

УДК 582:581(082)
ББК 28.59я43
И73

Редакционная коллегия:

д.б.н., чл.-корр. НАН Беларуси *В. В. Титок* (ответственный редактор),
к.б.н. *П. Н. Белый*; к.б.н. *И. М. Гаранович*; д.б.н. *Н. В. Гетко*;
к.б.н. *Л. А. Головченко*; *С. М. Кузьменкова*; д.б.н. *Е. Н. Кутас*;
к.б.н. *Н. М. Лунина*; к.б.н. *О. В. Чижик*; к.б.н. *А. П. Яковлев*

Рецензенты:

доктор биологических наук, Ботанический институт
имени В. Л. Комарова Российской академии наук *К. Г. Ткаченко*;
кандидат биологических наук, Институт экспериментальной
ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси
А. В. Пугачевский

Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия флоры : материалы международной научной конференции, посвященной 90-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси (Минск, 28 июня – 1 июля 2022 г.). В 2 ч. Ч. 2 / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]. редкол.: В.В. Титок [и др.] – Минск : Белтаможсервис, 2022. – 420 с.

ISBN 978-985-7004-75-1

В сборнике представлены материалы международной научной конференции, посвященной 90-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. Часть 2: секция 3 «Биотехнологические и молекулярно-генетические аспекты изучения и использования биоразнообразия растений», секция 4 «Решение вопросов защиты растений в ботанических садах», секция 5 «Научное, прикладное и просветительское значение ботанических коллекций» и секция 6 «Современные направления ландшафтного дизайна и зеленого строительства».

УДК 582:581(082)
ББК 28.59я43

ISBN 978-985-7004-75-1 (ч. 2)
ISBN 978-985-7004-72-0

© ГНУ «Центральный ботанический сад
Национальной академии наук Беларуси», 2022
© Оформление. РУП «Белтаможсервис», 2022

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ОБРАЗЦОВ ДЕРЕВЬЕВ РОДА *MALUS* СТАРОГО ПЛОДОВОГО САДА ЦЕНТРАЛЬНОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА НАН БЕЛАРУСИ ПРИ ПОМОЩИ SSR МАРКЕРОВ

**Фомина Е. А.¹, Заинчковская А. Н.¹, Урбанович О. Ю.¹, Гончарова Л. В.²,
Пашкевич П. А.², Сидор Л. С.²**

¹Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Беларусь,

E. Fomina@igc.by

²Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Резюме. С помощью 6 SSR-маркеров (CH01c06, CH02c02b, CH02b12 CH03d12 и SdSSR) проведена оценка генетического разнообразия 50 образцов деревьев яблони старого плодового сада Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Среди исследованных образцов выявлено 52 аллеля и 84 их сочетаний. Наименьший уровень полиморфизма наблюдался в локусе CH01c06 (обнаружено 4 аллеля, встречающихся в 5 комбинациях), наибольший – в локусе CH04b02 (обнаружено 14 аллелей, встречающихся в 23 комбинациях). Образцы деревьев были распределены на 25 различных генотипов. Показано, что часть деревьев является идентичными на молекулярном уровне. Результаты указывают на высокий уровень генетического разнообразия генотипов деревьев старого плодового сада.

ASSESSMENT OF THE GENETIC DIVERSITY OF THE TREES SAMPLES OF THE GENUS *MALUS* OF THE OLD ORCHARD OF THE CENTRAL BOTANICAL GARDEN OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS USING SSR MARKERS

**Famina A. A., Zainchkovskaya A. N., Urbanovich O. Yu., Goncharova L. V., Pashkevich P. A.,
Sidor L. S.**

Summary. Using 6 SSR markers (CH01c06, CH02c02b, CH02b12 CH03d12 and SdSSR), the genetic diversity of 50 apple trees samples from the old orchard of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus was assessed. Among the studied samples, 52 alleles and 84 their combinations were identified. The lowest polymorphism level was observed at the CH01c06 locus (4 alleles were found in 5 combinations), the highest was observed at the CH04b02 locus (14 alleles were found in 23 combinations). The tree samples were divided into 25 different genotypes. It is shown that some of the trees are identical at the molecular level. The results indicate high level of the genetic diversity in the genotypes of the trees of the old orchard.

