ГЕНЕТИКА, 2021, том 57, № 6, с. 661–673

ГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ

УДК 575.174.015.3:634.11

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ СОРТОВ ЯБЛОНИ НАРОДНОЙ СЕЛЕКЦИИ (*Malus* × *domestica* Borkh.) ПОВОЛЖЬЯ ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ВИР ПО ДАННЫМ NBS-ПРОФАЙЛИНГА

© 2021 г. А. А. Трифонова[1, *], А. В. Шлявас[2], Л. В. Дедова[1], К. В. Борис[1], А. М. Кудрявцев[1]

[1]*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия*

[2]*Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, 190000 Россия*

**e-mail: aichka89@mail.ru*

Поступила в редакцию 02.06.2020 г.
После доработки 28.07.2020 г.
Принята к публикации 25.08.2020 г.

Проведен анализ внутривидового полиморфизма последовательностей семейства NBS-LRR генов устойчивости 112 сортов яблони народной селекции из коллекции Волгоградской опытной станции ВИР и 16 промышленных сортов яблони отечественной и зарубежной селекции с использованием метода NBS-профайлинга. Показана высокая вариабельность NBS-LRR генов устойчивости сортов яблони народной селекции (75.2%, $H_e = 0.25 \pm 0.009$) и выявлена их дифференциация от промышленных сортов. Идентифицированы группы сортообразцов поволжской народной селекции, относящихся к сортотипам Яндыковские, Мамутовские, Боровинки, Бели и Скруты. Показано, что не все образцы одного сортотипа кластеризуются вместе. У образцов сортотипов Яндыковские и Мамутовские выявлены отличные от остальных изученных образцов NBS-паттерны, что может свидетельствовать о наличии у них специфического набора генов устойчивости.

Ключевые слова: яблоня, сорта народной селекции, гены устойчивости, генетические ресурсы, генетическое разнообразие.

DOI: 10.31857/S0016675821060114

Центральной составляющей растительного биологического разнообразия являются генетические ресурсы культурных растений и дикорастущих родственных видов, так как они играют важную роль в производстве продовольствия, устойчивом развитии экологически безопасного сельского хозяйства и обеспечении сырьем промышленности. Сокращение генетического разнообразия за счет ограниченного количества промышленно выращиваемых культур и сортов ведет к генетической эрозии и снижает показатели адаптивного потенциала культивируемых растений, их устойчивость к абиотическим и биотическим стрессам [1].

Проблема сокращения генетического разнообразия актуальна и для плодовых культур. В настоящее время в нашей стране основной плодовой культурой является яблоня (*Malus* × *domestica* Borkh.), выращиваемая на площади около 193 тыс. га [2]. Ведущая роль в сохранении генетических ресурсов яблони в Российской Федерации принадлежит Федеральному исследовательскому центру Всероссийскому институту генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), в шести филиалах которого сохраняется коллекция, насчитывающая более 3800 образцов сортов и видов яблони. Филиалы ВИР расположены в шести регионах страны с различными экологическими и почвенно-климатическими условиями.

В городе Краснослободске в северной возвышенно-равнинной части Волго-Ахтубинской поймы находится Волгоградская опытная станция (ВОС) – филиал ВИР. В коллекционных насаждениях яблони ВОС сохраняется более 800 соортообразцов зарубежной, отечественной современной и народной селекции. Особое значение как для сохранения биологического разнообразия, так и в качестве источников устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам имеют стародавние сорта местной селекции. Они собраны коллекторами ВИР в 60–80-х гг. XX в. в районах Среднего и Нижнего Поволжья и сочетают в себе долговечность, высокую адаптивность и пластичность к условиям данного региона [3].

Известный помолог В.В. Пашкевич считал, что с давних времен Поволжье, несмотря на резко выраженный континентальный климат, “... в своей средней и южной части представляет собой район наиболее самобытного русского плодоводства...”,

основой которого является яблоня [4]. Здесь сформировались такие сорта яблони, как Бель, Боровинка Акуловская, Мальт, Мамутовское, Скрут, Яндыковское [4, 5]. Следует отметить, что на формирование разнообразия поволжских сортов яблони народной селекции существенное влияние оказала близость древних торговых путей, по которым завозили окультуренные формы яблони из Средней Азии [6].

У сортов народной селекции Поволжья из коллекции ВИР достаточно хорошо изучены морфобиологические особенности, полевая устойчивость к основным вредителям и болезням. Однако данные сорта мало изучены с использованием современных молекулярно-генетических методов, которые в настоящее время широко применяются при исследовании коллекций генбанков для оценки генетического разнообразия, генотипирования образцов коллекций, изучения их происхождения и родословных, а также для поиска источников и доноров ценных хозяйственных признаков для селекции [7].

Особый интерес представляет изучение семейства генов резистентности (Resistance genes (R-genes)), определяющих устойчивость растений ко многим патогенам, в связи с их высокой хозяйственной ценностью. В геноме яблони идентифицировано более 800 генов устойчивости и их аналогов (Resistance Gene Analog, RGA), имеющих NBS (Nucleotide Binding Site) домен [8].

Одним из методов оценки полиморфизма последовательностей семейства генов устойчивости в геноме растений является NBS-профайлинг, основанный на специфической амплификации фрагментов ДНК с помощью двух праймеров, один из которых разработан на основе последовательности одного из консервативных мотивов в домене, кодирующем сайт связывания нуклеотидов (P-петля, киназа 2, GLPL), а другой комплементарен последовательности адаптера, лигированного с фрагментами рестрикции геномной ДНК [9].

Метод NBS-профайлинга ранее был успешно использован для идентификации, картирования и маркирования генов устойчивости к парше и мучнистой росе у яблони [10], а также для оценки вариабельности NBS-LRR генов устойчивости у сортов яблони отечественной и зарубежной селекции, в том числе у образцов сорта яблони народной селекции Антоновка [11].

Целью данной работы было исследование полиморфизма NBS-LRR генов устойчивости сортов яблони народной селекции Поволжья из коллекции Волгоградской опытной станции ВИР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения исследования были отобраны 128 образцов яблони: в том числе 112 образцов сортов яблони народной селекции из коллекции Волгоградской опытной станции ВИР, а также 16 промышленных сортов яблони зарубежной и отечественной селекции из коллекции ВИР и ФНЦ им. И.В. Мичурина (табл. 1).

