C. 2478-2484.
122. Kalia, R. K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants / R. K. Kalia, M. K. Rai, S. Kalia, R. Singh, A. K. Dhawan // Euphytica. – 2011. – T. 177. – № 3. – C. 309-334.
123. Kang, Y. J. Genome-wide mapping of NBS-LRR genes and their association with disease resistance in soybean / Y. J. Kang, K. H. Kim, S. Shim, M. Y. Yoon, S. Sun, M. Y. Kim, S. H. Lee // BMC plant biology. – 2012. – T. 12. – №. 1. – C. 139.
124. Keen, N. T. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions / N. T. Keen // Annual review of genetics. – 1990. – T. 24. – №. 1. – C. 447-463.
125. Kellerhals, M. Introduction to apple (*Malus×domestica*) / M. Kellerhals // Genetics and Genomics of Rosaceae. – Springer New York, 2009. – C. 73-84.
126. Khadivi-Khub, A. Nuclear and chloroplast DNA variability and phylogeny of Iranian apples (*Malus domestica*) / A. Khadivi-Khub, S. Jahangirzadeh, E. Ahadi, S. Aliyoun // Plant Systematics and Evolution. – 2014. – T. 300. – №. 8. – C. 1803-1817.
127. Kim, J. S. Screening of rice blast resistance genes from aromatic rice germplasms with SNP markers / J. S. Kim, S. G. Ahn, C. K. Kim, C. K. Shim // Plant Pathol J. – 2010. – T. 26. – C. 70-79.
128. Kobel, F. Lehrbuch des obstbaus auf physiologischer Grundlage / F. Kobel. – Springer: Berlin, 1954. – 348 c.
129. Kohler, A. Genome- wide identification of NBS resistance genes in *Populus trichocarpa* / A. Kohler, C. Rinaldi, S. Duplessis, M. Bauchner, D. Geelen, F. Duchaussoy, F. Martin // Plant molecular biology. – 2008. – T. 66. – №. 6. – C. 619-636.

130. Koller, B. Identification of apple cultivars using RAPD markers / B. Koller, A. Lehmann, J. M. McDermott, C. Gessler // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1993. – T. 85. – № 6. – C. 901-904.
131. Konovalov, F. A. Molecular markers based on LTR retrotransposons BARE-1 and *Jeli* uncover different strata of evolutionary relationships in diploid wheats // F. A. Konovalov, N. P. Goncharov, S. Goryunova, A. Shaturova, T. Proshlyakova, A. Kudryavtsev // *Molecular Genetics and Genomics*. – 2010. – T. 283. – № 6. – C. 551-563.
132. Korban, S. S. Interspecific hybridization in *Malus* / S. S. Korban // *HortScience*. – 1986. – T. 21. – C. 41-48.
133. Korban, S. S. Nomenclature of the cultivated apple / S. S. Korban, R. M. Skirvin // *Hort. Science*. – 1984. – T. 19. – № 2. – C. 177-180.
134. Krussmann, G. Manual of cultivated broadleaved trees and shrubs / G. Krussman. – London: Brittonia, 1984-1986.
135. Kumar, A. Plant retrotransposones / A. Kumar, J. L. Bennetzen // *Annual Review of Genetics*. – 1999. – T. 33. – № 1. – C. 479-532.
136. Kwok, P. Y. Increasing the information content of STS-based genome maps: identifying polymorphisms in mapped STSs / P. Y. Kwok, Q. Deng, H. Zakeri, S. L. Taylor, D. A. Nickerson // *Genomics*. – 1996. – T. 31. – №. 1. – C. 123-126.
137. Landry, B. S. Phylogeny analysis of 25 apple rootstocks using RAPD markers and tactical gene tagging / B. S. Landry, R. Q. Li, W. Y. Cheung, R. L. Granger // *Theoretical and applied genetics*. – 1994. – T. 89. – №. 7-8. – C. 847-852.
138. Laurentin, H. Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources / H. Laurentin // *Genetic Resources and Crop Evolution*. – 2009. – T. 56. – №. 2. – C. 277-292.
139. Leister, D. Rapid reorganization of resistance gene homologues in cereal genomes / D. Leister, J. Kurth, D. A. Laurie, M. Yano, T. Sasaki, K. Devos,

A. Graner, P. Schulze-Lefert // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1998. – T. 95. – №. 1. – C. 370-375.

140. Li, J. Unique evolutionary pattern of numbers of gramineous NBS–LRR genes / J. Li, J. Ding, W. Zhang, Y. Zhang, P. Tang, J. Q. Chen, S. Yang // Molecular Genetics and Genomics. – 2010. – T. 283. – №. 5. – C. 427-438.

141. Liebhard, R. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.) / R. Liebhard, L. Gianfranceschi, B. Koller, C.D. Ryder, R. Tarchini, E. Van De Weg, C. Gessler // Molecular Breeding. – 2002. – T. 10. – №. 4. – C. 217-241.