Введение. Сохранение уникальных генетических ресурсов является важной задачей для многих стран мира. Актуален этот вопрос и для Республики Беларусь. Для его успешного решения необходимо располагать точными, надежными и удобными методами идентификации генотипов. В настоящее время в установлении сортовой и видовой принадлежности представителей рода *Malus* и других видов плодовых и ягодных культур существенную помощь могут оказать молекулярные методы, методы ДНК идентификации. Эти методы точны и надежны. На них не оказывают влияние условия окружающей среды, время и место посадки дерева, его возраст. В частности, с помощью метода ДНК идентификации, основанного на использовании специально подобранных SSR маркеров, можно установить молекулярно-генетическую формулу каждого индивидуального растения, разработать молекулярный паспорт отдельного дерева [1]. Молекулярные методы идентификации семенных и косточковых плодовых культур, а также ряда ягодных культур были разработаны в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси. Они основаны на анализе состава аллелей локусов микросателлитных последовательностей, расположенных на разных хромосомах генома. Каждый сорт имеет уникальный состав аллелей,

по которому его можно отличить от других сортов. Образцы сортов с установленным составом аллелей могут выступать в качестве эталонных образцов при сортовой идентификации. Привлечение молекулярных методов идентификации позволяет выявить генетически сходные деревья, имеющие одинаковый генотип, установить их сортовую принадлежность, выделить уникальные генотипы с целью сохранения ценных генетических ресурсов. Молекулярные методы позволяют установить генетические связи между отдельными генотипами, выделить уникальные генотипы, которые могут являться источниками хозяйственно ценных генов, генов устойчивости к болезням, вредителям, абиотическим факторам внешней среды и др. [2].

Целью данной работы являлось изучение генетического разнообразия образцов деревьев рода *Malus* старого плодового сада Центрального ботанического сада НАН Беларуси и выделение ценных генотипов с уникальным составом SSR аллелей.

Материалы и методы. Исследования проводились на образцах ДНК, полученных из материала 50 индивидуальных деревьев, представляющих сорта или формы яблони старого плодового сада Центрального ботанического сада.

Препараты ДНК выделялись из почек с помощью Genomic DNA Purification Kit фирмы Thermo Fisher Scientific согласно протоколу производителя, с модификациями.

Изучение молекулярно-генетического разнообразия представителей рода *Malus* было проведено при помощи 6 пар SSR-маркеров, из которых 5 пар серии СН были разработаны Лейбхард с соавторами [3] и 1 пара (SdSSR) – Цевиком и Кингом [4]. Праймеры содержали специфическую флуоресцентную метку (FAM, R6G, TAMRA, ROX), что и позволило проводить анализ продуктов амплификации, полученных в результате реакции мультиплекса. Праймеры синтезированы компанией ОДО «Праймтех» (Беларусь).

Состав реакционной смеси для амплификации объемом 20 мкл был следующий: 10×буфер для Taq полимеразы, без MgCl₂; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP; 0,5 nM праймеры; 1 ЕА Taq-полимераза (АртБиоТех, Беларусь); 20 нг ДНК. Амплификацию проводили на приборе GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems). Были подобраны оптимальные условия ПЦР: I-й этап: 1 цикл: 94°C – 3 мин; II-й этап: 40 циклов: 94°C – 40 сек; 60°C – 1 мин; 72°C – 1 мин; III-й этап: 1 цикл: 72°C – 10 мин.

Продукты амплификации разделяли на секвенаторе Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, США). В качестве стандарта молекулярного веса использовали внутренний стандарт S450 (Applied Biosystems, Великобритания).

Результаты электрофоретического разделения документировались с помощью программного обеспечения секвенатора.

Результаты и обсуждение. Для идентификации на молекулярном уровне генотипов яблони было использовано 6 SSR-маркеров: СН01с06, СН02с02b, СН02b12 СН03d12 и SdSSR. В общей сложности среди 50 образцов деревьев яблони старого плодового сада Центрального ботанического сада НАН Беларуси с их помощью было выявлено 52 аллеля и 84 их сочетаний. Количество аллелей, выявляемых каждым из 6 SSR-маркеров, отличается. Наименьший уровень полиморфизма наблюдается в локусе СН01с06. В нем обнаружено 4 аллеля, встречающихся в 5 комбинациях у 50 подвергшихся анализу деревьев. Максимальный уровень полиморфизма был выявлен с помощью маркера СН04b02. Применение данного маркера позволило обнаружить 14 аллелей, встречающихся в 23 комбинациях. Данные позволяют заключить, что выбранного набора молекулярных маркеров достаточно, чтобы разделить уникальные сорта или образцы. Достоверность и точность этого метода анализа была показана ранее [5]. Результаты SSR анализа показали, что часть деревьев имеет одинаковый генотип. Состав аллелей был идентичен у образцов 1–3, 4–6, 9 и 10, 11 и 12 и других. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Состав аллелей, выявленных с помощью ДНК-идентификации образцов деревьев яблони старого плодового сада Центрального ботанического сада НАН Беларуси