ДНК выделяли из свежих молодых листьев с использованием набора ZR Plant/Seed DNA Mini Prep (Zymo Research) согласно инструкции производителя.

NBS-профайлинг проводили по стандартной методике [9], с небольшими модификациями. Для рестрикции геномной ДНК использовали эндонуклеазу *Mse*I (NEB). Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием двух праймеров (NBS2 5'-GTWGTYTTICCYRAICCISSCAT-3' и NBS7 5'-ATTGTTGGRATGGGMGGIMTIGG-3') [9] и набора реактивов производства “Диалат-ЛТД”, в термоциклере GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Продукты реакции амплификации разделяли электрофорезом в 6%-ном полиакриламидном геле в 1× TBE буфере в камере Sequi-Gen® GT Sequencing Cell (BioRad), с последующим окрашиванием нитратом серебра по методу H. Benbouza с соавт. [12].

Наличие/отсутствие продуктов амплификации отмечали визуально, учитывали только четко воспроизводимые фрагменты, результаты заносили в бинарную матрицу (1/0) в программе Microsoft Excel. Значения ожидаемой гетерозиготности (H_e) рассчитывали с помощью программы GenAlEx6.41 [13]. Расчет коэффициента генетического сходства Дайса (Dice coefficient) между образцами и многомерный анализ по двум главным координатам (PCO – Principal coordinates analysis) были проведены с использованием программы PAST 3.16 [14]. Кластерный анализ был проведен методом Neighbor-Joining (NJ) в программе MEGA7 [15].

Анализ генетической структуры коллекции проводили с помощью байесовской кластеризации в программе Structure v. 2.3.4 [16]. Тестировались от одного до 15 кластеров (K), для каждого числа K анализ повторялся 5 раз. Расчет числа возможных кластеров проводили с помощью 1000000 генераций Марковских Цепей Монте-Карло, с отбрасыванием первых 300000 генераций (burn-in), с учетом наличия генетического смешения (admixture) и скоррелированности частот встречаемости аллелей (correlated allele frequency). Последующий выбор оптимального количества кластеров осуществляли с помощью сервиса Structure Harvester [17]. Визуализацию результатов проводили с помощью сервиса CLUMPAK [18].

Таблица 1. Образцы яблони, использованные в работе

№ п/п	Название образца	Номер каталога ВИР	Происхождение [3]
1	Алое Зимнее	к-35269	Старорусский сорт
2	Анис Алый	к-21629	»
3	Анис Алый Крупноплодный № 1	к-21620	Местный поволжский сорт
4	Анис Белый	к-37804	Старорусский сорт
5	Анис Красный	к-37805	»
6	Анис Летний из Джилги	к-22238	Местный поволжский сорт
7	Анис Московский	к-21615	»
8	Анис Поздний Крупноплодный 5/5а	к-30074	»
9	Анис Полосатый	к-21627	»
10	Анис Полосатый Вольненский	к-21625	»
11	Анис Промежуточный Хвалынский	к-28731	»
12	Анис Розово-Полосатый	к-34254	»
13	Анис Семикаракорский	к-21623	»
14	Анис Серый	к-21630	Старорусский сорт
15	Анис Серый Успенский № 1	к-21621	Местный поволжский сорт
16	Анис Серый Успенский № 2	к-21622	»
17	Анис Шацкий	к-15976	Старорусский сорт
18	Антоновка Красная	к-21652	Местный поволжский сорт
19	Антоновка Плоская	к-31977	Среднерусский сорт
20	Антоновка Поздняя Успенская	к-21645	Местный поволжский сорт
21	Апорт Белый	к-15984	Среднерусский сорт
22	Апорт Солянский	к-25427	Местный поволжский сорт
23	Апорт Успенский	к-21658	Местный поволжский сорт
24	Апортовидное Донское	к-21667	»
25	Арабка из Солянки	к-28732	»
26	Арабка Синяя	к-21672	»
27	Астраханское Белое	к-146	Русский сорт народной селекции, наиболее распространен в европейской части России
28	Астраханское Красное	к-27818	Русский сорт народной селекции, распространенный в окрестностях Астрахани
29	Астраханское Красное из Млиево	к-15993	Русский сорт
30	Белевое Сокрутовское	к-28735	Местный поволжский сорт
31	Бель Алая	к-28736	»
32	Бель Красная	к-28737	»
33	Бель Красноярская	к-25429	»
34	Бель Осенняя	к-38709	»
35	Бель Полосатая из Ленинска	к-21787	»
36	Бель Полосатая из Пологого Займища	к-21788	»
37	Бель Полосатая из Пологого Займища	к-25428	»
38	Бель Полосатая из Солянки	к-25430	»
39	Бель Полосатая Каменская	к-21790	»
40	Бель Рогатинская	к-36139	»
41	Бель Розовая	к-16002	»
42	Бель Сасыкольская	к-25432	»
43	Бель Сахарная	к-27820	Среднерусский сорт
44	Бель Суворинская	к-31981	Местный поволжский сорт

Таблица 1. Продолжение

№ п/п	Название образца	Номер каталога ВИР	Происхождение [3]
45	Боровинка Акуловская	к-27821	Местный поволжский сорт
46	Боровинка Акуловская из Акуловки	к-21810	»
47	Боровинка Акуловская из Отрадного	к-21812	»
48	Боровинка Акуловская с молодого дерева	к-21811	»
49	Боровинка Акуловская с х. Поповки	к-21807	»
50	Боровинка Крупноплодная IIIа	к-21808	»
51	Боровинка Родионовская	к-21815	»
52	Варгуль Акуловский	к-21826	»
53	Варгуль Воронежский	к-16037	Среднерусский сорт
54	Варгуль Серафимовический	к-21827	Местный поволжский сорт
55	Волжское Зимнее	к-21837	»
56	Волжское Зимнее	к-36141	»
57	Зимнее Крупное	к-21945	»
58	Коричное Полосатое Палевое	к-28741	»
59	Крупнина	к-22057	»
60	Крупнина	к-25447	»
61	Мальт Багаевский Харабалинский	к-22141	»
62	Мальт Крестовый	к-16149	»
63	Мальт Нижнечирской	к-22139	»
64	Мамутовское Квасное	к-22142	»
65	Мамутовское Квасное Красноярское	к-25461	»
66	Мамутовское Крупное	к-28748	»
67	Мамутовское Сладкое Вольненское	к-25462	»
68	Мамутовское Сладкое из Заволжья	к-27834	»
69	Налив Белый Настоящий	к-16162	Стародавний русский сорт
70	Налив Белый Орловский	к-22173	»
71	Налив Розовый	к-22175	»
72	Налив Ряжский	к-22176	»
73	Нижнечирское Осеннее	к-22179	Местный поволжский сорт
74	Плоское Ребристое от Прокопенко	к-28752	»
75	Ренет Курский Золотой	к-22282	Стародавний русский сорт
76	Розмарин Русский	к-22320	Местный поволжский сорт
77	Розовка	к-22326	»
78	Скороспелка Дубовская	к-36245	»
79	Скрут Алый	к-16254	»
80	Скрут Алый Харабалинский	к-22382	»
81	Скрут Белый	к-16255	»
82	Скрут Золотухинский	к-25492	»
83	Скрут Красный	к-16257	»
84	Скрут Сасыкольский	к-22381	»
85	Хорошавка Алая	к-1736	»
86	Хорошавка Алая Подлесненская	к-36185	»
87	Хорошавка Сенгилеевская	к-16289	»
88	Царский Шип	к-16290	Старорусский сорт