142. Lou, Q. F. *Ty1-copia* retrotransposon-based SSAP marker development and its potential in the genetic study of cucurbits / Q. F. Lou, J. F. Chen // Genome. – 2007. – T. 50. – №. 9. – C. 802-810.

143. Mago, R. Resistance gene analogues from rice: cloning, sequencing and mapping / R. Mago, S. Nair, M. Mohan // Theoretical and applied genetics. – 1999. – T. 99. – №. 1-2. – C. 50-57.

144. Malacarne, G. Deconstruction of the (paleo) polyploid grapevine genome based on the analysis of transposition events involving NBS resistance genes / G. Malacarne, M. Perazzolli, A. Cestaro, L. Sterck, P. Fontana, Y. Van de Peer, F. Salamini // PloS one. – 2012. – T. 7. – №. 1. – C. e29762.

145. Maliepaard, C. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers / C. Maliepaard, Alston F. H., van Arkel G., Brown L. M., Chevreau E., Dunemann F., Evans K. M., Gardiner S., Guilford P., van Heusden A. W., Janse J., Laurens F., Lynn J. R., Manganaris A. G., den Nijs A. P. M., Periam N., Rikkerink E., Roche P., Ryder C., Sansavini S., Schmidt H., Tartarini S., Verhaegh J. J., Vrieling-van Ginkel M., King G. J. // Theoretical and Applied Genetics. – 1998. – T. 97. – №. 1-2. – C. 60-73.

146. Manifesto, M. M. Quantitative Evaluation of Genetic Diversity in Wheat Germplasm Using Molecular Markers / M. M. Manifesto, A. R. Schlatter,

H. E. Hopp, E. Y. Suárez, J. Dubcovsky // Crop Science Society of America. – 2000. – T. 41. – № 3. – C. 682-690.

147. Mantovani, P. Nucleotide-binding site (NBS) profiling of genetic diversity in durum wheat / P. Mantovani, G. van der Linden, M. Maccaferri, M. C. Sanguineti, R. Tuberosa // Genome. – 2006. – T. 49. – № 11. – C.1473-1480.

148. Matsumoto, T. The map-based sequence of the rice genome / T. Matsumoto, J. Z. Wu, H. Kanamori, Y. Katayose, M. Fujisawa // Nature. – 2005. – T. 436. – №. 7052. – C. 793-800.

149. McCouch, S. R. Development of genome-wide SNP assays for rice / S. R. McCouch, K. Zhao, M. Wright, C. W. Tung, K. Ebana, M. Thomson, A. McClung // Breeding Science. – 2010. – T. 60. – №. 5. – C. 524-535.

150. McGregor, C. E. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm / C. E. McGregor, C. A. Lambert, M. M. Greyling, J. H. Louw, L. Warnich // Euphytica. – 2000. – T. 113. – № 2. – C. 135-144.

151. McNew, G. L. The relation of nitrogen nutrition to virulence in *Phytophthora stewarti* / G. L. McNew // Phytopathology. – 1938. – T. 28. – C. 769-787.

152. Melnikova, N. V. The *FaRE1* LTR-retrotransposon based SSAP markers reveal genetic polymorphism of strawberry (*Fragaria x ananassa*) cultivars / N. V. Melnikova, A. V. Kudryavtseva, A. S. Speranskaya, A. A. Krinitsina, A. A. Dmitriev, M. S. Belenikin, A. M. Kudryavtsev // Journal of Agricultural Science. – 2012. – T. 4. – № 11. – C. 111.

153. Meyers, B. C. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily //B. C. Meyers, A. W. Dickerman, R. W. Michelmore, S. Sivaramakrishnan, B. W. Sobral, N. D. Young // The Plant Journal. – 1999. – T. 20. – №. 3. – C. 317-332.

154. Meyers, B. C. Genome-wide analysis of NBS–LRR-encoding genes in *Arabidopsis* / B. C. Meyers, A. Kozik, A. Griego, H. Kuang, R. W. Michelmore // The Plant Cell. – 2003. – T. 15. – №. 4. – C. 809-834

155. Miller, J. C. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon* / J. C. Miller, S. D. Tanksley // Theoretical and Applied Genetics. – 1990. – T. 80. – № 4. – C. 437-448.
156. Ming, R. The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus) / R. Ming, S. B. Hou, Y. Feng, Q. Y. Yu, A. Dionne-Laporte, J. H. Saw, S. L. Salzberg // Nature. – 2008. – T. 452. – №. 7190. – C. 991-996.
157. Mohammadi, S. A. Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations / Mohammadi S. A., B.M. Prasanna // Crop Science. – 2003. – T. 43. – №. 4. – C. 1235-1248.
158. Monosi, B. Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice / B. Monosi, R. J. Wisser, L. Pennill, S. H. Hulbert // Theoretical and Applied Genetics. – 2004. – T. 109. – №. 7. – C. 1434-1447.
159. Moose, S. P. Molecular Plant Breeding as the Foundation for 21 st. / S.P. Moose, R. H. Mumm R. H. – 2008.
160. Morgan J. The book of apples / J. Morgan, A. Richards // Nature – 1993. – T. 366. - № 6456. – C. 641.
161. Mueller, U. G. AFLP genotyping and fingerprinting / U. G. Mueller, L. L. Wolfenbarger // Trends in Ecology and Evolution. – 1999. – T. 14. – № 10. – C. 389-394.
162. Mullis, K. B. One of the first Polymerase Chain Reaction (PCR) patents / K. B. Mullis, H. A. Erlich, N. Amheim, G. T. Hom, R. K. Saiki, S. J. Scharf // пат. 4683195 США. – 1987.
163. Mullis, K. B. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction / K. B. Mullis, F. Faloona // Methods in enzymology. – 1987. – T. 155. – C. 335.
164. Mun, J.-H. Genome-wide identification of NBS-encoding resistance genes in *Brassica rapa* / J.-H. Mun, H.-J. Yu, S. Park, B.-S. Park // Molecular Genetics and Genomics. – 2009. – T. 282. – №. 6. – C. 617-631.