Номер дерева	CH01c06	CH02d12	CH04h02	CH02c02b	SdSSSR	CH03d12
1	158	130, 142	185,197,201	110	186	124
2	158	130, 142	185,197,201	110	186	124
3	158	130, 142	185,197,201	110	186	124
4	158	120,148	173,179,181,201	124	188,267	124
5	158	120,148	173,179,181,201	124	188,267	124
6	158	120,148	173,179,181,201	124	188,267	124
7	158	132	185,205	110	234,280	124
8	158	142,148	179,181	114	184	124
9	158	146	179	114	176,196	124,126
10	158	146	179	114	176,196	124,126
11	158	132,144	173,189	114	180,196	134
12	158	132,144	173,189	114	180,196	134
13	158	130,146	173,177	120,124	178,184	124
14	158	130,142	175,189,201	110,114	184,188	106,112
15	158	130,142	175,189,201	110,114	184,188	106,112
16	158	128	181,201	110	180,182	118,124
17	158	128	181,201	110	180,182	118,124
18	158	128	181,201	110	180,182	118,124
19	158	130,146	179,201,205	110	267	106
20	158	130	181,201	110	180,194	106
21	158	144,146	183,187	75,110	188,196	124
22	158	132	181,187,230	75,110	188	124
23	158	132	181,187,230	75, 110	188	124
24	158	132	181,187,230	75,110	188	124
25	158	130	175,187,189	75	188	124
26	158	130	175,187,189	75	188	124
27	158	130	175,187,189	75	188	124
28	158	130	179,187,189	75	188	124
29	158	130	179,187,189	75	188	124
30	158	134	187,189	124	188,267	106,124
31	158	134	187,189	124	188,267	106,124
32	158	134	187,189	124	188,267	106,124
33	158	128,146	173,181	110	182,188	112,126
34	156,158	130	175,179	75,120	180,267	106,124
35	158	136,146	177	75,110	188	124
36	158	132,148	175,181,230	75,124	188	124
37	158	132,148	175,181,230	75,124	188	124
38	158	132,148	175,181,230	75,124	188	124
39	156	144	179,187	75,124	194,293	114
40	156	144	179,187	75,124	194,293	114
41	156	144	179,187	75,124	194,293	114
42	156	128,130	175,181	110	188	124
43	158	130	181,185,230	110	180	124
44	160	134,146	175,179	75,110	267,293	124
45	154	132,146	185	110,124	194,196	124,126
46	154	132,146	185	110,124	194,196	124,126
47	154	132,146	185	110,124	194,196	124,126
48	158	130,146	181,230	75,110	194,196	124
49	158	130,146	181,230	75,110	194,196	124
50	158	130,146	181,230	75,110	194,196	124

В общей сложности среди 50 образцов было обнаружено 25 различных генотипов. Максимальное количество деревьев, относящихся к одному и тому же генотипу – 5. Это деревья с номерами 25, 26, 27, 28 и 29. Часть деревьев характеризовались уникальными генотипами, как например 7, 8, 13, 19, 20 и др. По три дерева входили в состав 9 генотипов. Полученные результаты были сопоставлены со схемой посадки и представлены на рисунке 1. Она наглядно иллюстрирует расположение повторяющихся образцов.

В целом полученные результаты указывают на высокий уровень генетического разнообразия генотипов деревьев старого плодового сада Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Все 25 генотипов, которые удалось определить, характеризуются уникальным набором аллелей, выявляемых с помощью 6 SSR маркеров.

1	12	13	27		38	39	50
2	11	14	26	28	37	40	49
3		15	25	29	36	41	48
4		16	24	30			47
5	10	17	23	31			46
6	9	18	22	32	35	42	45
7	8	19	21	33	34	43	44
		20					

Рис. 1. Схема посадки деревьев старого плодового сада Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Цветом выделены номера образцов, относящиеся к одному генотипу

Заключение. Таким образом, использование SSR маркеров позволило оценить генетический потенциал исследованных деревьев плодового сада, расположенного на территории Центрального ботанического сада НАН Беларуси, выделить уникальные генетические ресурсы, систематизировать имеющийся материал и провести ревизию повторяющихся образцов.

Список литературы

1. Genetic variability and diversification process in local pear cultivars from northwestern Spain using microsatellites / A. R. Ferreira dos Santos [et al.] // *Tree Genetics & Genomes*. – 2011. – Vol. 7, № 5. – P. 1041–1056.
2. Урбанович, О. Ю. Молекулярные методы идентификации и генотипирования яблони и груши / О. Ю. Урбанович // Минск: Право и экономика, 2013. – 210 с.
3. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.) / R. Liebhard [et al.] // *Molecular Breeding*. – 2002. – Vol. 10, № 4. – P. 217–241.
4. Cevik, V. High-resolution genetic analysis of the *Sd-1* aphid resistance locus in *Malus* spp. / V. Cevik, J. King // *Theoretical and applied genetics*. – 2002. – Vol. 105, № 2–3. – P. 346–354.
5. Урбанович, О. Ю. Паспортизация сортов яблони на основе SSR-маркеров / О. Ю. Урбанович, З. А. Козловская, Н. А. Картель // *Доклады НАН Беларуси*. – 2008. – Т. 52, № 5. – С. 93–99.