Таблица 1. Окончание

№ п/п	Название образца	Номер каталога ВИР	Происхождение [3]
89	Черногуз	к-16294	Старорусский сорт
90	Черное Дерево	к-22442	»
91	Шаропай	к-37834	»
92	Штрейфлинг Красный Алтуховский	к-27851	Местный поволжский сорт
93	Яндыковское	к-27852	»
94	Яндыковское из Сокрутовки № 1	к-33065	»
95	Яндыковское из Сокрутовки № 2	к-33066	»
96	Яндыковское из Солянки	к-25496	»
97	Яндыковское Колачевское Крупноплодное	к-22456	»
98	Яндыковское Крупноплодное	к-22458	»
99	Яндыковское Позднее	к-22455	»
100	Яндыковское Порослёвое	к-22459	»
101	Яндыковское форма № 1	к-3036А	»
102	Яндыковское форма № 3	к-3037А	»
103	Яндыковское форма № 4	к-3038А	»
104	Яндыковское форма № 5	к-3040А	»
105	Яндыковское форма № 14	к-3047А	»
106	Яндыковское форма № 16	к-3048А	»
107	Яндыковское форма № 17	к-3049А	»
108	Яндыковское форма № 21а	к-3053А	»
109	Яндыковское форма № 22	к-3056А	»
110	Яндыковское форма № 23а	к-3057А	»
111	Яндыковское форма № 24е	к-3064А	»
112	Яндыковское форма № 24ж	к-3065А	»
	Промышленные сорта		
113	Благовест	–	Прима × Бессемянка Мичуринская (Россия)
114	Былина	–	»
115	Курнаковское	–	814 × ПА-29-1-1-63 (Россия)
116	Рождественское	–	Wealthy × BM41497 (Россия)
117	Свежесть	–	Антоновка Краснобочка × PR12T67 (Россия)
118	Скала	–	Прима × Бессемянка Мичуринская (Россия)
119	Флагман	–	Богатырь × Скала (Россия)
120	Braeburn	–	Сеянец Lady Hamilton от свободного опыления (Новая Зеландия)
121	Fireside	–	McIntosh × Longfield (США)
122	Florina	к-40694	612-1 × Jonathan (Франция)
123	Fuji	к-40784	Delicious × Ralls Janet (Япония)
124	Gala	к-40702	Kidd's Orange Red × Golden Delicious (Новая Зеландия)
125	Golden Delicious	к-40769	Происхождение неизвестно (США)
126	Granny Smith	к-43504	Возможно сеянец французского креба (Австралия)
127	Spartan	–	McIntosh × Yellow Newtown (Канада)
128	Wealthy	–	Происхождение неизвестно (США)

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе NBS-профайлинга 128 образцов яблони было выявлено 432 фрагмента (188 фрагментов с помощью праймера NBS2 и 244 – с помощью праймера NBS7). Для каждого изучаемого образца яблони был получен уникальный NBS-спектр. Для образца Мамутовское Сладкое из Заволжья выявлен уникальный фрагмент. Три пары сортов с одинаковым названием, собранные в разное время и имеющие разные каталожные номера: Бель Полосатая из Пологого Займища (к-21788 и к-25428), Волжское Зимнее (к-21837 и к-36141) и Крупнина (к-22057 и к-25447), имели разный набор фрагментов по результатам NBS-профайлинга.

Уровень полиморфизма общей выборки составил 75.7%, а показатель ожидаемой гетерозиготности 0.26 ± 0.009. Отдельно был вычислен уровень разнообразия для сортов народной селекции и промышленных сортов яблони (75.2%, $H_e = 0.25 \pm 0.009$ и 57.3%, $H_e = 0.21 \pm 0.010$ соответственно).

Среднее значение индекса генетического сходства Дайса между парами образцов составило 0.84. Наибольшее сходство (0.99) отмечено между образцами Яндыковское форма № 21а и Яндыковское форма № 23а, а также между образцами Яндыковское форма № 17 и Яндыковское форма № 21а. Кроме сортов из группы Яндыковские, наибольшее генетическое сходство выявлено для образцов Бель Полосатая из Пологого Займища (к-21788) и Бель Полосатая из Ленинска, а также Мамутовское Квасное и Мамутовское Квасное Красноярское (0.98). Минимальный уровень сходства наблюдался между образцами Яндыковское Колачевское Крупноплодное и Волжское Зимнее (к-21837) (0.75), а также между образцами Яндыковское форма № 24ж и Коричное Полосатое Палевое (0.76).

Среднее значение индекса Дайса среди промышленных сортов яблони составило 0.87. Наиболее сходны генетически оказались сорта Gala и Golden Delicious (0.92), наименее – Granny Smith и Свежесть (0.82).

Максимальное и минимальное, а также среднее значение индекса генетического сходства между образцами народной селекции совпадают с соответствующими значениями между образцами общей выборки.