165. Muys, C. Integration of AFLPs, SSRs and SNPs markers into a new genetic map of industrial chicory (*Cichorium intybus* L. var. *sativum*) / C. Muys, C. N. Thienpont, N. Dauchot, O. Maudoux, X. Draye, P. V. Cutsem // Plant breeding. – 2014. – T. 133. – № 1. – C. 130-137.

166. Nguyen, H. T. Molecular marker systems for genetic mapping / H. T. Nguyen, X. Wu // The Handbook of Plant Genome Mapping: Genetic and Physical Mapping. – 2005. – C. 23-52.

167. Nicolai, M. Genotyping a large collection of pepper (*Capsicum* spp.) with SSR loci brings new evidence for the wild origin of cultivated *C. annuum* and the structuring of genetic diversity by human selection of cultivar types / M. Nicolai, M. Cantet, V. Lefebvre, A. Sage-Palloix, A. Palloix // Genetic Resources and Crop Evolution. – 2013. – T. 60. – № 8. – C. 2375-2390.

168. Niederhauser, J. S. Observations on the varietal susceptibility of Apples to *Gymnosporangium juniperi virginianae* / J. S. Niederhauser, H. H. Whetzel // Phytopathology. – 1940. – T. 30. – № 8. – C. 691-693.

169. Nikiforova, S. V. Phylogenetic analysis of 47 chloroplast genomes clarifies the contribution of wild species to the domesticated apple maternal line // S. V. Nikiforova, D. Cavalieri, R. Velasco, V. Goremykin // Molecular Biology and Evolution. – 2013. – T. 30. – № 8. – C. 1751-1760.

170. Noir, S. Origin, diversity and evolution of NBS-type disease-resistance gene homologues in coffee trees (*Coffea* L.) / S. Noir, M.-C. Combes, F. Anthony, P. Lashermes // Molecular Genetics and Genomics. – 2001. – T. 265. – № 4. – C. 654-662.

171. Nybom, H. DNA "fingerprints" reveal genotypic distributions in natural populations of blackberries and raspberries (*Rubus*, Rosaceae) / H. Nybom, B. A. Schaal // American Journal of Botany. – 1990. – C. 883-888.

172. Oliveira, C.M. Molecular typing of *Pyrus* based on RAPD markers // C.M. Oliveira, M. Mota, L. Monte-Corvo, L. Goulão, D.M. Silva // Scientia Horticulturae. – 1999. – T. 79. – № 3-4. – C. 163–74.

173. Omasheva, M. E. Evaluation of molecular genetic diversity of wild apple *Malus sieversii* populations from Zailiysky Alatau by microsatellite markers / M. E. Omasheva, S.V. Chekalin, N. N. Galiakparov // Russian Journal of Genetics. – 2015. – T. 51. – №. 7. – C. 647-652.

174. Oraguzie, N. C. Genetic diversity and relationships in *Malus* sp. germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA / N. C. Oraguize, S. E. Gardiner, H. C. M. Basset, M. Stefanati, R. D. Ball, V. G. M. Bus, A. G. White // Journal of the American Society for Horticultural Science. – 2001. – T. 126. – №. 3. – C. 318-328.

175. Pan, Q. Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: tomato and *Arabidopsis* / Q. Pan, Y. Liu, O. Budai-Hadrian, M. Sela, L. Carmel-Goren, D. Zamir, R. Fluhr // Genetics. – 2000. – T. 155. – №. 1. – C. 309-322.

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

177. Paris, R. dHPLC efficiency for semi-automated cDNA-AFLP analyses and fragment collection in the apple scab-resistance gene model / R. Paris, L. Dondini, G. Zannini, D. Bastia, Elena Marasco, V. Gualdi, V. Rizzi, P. Piffanelli, V. Mantovani // Planta. – 2012. – T. 235. – № 5. – C. 1065-1080.