Анализ данных NBS-профайлинга был проведен с использованием метода многомерного шкалирования в программе PAST. На графике главных координат большинство изученных образцов образуют обширную общую группу, включающую промышленные сорта яблони, которые располагаются достаточно компактно в левой верхней части графика (рис. 1). Обособленное положение занимают 14 образцов из группы Яндыковские (Яндыковское Колачевское Крупноплодное, Яндыковское Крупноплодное, Яндыковское из Солянки, Яндыковское из Соркутовки № 2, Яндыковское Порослевое, Яндыковское форма № 1, Яндыковское форма № 4, Яндыковское форма № 14, Яндыковское форма № 16, Яндыковское форма № 17, Яндыковское форма № 21а, Яндыковское форма № 22, Яндыковское форма № 23а, Яндыковское форма № 24е), а также три образца из группы Мамутовские (Мамутовское Квасное, Мамутовское Квасное Красноярское и Мамутовское Сладкое Вольненское). Промежуточное положение между общей группой и сортами из групп Яндыковские и Мамутовские занимают образцы: Анис Розово-Полосатый, Астраханское Красное, Белевое Сокрутовское, Бель Красноярская, Бель Полосатая из Пологого Займища (к-25428) и Бель Сасыкольская.

Анализ полученных данных в программе Structure показал, что оптимальное число кластеров, на которые можно разделить исследуемую выборку, составляет два (рис. 2). Первый кластер формируют 14 образцов из группы Яндыковские, которые были дифференцированы от общей группы на графике главных координат, второй – все оставшиеся образцы (рис. 3,*а*). Также выделяются образцы, включающие компоненты обоих кластеров, в том числе три сорта группы Мамутовские (Мамутовское Квасное, Мамутовское Квасное Красноярское и Мамутовское Сладкое Вольненское) и сорта, которые на графике главных координат занимали промежуточное положение (рис. 3,*а*).

Значение delta K при $K = 7$ также достаточно велико (рис. 2). При разделении сортов на семь кластеров, кроме 14 образцов сортотипа Яндыковские, отдельные кластеры образуют промышленные сорта яблони, а также некоторые сорта группы Мамутовские и группы Боровинки (рис. 3,*б*).

На дендрограмме, построенной методом Neighbour-Joining, отдельный кластер формируют промышленные сорта яблони, в этот же кластер попадают и семь сортов народной селекции: Ренет Курский Золотой, Анис Красный, Анис Белый, Анис Поздний Крупноплодный 5/5а, Мамутовское Сладкое из Заволжья, Волжское Зимнее (к-36141) и Яндыковское форма № 3 (рис. 4).

Также на дендрограмме совместно кластеризуются некоторые образцы из групп сортотипов народной селекции Поволжья: Анисы, Бели, Боровинки, Мамутовские, Скруты и Яндыковские. При этом не все образцы одного сортотипа объединяются в один кластер (рис. 4). 14 из 20 сортов группы Яндыковские и три из пяти сортов группы Мамутовские объединяются в отдельный кластер, включающий также шесть образцов из других групп (те же образцы, что занимали обособленное положение на PCO-графике) (рис. 1).

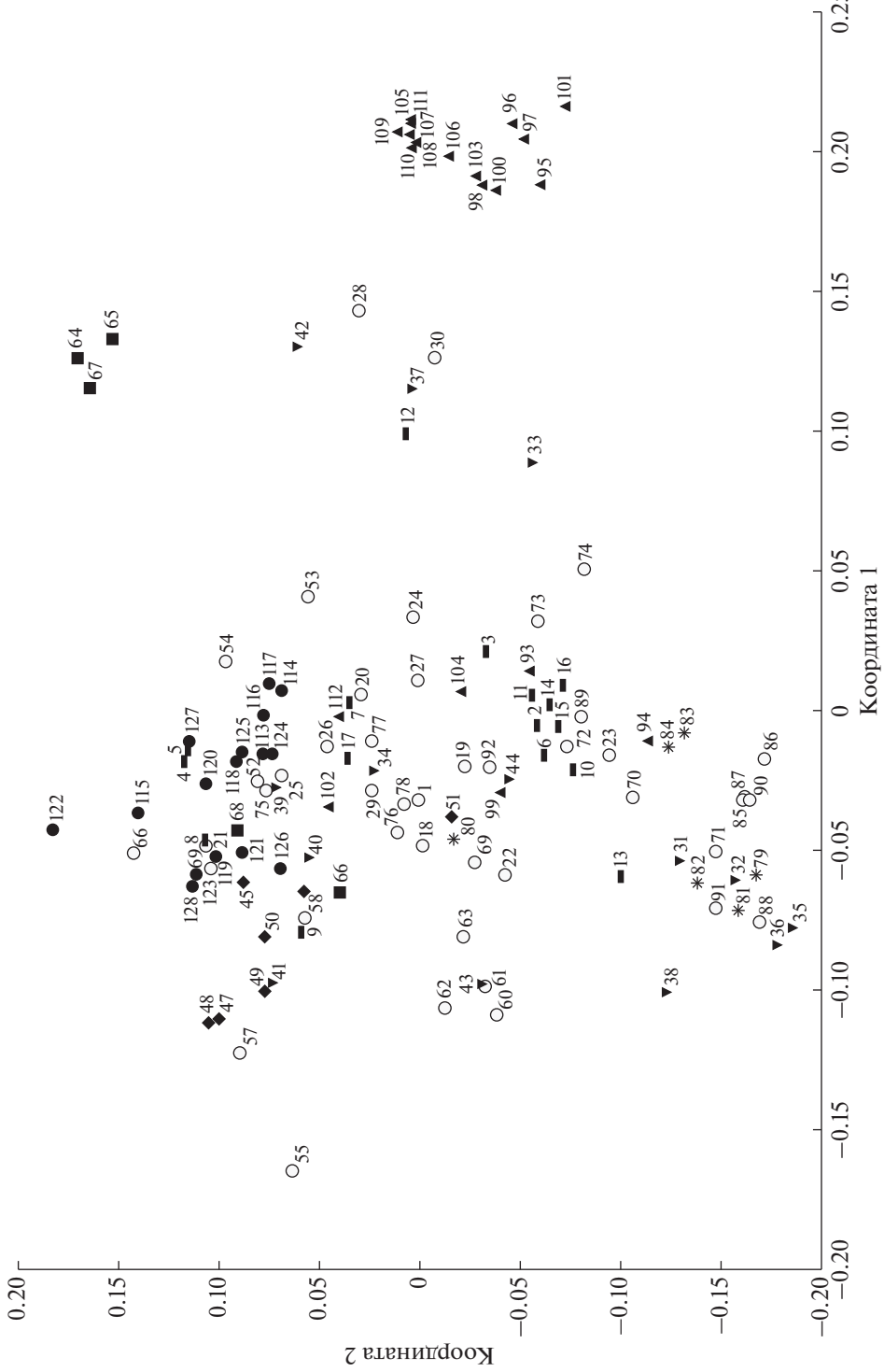

Рис. 1. Расположение изучаемых образцов яблони в главных координатах на основании данных NBS-профайлинга (● – промышленные сорта яблони; ■ – сорта группы Анисы; ▼ – сорта группы Бели; ◆ – сорта группы Боровинки; ▬ – сорта группы Мамутовские; * – сорта группы Скруты; ▲ – сорта группы Яндыковские; ○ – другие сорта Волгоградской опытной станции ВИР). Номера образцов на графике соответствуют порядковым номерам в табл. 1.

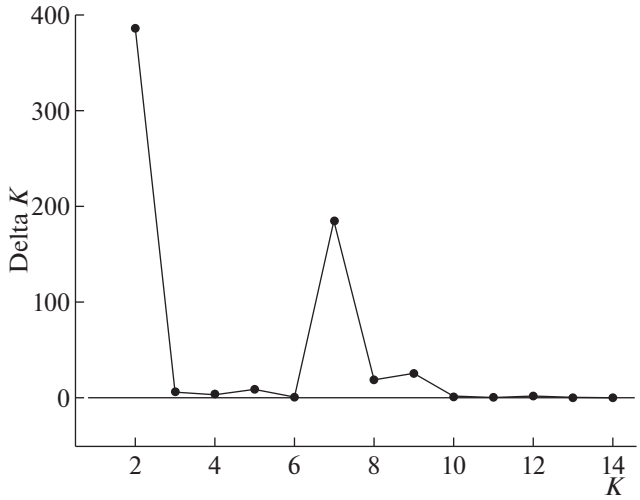

Рис. 2. Оценка оптимального числа кластеров (*K*) с помощью метода delta *K*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный NBS-профайлинг выявил достаточно высокий уровень полиморфизма NBS-LRR генов устойчивости изученной выборки (75.7%, $H_e = 0.26 \pm 0.009$). Для всех образцов были получены уникальные NBS-спектры, в том числе и для трех пар образцов с одинаковыми названиями, собранных в разное время и имеющих разные каталожные номера: Бель Полосатая из Пологого Займища (к-21788 и к-25428), Волжское Зимнее (к-21837 и к-36141) и Крупнина (к-22057 и к-25447) (табл. 1). Данные пары образцов имеют существенные различия по NBS-спектрам, следовательно можно предположить, что они не относятся к одному сорту и их наименования в коллекции могут быть пересмотрены.

Уровень вариабельности сортов народной селекции оказался выше, чем у отечественных и зарубежных промышленных сортов (75.2%, $H_e = 0.25 \pm 0.009$ и 57.3%, $H_e = 0.21 \pm 0.010$ соответственно). Анализ полученных результатов с использованием различных статистических подходов позволил выявить генетические различия между промышленными сортами яблони, взятыми в анализ, и сортами народной селекции Поволжья. Так, на графике главных координат промышленные сорта располагаются достаточно компактной группой в левой верхней части графика, а сорта народной селекции распределены по графику (рис. 1), в то время как при анализе генетической структуры изученной выборки при числе кластеров равном двум ($K = 2$) промышленные сорта формируют общий кластер со стародавними сортами (рис. 3,*а*), а при $K = 7$ промышленные сорта выделяются в отдельный кластер (рис. 3,*б*). При этом по результатам филогенетического анализа промышленные сорта формируют отдельный кластер, в который попадают также семь сортов народной селекции (рис. 4). Следует отметить, что некоторые промышленные сорта, взятые в анализ, такие как Golden Delicious, Wealthy и Granny Smith, были созданы еще в XIX в. [19].

Ранее, при исследовании генетического разнообразия сортов яблони народной селекции Северо-Запада из коллекции НПБ “Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР” методом AFLP-анализа была выявлена дифференциация между современными промышленными и стародавними сортами [20]. Подобное разделение было показано и для группы сортов народной селекции Антоновки и 32 отечественных и зарубежных сортов яблони при анализе полиморфизма NBS-LRR генов устойчивости [11]. При оценке генетического разнообразия и популяционной структуры коллекций яблони Франции и Центральной Италии с использованием микросателлитных маркеров также был выявлен высокий уровень полиморфизма местных и стародавних сортов и показана их дифференциация от широко распространенных коммерческих сортов [21, 22].

Полученные результаты свидетельствуют о большом разнообразии и уникальности NBS-LRR генов устойчивости у сортов яблони народной селекции Поволжья и подтверждают возможность их использования в качестве потенциальных источников генов устойчивости для селекции. Следует отметить, что в настоящее время в мировом производстве в основном используют только 10–20 сортов яблони [23]. Преобладание такого небольшого числа сортов на больших площадях существенно увеличивает их уязвимость перед различными неблагоприятными факторами окружающей среды, а также приводит к вытеснению местных и стародавних сортов, хорошо адаптированных к местным условиям, и в результате к существенному сокращению генетического разнообразия. Поэтому задача сохранения и изучения стародавних сортов яблони является особенно актуальной.

Поволжье считается одним из центров зарождения садоводства в России, на формирование которого повлияла близость древних торговых путей, проходивших через данный регион, а также специфические климатические условия, определившие самобытный характер садоводства в этой зоне [6]. В Поволжье сформировались местные сортотипы яблони, такие как Яндыковское, Боровинка Акуловская, Бель, Мамутовское, Мальт, Скрут, Хорошавка.

Данные NBS-профайлинга позволили дифференцировать группы сортов народной селекции Поволжья. Так, все использованные методы ана-