178. Paterson, A. H. The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses / A. H. Paterson, J. E. Bowers, R. Bruggmann, I. Dubchak, J. Grimwood, H. Gundlach, J. Schmutz // Nature. – 2009. – T. 457. – №. 7229. – C. 551-556

179. Patzak, J. Comparison of genetic diversity structure analyses of SSR molecular marker data within apple (*Malus × domestica*) genetic resources / J. Patzak, F. Paprštein, A. Henychová, J. Sedlák // Genome. – 2012. – T. 55. - № 9. – C. 647-665.

180. Pearce, S. R. Rapid isolation of plant *Ty1-copia* group retrotransposon LTR sequences for molecular marker studies / S. R. Pearce, C. Stuart-Rogers, M. R. Knox, A. Kumar, T. H. Ellis, A. J. Flavell // *The Plant Journal*. – 1999. – T. 19. – № 6. – C. 711-717.
181. Perazzolli, M. Characterization of resistance gene analogues (RGAs) in apple (*Malus x domestica* Borkh.) and their evolutionary history of the Rosaceae family / M. Perazzolli, G. Malacarne, A. Baldo, L. Righetti, A. Bailey, P. Fontana, M. Malnoy // *PloS one*. – 2014. – T. 9. – №. 2. – C. e83844.
182. Pereira-Lorenzo, S. Genetic assessment of local apple cultivars from La Palma, Spain, using simple sequence repeats (SSRs) / S. Pereira-Lorenzo , A. M. Ramos-Cabrer, A. J. Gonzalez-Diaz, M. B. Diaz-Hernandez // *Scientia horticulturae*. – 2008. – T. 117. – №. 2. – C. 160-166.
183. Phipps, J. B. A checklist of the subfamily *Maloideae* (Rosaceae) / J. B. Phipps, K. R. Robertson, P. G. Smith, J. R. Rohrer // *Canadian Journal of Botany*. – 1990. – T. 68. – № 2209. – C. 2255.
184. Porceddu, A. Development of S-SAP markers based on an LTR-like sequence from *Medicago sativa* L. / A. Porceddu, E. Albertini, G. Barcaccia, G. Marconi, F. B. Bertoli, F. Veronesi // *Molecular Genetics and Genomics*. – 2002. – T. 267. – №. 1. – C. 107-114.
185. Porter, B. W. Genome-wide analysis of *Carica papaya* reveals a small NBS resistance gene family / B. W. Porter, M. Paidi, R. Ming, M. Alam, W. T. Nishijima, Y. J. Zhu // *Molecular Genetics and Genomics*. – 2009. – T. 281. – №. 6. – C. 609-626.
186. Powell, W. comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis / W. Powell, M. Morgante, C. Andre, M. A. Hamfey // *Molecular Breeding*. – 1996. – T. 2. – C. 225-238.
187. Puchooa, D. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) / D. Puchooa // *African Journal of Biotechnology*. – 2004. – T. 3. – №. 4. – C. 253-255.

188. Rapini, A. Phylogenetics of South American Asclepiadoideae (*Apocynaceae*) / A. Rapini, M. W. Chase, T. U. Konno // *Taxon*. – 2006. – C. 119-124.
189. Rehder, A. Manual of cultivated trees and shrubs hardy in North-America / A. Rehder. — New York, 1940. – 996 c.
190. Ren, N. AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species / N. Ren, M. P. Timko // *Genome*. – 2001. – T. 44. – № 4. – C. 559-571.
191. Ritter, E. RFLP mapping on potato chromosomes of two genes controlling extreme resistance to potato virus X (PVX) / E. Ritter, T. Debener, A. Barone, F. Salamini, C. Gebhardt // *Molecular and General Genetics*. – 1991. – T. 227. – № 1. – C. 81-85 c.
192. Robinson, J. P. Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (*Rosaceae*) with emphasis on the cultivated apple *Malus domestica* Borkh. / J. P. Robinson, S. A. Harris, B. E. Juniper // *Plant Systematics and Evolution*. – 2001. – T. 226. – № 1-2. – C. 35–58.
193. Roche, P. RFLP and RAPD markers linked to the rosy leaf curling aphid resistance gene (*Sdl*) in apple // P. Roche, F. H. Alston, C. Maliepaard, K. M. Evans, R. Vrielink, F. Dunemann, T. Markussen, S. Tartarini, L. M. Brown, C. Ryder, G. J. King // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1997. – T. 94. – № 3. – C. 528-533.
194. Saker, M. M. Genetic analysis of some Egyptian rice genotypes using RAPD, SSR and AFLP / M. M. Saker, S. S. Youssef, N. A. Abdallah, H. S. Bashandy // *African Journal of Biotechnology*. – 2005. – T. 4. – № 9 – C. 882-890.
195. Sandanayaka, W. R. M. Electronically monitored stylet penetration pathway of woolly apple aphid, *Eriosoma lanigerum* (Homoptera: *Aphididae*), on

apple (*Malus domestica*) / W. R. M. Sandanayaka, C. N. Hale // New Zealand journal of crop and horticultural science. – 2003. – T. 31. – №. 2. – C. 107-113.