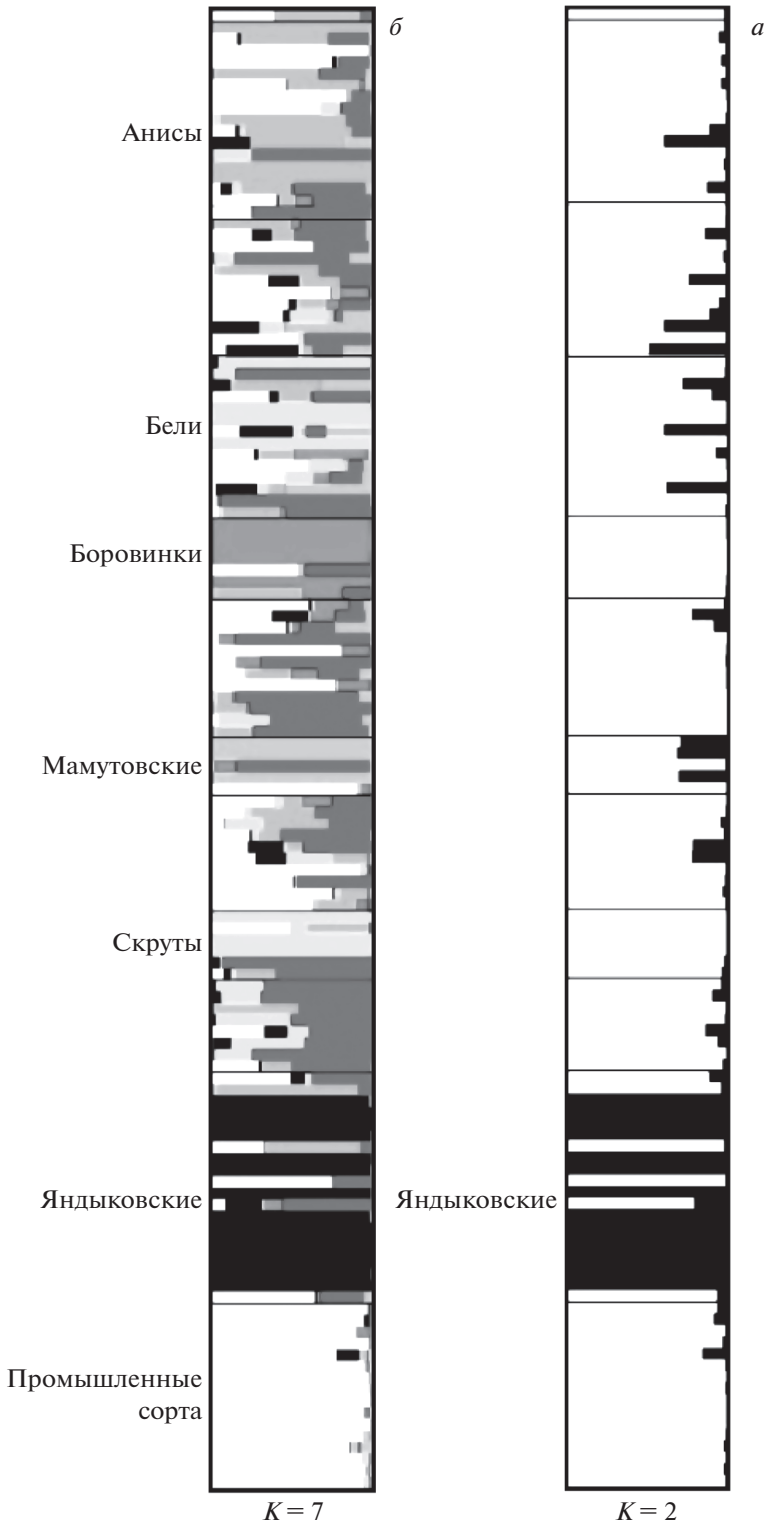

Рис. 3. Вероятность отнесения исследованных образцов яблони к одной из групп по результатам анализа в программе STRUCTURE. *а* – с числом кластеров 2; *б* – с числом кластеров 7. Горизонтальная ось – апостериорная вероятность принадлежности образца к определенному кластеру; вертикальная ось – анализируемые образцы. Образцы на графиках расположены в соответствии с порядковыми номерами в табл. 1.