196. SanMiguel, P. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome / P. Sanmiguel, A. Tikhonov, Y. K. Jin, N. Motchoulskaia, D. Zakharov, A. Melake-Berhan, P. S. Springer, K. J. Edwards, M. Lee, Z. Avramova // Science. – 1996. – T. 274. – № 5288. – C. 765–768.

197. Saraste, M. The *P*-loop—a common motif in ATP-and GTP-binding proteins / M. Saraste, P. R. Sibbald, A. Wittinghofer // Trends in biochemical sciences. – 1990. – T. 15. – №. 11. – C. 430-434.

198. Sax, K. The origin and relationships of the *Pomoideae* / K. Sax // Journal Arn Arbor. – 1931. – T. 12. – № 3. – C. 22.

199. Schmutz, J. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean / J. Schmutz, S. B. Cannon, J. Schlueter, J. Ma, T. Mitros, W. Nelson, D. Xu // Nature. – 2010. – T. 463. – №. 7278. – C. 178-183.

200. Schnable, P. S. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics / P. S. Schnable, D. Ware, R. S. Fulton, J. C. Stein, F. Wei, S. Pasternak, P. Minx // Science. – 2009. – T. 326. – №. 5956. – C. 1112-1115.

201. Schulman, A. H. The application of LTR retrotransposons as genetic markers in plants / A. H. Schulman, A. J. Flavell, T. H. N. Ellis // Mobile Genetic Elements. – Humana Press, 2004. – C. 145-173.

202. Schultz, J. The internal transcribed spacer 2 database—a web server for (not only) low level phylogenetic analyses / J. Schultz, T. Müller, M. Achtziger, P. N. Seibel, T. Dandekar, M. Wolf // Nucleic Acids Research. – 2006. – T. 34. – №. suppl 2. – C. W704-W707.

203. Seddon, J.M. SNPs in ecological and conservation studies: a test in the Scandinavian wolf population / J. M. Seddon, H. G. Parker, E. A. Ostrander, H. Ellegren // Molecular Ecology. – 2005. – T. 14. – №. 2. – C. 503-511.

204. Shen, K. A. Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce /

K. A. Shen, B. C. Meyers, M. N. Islam-Faridi, D. B. Chin, D. M. Stelly, R. W. Michelmore // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 1998. – T. 11. – №. 8. – C. 815-823.

205. Shenghua L. AFLP molecular markers of 10 species of *Pyrus* in China / L. Shenghua., F. Chengquan, S. Wenqin, Z. Feng // *International Symposium on Asian Pears, Commemorating the 100th Anniversary of Nijisseiki Pear 587*. – 2001. – C. 233-236.

206. Southern, E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis / E. Southern // *Journal of molecular biology*. – 1975. – T. 98. – №. 3. – C. 503-517.

207. Souza, S. G. H. Comparative analysis of genetic diversity among the maize inbred lines (*Zea mays* L.) obtained by studying genetic relationships in *Lactuca* spp. / S. G. H. Souza, V. Carpentieri-Pipolo, C. F. Ruas, V. P. Carvalho // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2008. – T. 93. – C. 1202-1210.

208. Speelman, E. Disease resistance gene homologs correlate with disease resistance loci of *Arabidopsis thaliana* / E. Speelman, D. Bouchez, E. B. Holub, J. L. Beynon // *The Plant Journal*. – 1998. – T. 14. – №. 4. – C. 467-474.

209. Spooner, D. M. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. Section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.] / D. M. Spooner, I. E. Peralta, S. Knapp // *Taxon*. – 2005. – T. 54. – № 1. – C. 43-61.

210. StatSoft I. N. C. STATISTICA (data analysis software system), version 6 // Tulsa, USA. – 2001. – T. 150.

211. Struss, D. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations / D. Struss, J. Plieske // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1998. – T. 97. – № 1. – C. 308-315.

212. Sudre, C. P. Genetic resources of vegetable crops: a survey in the Brazilian germplasm collections pictured through papers published in the journals of the Brazilian Society for Horticultural Science // C. P. Sudre, E. Leonardecz, R.

Rodrigues, A. T. Amaral Junior // *Horticultura Brasileira*. – 2007. – T. 25. – №. 4. – C. 496-503.

213. Syed, N. H. A detailed linkage map of lettuce based on SSAP, AFLP and NBS markers / N. H. Syed, A. P. Sørensen, R. Antonise, C. V. D. Wiel, G. V. D. Linden, W. V. Westende, D. A. P. Hooftman, H. C. M. D. Nijs, A. J. Flavell // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2006. – T. 112. – №. 3. – C. 517-527.

214. Tam, S. M. Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR / S. M. Tam, C. Mhiri, A. Vogelaar, M. Kerkveld, S. R. Pearce, M. A. Grandbastien // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2005. – T. 110. – № 5. – C. 819-831.

215. Tamura, K. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods / K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar // *Molecular biology and evolution*. – 2011. – T. 28. – №. 10. – C. 2731-2739.

216. Tartarini, S. RAPD markers linked to the Vf gene for scab resistance in apple / S. Tartarini // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1996. – T. 92. – № 7. – C. 803-810.