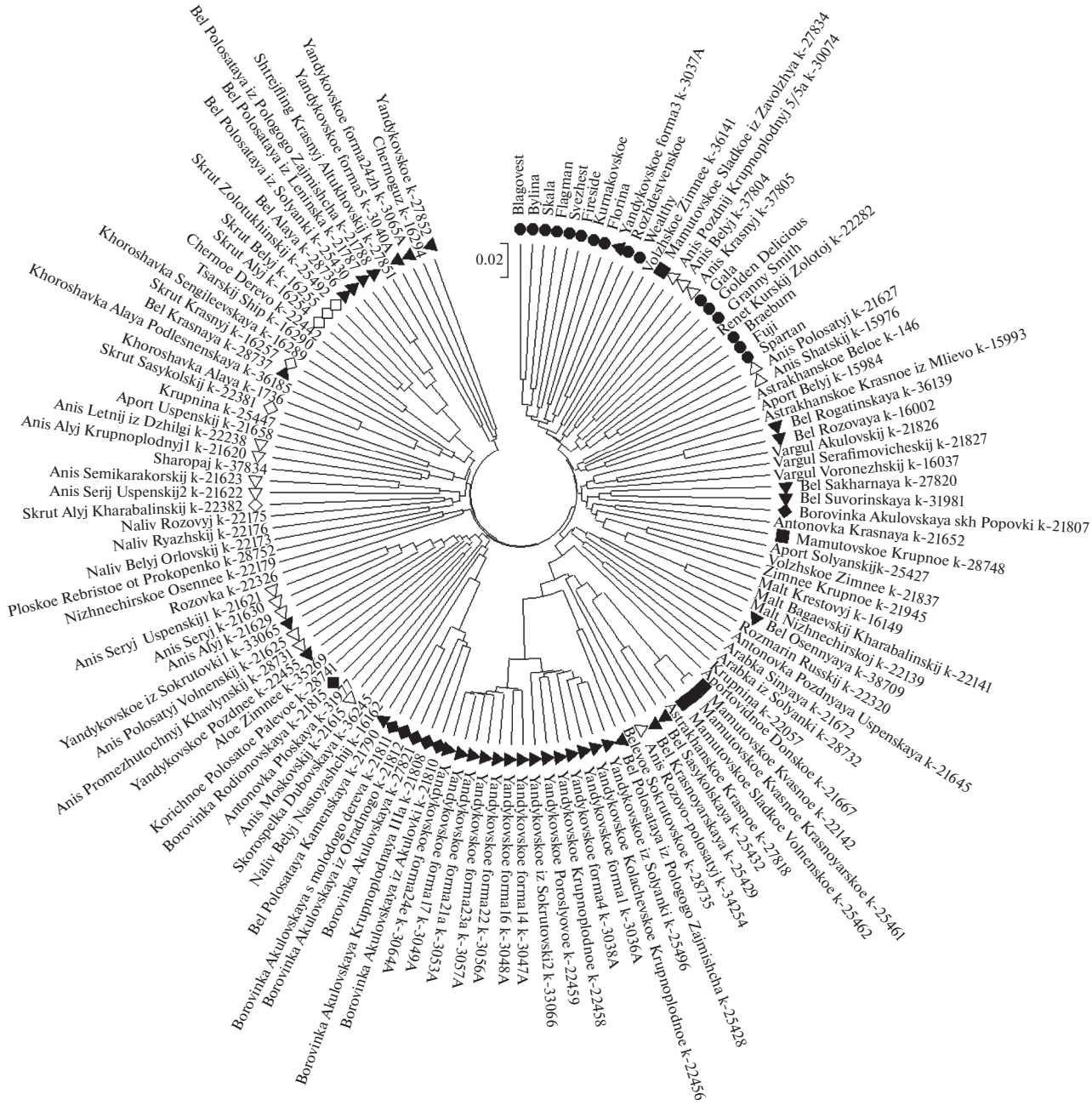

Рис. 4. Дендрограмма, построенная по данным NBS-профайлинга образцов яблони методом Neighbor-Joining (● – промышленные сорта яблони; △ – сорта группы Анисы; ▼ – сорта группы Бели; ◆ – сорта группы Боровинки; ■ – сорта группы Мамутовские; ◇ – сорта группы Скруты; ▲ – сорта группы Яндыковские).

лиза выделяют группу из 14 образцов сортотипа Яндыковские, которые занимают обособленное положение на графике главных координат, образуют отдельный кластер на дендрограмме и по данным анализа генетической структуры изученной выборки являются наиболее генетически отличными от остальных изученных образцов (рис. 1; 3,*а*; 4), что позволяет предположить наличие у данных образцов специфичного набора генов устойчивости.

Кроме того, по результатам анализа можно выделить группы сортов Мамутовские, Мальты, Боровинки, Анисы, Скруты и Бели. При этом не все образцы одной группы сортов кластеризуются вместе (например, пять из семи образцов группы Боровинки), а в некоторых случаях сорта из одной группы формируют несколько кластеров (например, образцы группы Анисы) (рис. 1; 3,*б*; 4), что может быть связано с особенностями форми-

рования поволжских групп сортов и методами их отбора в коллекцию.

Сорта народной селекции Поволжья часто возникали в определенном населенном пункте (например, сорт Яндыковское происходит из села Яндыки Лиманского района Астраханской области) и размножались корневой порослью и отводками, а также путем посева семян, поэтому многие из них представляют собой большие сортовые семьи, возникшие от нескольких исходных форм, с разновидностями, характеризующимися значительным фенотипическим разнообразием [5]. При этом высокая фенотипическая изменчивость поволжских сортов отмечена как при территориальной удаленности, так и в пределах одного сада [5, 24], что могло повлиять на отбор образцов в коллекцию и затруднить достоверное отнесение сортообразцов к той или иной группе. Кроме того, при сборе коллекции и составлении каталогов исследователи опирались на оригинальные названия, которыми пользуется местное население при характеристике сорта. Поэтому сорта, относящиеся к одной группе по фенотипическим данным либо по оригинальному названию, по молекулярно-генетическим данным могут существенно различаться.

На формирование сортов яблони Поволжья, включая и разнообразие генов устойчивости, повлияли дикорастущие виды – яблоня Сиверса (*Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem.) и яблоня ранняя (*Malus praecox* (Pall.) Borkh. (=*Malus pumila* Mill.)). При этом главным прародителем поволжских сортов является яблоня Сиверса, завезенная из Средней Азии по торговым путям [24].

Дикорастущие виды яблони считаются наиболее перспективными источниками генов устойчивости к болезням и вредителям для селекции [23, 25]. Но вместе с ценными хозяйственными признаками при скрещивании с дикими видами потомству передаются и нежелательные признаки, что затрудняет работу селекционеров, в то время как сорта народной селекции прошли длительный отбор и имеют меньшее количество негативных признаков, которые проявляются при скрещиваниях и могут стать хорошим дополнением к диким видам в селекционных программах. Стародавние сорта яблони, как например Антоновка, успешно использовались отечественными и зарубежными селекционерами в качестве источников устойчивости к низким температурам, а также болезням и вредителям, в том числе к парше [26, 27]. Ранее, при исследовании полиморфизма генов устойчивости методом NBS-профайлинга у девяти образцов Антоновки были выявлены NBS-паттерны, отличные от остальных изученных 32 отечественных и зарубежных сортов яблони, что свидетельствует о специфичности генов устойчивости образцов данного сортотипа [11]. В изученной коллекции ВОС сортообразцы групп Яндыковские и Мамутовские были наиболее дифференцированы от остальных образцов и, возможно, имеют специфичные гены устойчивости, что может быть связано с участием диких видов в формировании данных сортов.

Таким образом, впервые показан высокий уровень вариабельности NBS-LRR генов устойчивости сортов яблони народной селекции Поволжья из коллекции ВОС и их отличие от промышленных сортов яблони. Полученные данные свидетельствуют о специфичности NBS-LRR генов устойчивости сортов народной селекции Поволжья и подтверждают потенциал изученных сортов для селекции на устойчивость к болезням и вредителям.

Выявлена дифференциация образцов, относящихся к одному сортотипу (Яндыковские, Мамутовские, Боровинки, Бели, Скруты, Анисы), по-видимому связанная с особенностями формирования поволжских сортов и методами отбора образцов в коллекцию. Результаты исследования подтверждают эффективность использования современных молекулярно-генетических методов для изучения и управления генетическими ресурсными коллекциями.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-29-08020) и тем государственного задания № 0112-2019-0002 и 0662-2019-0004.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. http://www.fao.org/cgrfa/topics/plants/ru/.
2. Итоги Всероссийской сельскохозяйственной переписи 2016 года. Т. 4: Посевные площади сельскохозяйственных культур и площади многолетних насаждений и ягодных культур: кн. 1: Площади сельскохозяйственных культур и многолетних насаждений. Федеральная служба гос. статистики. М.: ИИЦ “Статистика России”, 2018. 562 с.
3. *Шлявас А.В., Сиднин А.С., Багмет Л.В. и др.* Каталог мировой коллекции ВИР. Выпуск 890. Яблоня: Сорта народной селекции, сохраняемые на Волгоградской опытной станции ВИР и в гербарии ВИР (WIR). СПб., 2019. С. 7–19. https://doi.org/10.30901/978-5-907145-09-2

4. *Пашкевич В.В.* Плодоводство Астраханской губернии. СПб., 1911. 384 с.

5. *Малыченко В.В.* Изменчивость местных сортов яблони в очагах формообразования // Тр. Волгоградской опытной станции ВИР. 1973. Вып. 7. С. 121–134.

6. *Рылов Г.П., Стеркин И.В.* Путешествие за сортом. М.: Агропромиздат, 1987. 223 с.

7. *Bramel P., Volk G.M.* A Global Strategy for the Conservation and Use of Apple Genetic Resources. Bonn, Germany: Global Crop Diversity Trust, 2019. 50 p. https://doi.org/10.13140/RG.2.2.34072.34562

8. *Perazzolli M., Malacarne G., Baldo A. et al.* Characterization of resistance gene analogues (RGAs) in apple (*Malus* × *domestica* Borkh.) and their evolutionary history of the Rosaceae family // PLoS One. 2014. V. 9. № 2. P. e83844. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083844

9. *Van der Linden C.G., Wouters D.C., Mihalka V. et al.* Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 109. № 2. P. 384–393. https://doi.org/10.1007/s00122-004-1642-8

10. *Calenge F., van der Linden C.G., van de Weg E. et al.* Resistance gene analogues identified through the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple // Theor. Appl. Genet. 2005. V. 110. № 4. P. 660–668. https://doi.org/10.1007/s00122-004-1891-6

11. *Савельева Е.Н., Борис К.В., Кочиева Е.З., Кудрявцев А.М.* Полиморфизм NBS-LRR генов устойчивости сортов яблони (*Malus domestica* Borkh.) по данным NBS-профайлинга // Генетика. 2016. Т. 52. № 12. С. 1463–1468. https://doi.org/10.7868/S0016675816120110

12. *Benbouza H., Jacquemin J.M., Baudoin J.P., Mergeai G.* Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels // BASE. 2006. V. 10. № 2. P. 77–81.

13. *Peakall R., Smouse P.E.* GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update // Bioinformatics. 2012. V. 28. № 19. P. 2537–2539. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460

14. *Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D.* PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis // Paleontologia Electronica. 2001. V. 4. № 1. P. 1–9.

15. *Kumar S., Stecher G., Tamura K.* MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. № 7. P. 1870–1874. https://doi.org/10.1093/molbev/msw054

16. *Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.* Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000. V. 155. № 2. P. 945–959.

17. *Earl D.A., von Holdt B.M.* STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // Conserv. Genet. Res. 2012. V. 4. № 2. P. 359–361. https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7

18. *Kopelman N.M., Mayzel J., Jakobsson M. et al.* Clumpak: A program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K // Mol. Ecol. Res. 2015. V. 15. № 5. P. 1179–1191. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387

19. Помология: в 5-ти томах. Т. 1. Яблоня / Под ред. Седова Е.Н.. Орел: ВНИИСПК, 2005. 576 с.

20. *Шлявас А.В., Трифонова А.А., Дедова Л.В. и др.* Генетическое разнообразие местных и стародавних сортов яблони (*Malus* × *domestica* Borkh.) из коллекции ВИР по данным AFLP-анализа // Генетика. 2019. Т. 55. № 11. С. 88–97. https://doi.org/10.1134/S0016675819110146

21. *Lassois L., Denance C., Ravon E. et al.* Genetic diversity, population structure, parentage analysis, and construction of core collections in the French apple germplasm based on SSR markers // Plant Mol. Biol. Rep. 2016. V. 34. P. 827–844. https://doi.org/10.1007/s11105-015-0966-7

22. *Marconi G., Ferradini N., Russi L. et al.* Genetic characterization of the apple germplasm collection in Central Italy: the value of local varieties // Frontiers in Plant Sci. 2018. V. 9. P. 1460. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01460

23. *Volk G.M., Chao C.T., Norelli J. et al.* The vulnerability of US apple (*Malus*) genetic resources // Genet. Resour. Crop Evol. 2015. V. 62. № 5. P. 765–794. https://doi.org/10.1007/s10722-014-0194-2

24. *Пономаренко В.В., Пономаренко К.В.* Генофонд сортов яблони народной селекции – национальное достояние России // Научн. тр. ГНУ СКЗНИИСиВ. 2013. Т. 1. С. 53–57.

25. *Pereira-Lorenzo S., Fischer M., Ramos-Cabrer A.M., Castro I.* Apple (*Malus* spp.) breeding: present and future // Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits. 2018. V. 3. P. 3–29. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91944-7_1

26. *Bus V.G.M., van de Weg W.E., Peil A. et al.* The role of Schmidt's 'Antonovka' in apple scab resistance breeding // Tree Genet Genom. 2012. V. 8. № 4. P. 627–642. https://doi.org/10.1007/s11295-012-0470-2

27. *Pikunova A., Madduri M., Sedov E. et al.* "Schmidt's Antonovka" is identical to "Common Antonovka", an apple cultivar widely used in Russia in breeding for biotic and abiotic stresses // Tree Genet Genom. 2014. V. 10. № 2. P. 261–271. https://doi.org/10.1007/s11295-013-0679-8

Genetic Diversity of Old and Local Apple (*Malus* × *domestica* Borkh.) Cultivars of Volga Region from VIR Collection Inferred from NBS-Profiling

A. A. Trifonova[a, *], A. V. Shlyavas[b], L. V. Dedova[a], K. V. Boris[a], and A. M. Kudryavtsev[a]

[a] *Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

[b] *Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, Saint-Petersburg, 190000 Russia*

**e-mail: aichka89@mail.ru*

Intraspecific polymorphism of the NBS-LRR resistance genes sequences of 112 old and local apple cultivars of Volga region from the collection of the Volgograd experiment station of VIR and 16 commercial Russian and foreign apple cultivars using the NBS-profiling method was analyzed. The high NBS-LRR resistance genes variability of old and local apple cultivars from Volga region was shown (75.2%, $H_e = 0.25 \pm 0.009$) and their differentiation from commercial cultivars was revealed. Groups of accessions of old and local cultivars of Volga region Yandykovskoe, Mamutovskoe, Borovinka, Bel' and Skrut were identified. It was shown that not all accessions from the same group of cultivars cluster together. Yandykovskoe and Mamutovskoe accessions were found to have NBS patterns that were different from the rest of the studied accessions, which may indicate that they have a specific set of resistance genes.

Keywords: apple, landraces, resistance genes, genetic resources, genetic diversity.