217. Tatum, T. C. Variation in nuclear DNA content in *Malus* species and cultivated apples / T. C. Tatum, S. Stepanovic, D. P. Biradar, A. L. Rayburn, S. S. Korban // *Genome*. – 2005. – T. 48. – № 5. – C. 924-930.

218. Traut, T. W. The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide-binding sites / T. W. Traut // *European Journal of Biochemistry Reviews* 1994. – Springer Berlin Heidelberg, 1995. – C. 105-115.

219. Van der Linden, C. G. Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling / C. G. van der Linden, D. C. Wouters, V. Mihalka, E. Z. Kochieva, M. J. Smulders, B. Vosman // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2004. – T. 109. – №. 2. – C. 384-393.

220. Van Treuren, R. Comparison of anonymous and targeted molecular markers for the estimation of genetic diversity in ex situ conserved *Lactuca* / R. van Treuren, T. J. van Hintum // Theoretical and applied genetics. – 2009. – T. 119. – №. 7. – C. 1265-1279.

221. Vavilov, N. I. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants / N. I. Vavilov // Soil Science. – 1951. – T. 72. – № 6. – C. 482.

222. Vavilov, N. I. Wild progenitors of the fruit trees of Turkistan and the Caucasus and the problem of the origin of fruit trees / N. I. Vavilov // Report. and Proc. 9th Int. Hort. Congr. – 1930. – C. 271-286.

223. Velasco, R. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.) / R. Velasco, A. Zharkikh, J. Affourtit, A. Dhingra, A. Cestaro, A. Kalyanaraman, P. Fontana, S. K. Bhatnagar, M. Troggio, D. Pruss, S. Salvi, M. Pindo, P. Baldi, S. Castelletti, M. Cavaiuolo, G. Coppola, F. Costa, V. Cova, A. D. Ri, V. Goremykin, M. Komjanc, S. Longhi, P. Magnago, G. Malacarne, M. Malnoy, D. Micheletti, M. Moretto, M. Perazzolli, A. Si-Ammour, S. Vezzulli, E. Zini, G. Eldredge, L. M. Fitzgerald, N. Gutin, J. Lanchbury, T. Macalma, J. T. Mitchell, J. Reid, B. Wardell, C. Kodira, Z. Chen, B. Desany, F. Niazi, M. Palmer, T. Koepke, D. Jiwan, S. Schaeffer, V. Krishnan, C. Wu, V. T. Chu, S. T. King, J. Vick, Q. Tao, A. Mraz, A. Stormo, K. Stormo, R. Bogden, D. Ederle, A. Stella, A. Vecchietti, M. M. Kater, S. Masiero, P. Lasserre, Y. Lespinasse, A. C. Allan, V. Bus, D. Chagné, R. N. Crowhurst, A. P. Gleave, E. Lavezzo, J. A. Fawcett, S. Proost, P. Rouzé, L. Sterck, S. Toppo, B. Lazzari, R. P. Hellens, C. E. Durel, A. Gutin, R. E. Bumgarner, S. E. Gardiner, M. Skolnick, M. Egholm, Y. van de Peer, F. Salamini, R. Viola // Nature Genetics. – 2010. – T. 42. – № 10. – C. 833-839.

224. Velasco, R. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety / R. Velasco, A. Zharkikh, M. Troggio, D. A. Cartwright, A. Cestaro, D. Pruss, G. Malacarne // PloS one. – 2007. – T. 2. – №. 12. – C. e1326.

225. Venturi, S. Retrotransposon characterisation and fingerprinting of apple clones by S-SAP markers / S. Venturi, L. Dondini, P. Donini, S. Sansavini // Theoretical and Applied Genetics. – 2006. – T. 112. – №. 3. – C. 440-444.

226. Vicente, J. G. Characterisation of disease gene-like sequences in *Brassica oleracea* L. / J. G. Vincente, G. J. King // Theoretical and Applied Genetics. – 2001. – T. 102. – №. 4. – C. 555-563.

227. Vierling, R. A. Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of diploid, wheat genotypes / R. A. Vierling, H. T. Nguyen // Theoretical and Applied Genetics. – 1992. – T. 84. – №. 7. – C. 835-838.

228. Vinatzer, B. A. Apple contains receptor-like genes homologous to the *Cladosporium fulvum* resistance gene family of tomato with a cluster of genes cosegregating with Vf apple scab resistance / B. A. Vinatzer, A. Patocchi, L. Gianfranceschi, S. Tartarini, H. B. Zhang, C. Gessler, S. Sansavini // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2001. – T. 14. – №. 4. – C. 508-515.

229. Visser, T. Resistance to scab (*Venturia inaequalis*) and mildew (*Podosphaera leucotricha*) and fruiting properties of the offspring of the apple cultivar Antonovka / T. Visser, J. J. Verhaegh, D. P. De Vries // Euphytica. – 1974. – T. 23. – №. 2. – C. 353-360.

230. Vitte, C. Genomic paleontology provides evidence for two distinct origins of Asian rice (*Oryza sativa* L.) / C. Vitte, T. Ishii, F. Lamy, D. Brar, O. Panaud // Molecular Genetics and Genomics. – 2004. – T. 272. – №. 5. – C. 504-511.

231. Vogel, J. P. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon* / J. P. Vogel, D. F. Garvin, T. C. Mockler, J. Schmutz, D. Rokhsar, M. W. Bevan, H. Tice // Nature. – 2010. – T. 463. – №. 7282. – C. 763-768.

232. Vos, P. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting / P. Vos, Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J.,

Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. // *Nucleic Acids Research*. – 1995. – T. 23. – № 21. – C. 4407-4414.

233. Wagner, I. Isozyme in *Malus sylvestris*, *Malus domestica* and in related *Malus* species / I. Wagner, N. F. Weeden // *Eucarpia symposium on Fruit Breeding and Genetics* 538. – 1999. – C. 51-56.

234. Wang, D. G. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome / D. G. Wang, J. B. Fan, C. J. Siao, A. Berno, P. Young, R. Sapolsky, L. Kruglyak // *Science*. – 1998. – T. 280. – №. 5366. – C. 1077-1082.

235. Wang, M. The utility of NBS profiling for plant systematics: a first study in tuberbearing *Solanum* species / M. Wang, R. van den Berg, C. G. van der Linden, B. Vosman // *Plant systematics and evolution*. – 2008. – T. 276. – №. 1-2. – C. 137-148.

236. Watillon, B. Use of random cDNA probes to detect restriction fragment length polymorphisms among apple clones / B. Watillon, P. Druart, P. Du Jardin, R. Kettmann, P. Boxus, A. Burny // *Scientia horticultrae*. – 1991. – T. 46. – №. 3. – C. 235-243.

237. Watkins, R. Apple and pear / R. Watkins, J. Smartt, N. W. Simmonds. – *Evolution of crop plants*. New York: Wiley – 1995. – C. 418-422.

238. Waugh, R. Genetic distribution of *Bare-1-like* retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP) // R. Waugh, K. McLean, A. J. Flavell, S. R. Pearce, A. Kumar, B. B. T. Thomas, W. Powell // *Molecular and General Genetics*. – 1997. – T. 253. – № 6. – C. 687-694.

239. Way, R. D. Apples (*Malus*) / R. D. Way, H. S. Aldwinckle, R. C. Lamb, A. Rejman, S. Sansavini, T. Shen, R. Watkins, M. N. Westwood, Y. Yoshida // *Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops*. – 1990. – T. 290. – № 3. – C. 62.

240. Weeden, N. F. Development and application of molecular marker linkage maps in woody fruit crops / N. F. Weeden, M. Hemmatt, D. M. Lawson, M. Lodhi, R. L. Bell, A. G. Manganaris, G. N. Ye // *Euphytica*. – 1994. – T. 77. – №. 1-2. – C. 71-75.

241. White, T. J. Amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes and the internal transcribed spacer in fungi / T. J. White, T. D. Bruns, S. B. Lee, J. W. Taylor // *PCR–Protocols and applications—a laboratory manual*. Academic Press, Orlando Fl. – 1990. – C. 315-322.

242. Wicker, T. A unified classification system for eukaryotic transposable elements / T. Wicker, F. Sabot, A. Hua-Van, J. L. Bennetzen, P. Capy, B. Chalhoub, A. Flavell, P. Leroy, M. Morgante, O. Panaud, E. Paux, P. SanMiguel, A. H. Schulman // *Nature Reviews Genetics*. – 2007. – T. 8. – №. 12. – C. 973-982.

243. Williams, E. B. The relationship of genes for pathogenicity and certain other characters in *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. / E.B. Williams, J. R. Shay // *Genetics*. – 1957. – T. 42. – №. 6. – C. 704.

244. Williams, J. G. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers / J. G. Williams, A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, S. V. Tingey // *Nucleic acids research*. – 1990. – T. 18. – №. 22. – C. 6531-6535.

245. Würschum, T. Population structure, genetic diversity and linkage disequilibrium in elite winter wheat assessed with SNP and SSR markers / Würschum T. S. M. Langer, C. F. H. Longin, V. Korzun, E. Akhunov, E. Ebmeyer, R. Schachschneider, J. Schacht, E. Kazman, J. C. Reif // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2013. – T. 126. – № 6. – C. 1477-1486.

246. Xu, M. A cluster of four receptor-like genes resides in the Vf locus that confers resistance to apple scab disease / M. A. Xu, S. S. Korban // *Genetics*. – 2002. – T. 162. – №. 4. – C. 1995-2006.

247. Xu, M. L. Development of sequence-characterized amplified regions (SCARs) from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the *Vf*-gene in apple // M. L. Xu, E. Huaracha, S. S. Korban // *Genome*. – 2001. – T. 44. – №. 1. – C. 63-70.
248. Xu, M. L. Saturation mapping of the apple scab resistance gene *Vf* using AFLP markers // M. L. Xu, S. S. Korban // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2000. – T. 101. – №. 5-6. – C. 844-851.
249. Xu, X. Potato Genome Sequencing Consortium et al. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato / X. Xu, S. Pan, S. Cheng, B. Zhang, D. Mu et al. // *Nature*. – 2011. – T. 475. – №. 7355. – C. 189-195.
250. Xu, Y. Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice / Y. Xu, J. H. Crouch // *Crop Science*. – 2008. – T. 48. – №. 2. – C. 391-407.
251. Yamamoto, T. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear / T. Yamamoto, T. Kimura, Y. Sawamura, K. Kotobuki, Y. Ban, T. Hayashi, N. Matsuta // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2001. – T. 102. – №. 6-7. – C. 865-870.
252. Yamazaki, M. Genetic relationships among *Glycyrrhiza* plants determined by RAPD and RFLP analyses / M. Yamazaki, A. Sato, K. Shimomura, K. Saito, I. Murakoshi // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 1994. – T. 17. – №. 11. – C. 1529-1531.
253. Yang, S. Recent duplications dominate NBS-encoding gene expansion in two woody species / S. Yang, X. Zhang, J. X. Yue, D. Tian, J. Q. Chen // *Molecular Genetics and Genomics*. – 2008. – T. 280. – №. 3. – C. 187-198.
254. Yao, J. Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor / J. Yao, Y. Dong, B. A. Morris // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2001. – T. 98. – №. 3. – C. 1306-1311.

255. Ye, S. Analysis of genetic diversity of processing apple varieties / S. Ye, Z. Heng, Y. X. Yao, L. Ming, Y.P. Du // *Agricultural Sciences in China*. – 2006. – T. 5. – №. 10. – C. 745-750.
256. Yunong, L. A critical review of the species and the taxonomy of *Malus* Mill in the world / L. Yunong // *Journal of Fruit Science*. – 1996. – C. S1.
257. Zeder, M. A. Documenting domestication: the intersection of genetics and archaeology / M. A. Zeder, E. Emshwiller, B. D. Smith, D. G. Bradley // *Trends in Genetics*. – 2006. – T. 22. – № 3. – C. 139-155.
258. Zhang, S. Genomic variants of genes associated with three horticultural traits in apple revealed by genome re-sequencing / S. Zhang, W. Chen, L. Xin, Z. Gao, Y. Hou, X. Yu, Z. Zhang, S. Qu // *Horticulture Research*. – 2014. – T. 1.
259. Zhang, H. X. Genetic structure and historical demography of *Malus sieversii* in the Yili Valley and the western mountains of the Junggar Basin, Xinjiang, China / H. X. Zhang, M. L. Zhang, L. N. Wang // *Journal of Arid Land*. – 2015. – T. 7. – №. 2. – C. 264-271.
260. Zhang, Q. Evaluation of genetic diversity in Chinese wild apple species along with apple cultivars using SSR markers / Q. Zhang, J. Li, Y. Zhao, S. S. Korban, Y. Han // *Plant Molecular Biology Reporter*. – 2012. – T. 30. – № 3. – C. 539-546.
261. Zhao, G. Isolation of two novel complete *Ty1*-copia retrotransposons from apple and demonstration of use of derived S-SAP markers for distinguishing bud sports of *Malus domestica* cv. Fuji / G. Zhao, H. Dai, L. Chang, Y. Ma, H. Sun, P. He, Z. Zhang // *Tree genetics & genomes*. – 2010. – T. 6. – №. 1. – C. 149-159.
262. Zhao, G. Isolation of *Ty1*-copia-like retrotransposon sequences from the apple genome by chromosome walking based on modified site finding-polymerase chain reaction / G. Zhao, Z. Zhang, H. Sun, H. Li, H. Dai // *Acta biochimica et biophysica Sinica*. – 2007. – T. 39. – №. 9. – C. 675-683.

263. Zhou, T. Genome-wide identification of NBS genes in japonica rice reveals significant expansion of divergent non-TIR-NBS-LRR genes / T. Zhou, Y. Wang, J. Q. Chen, H. Araki, Z. Jing, K. Jiang, D. Tian // *Molecular Genetics and Genomics*. – 2004. – T. 271. – №. 4. – C. 402-415.

264. Zhou, Z.-Q. The apple genetic resources in China: the wild species and their distributions, informative characteristics and utilization / Z.-Q. Zhou // *Genetic Resources and Crop Evolution*. – 1999. – T. 46. – № 6. – C. 599-609.

265. Zhou, Z-Q. The RAPD evidence for the phylogenetic relationship of the closely related species of cultivated apple / Z.-Q. Zhou, Y. N. Li // *Genetic Resources and Crop Evolution*. – 2000. – T.47. – № 4. – C. 353-357.

266. Zietkiewicz, E. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification / E. Zietkiewicz, A. Rafalski, D. Labuda // *Genomics*. – 1994. – T. 20. – №. 2. – C. 176-183.

267. Zohary, D. Domestication of plants in the Old World / D. Zohary, M. Hopf. – N.Y.: Oxford University Press, 2000. – 316 c.