

М.В. Рыжова, м.н.с.
ФГБНУ ФНЦ Садоводства, Россия, г. Москва
maryzhka@gmail.com

УДК 634.13:632.111.5

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГИБРИДОВ
СЛИВЫ КОЛЛЕКЦИИ ФГБНУ ФНЦ САДОВОДСТВА,
ПОЛУЧЕННЫХ ОТ ОТДАЛЕННЫХ СКРЕЩИВАНИЙ
МЕТОДОМ ЭМБРИОКУЛЬТУРЫ**

Реферат. В статье представлены результаты исследований полиморфизма генов 19 образцов гибридов сливы (*Prunus L.*) коллекции ФГБНУ ФНЦ Садоводства, полученных от отдалённых скрещиваний методом эмбриокультуры и 4 образцов родительских форм сливы (*Prunus L.*) сортов: Стенлей, Кубанская комета, Симоновская, Смолинка. Молекулярно-генетические исследования гибридов сливы с целью изучения полиморфизма генов гибридов сливы (*Prunus L.*) полученных от отдалённых скрещиваний методом эмбриокультуры, проводились с использованием SSR-маркеров. Проведенные исследования позволили определить уникальные составы аллелей микросателлитных локусов 19 форм гибридов сливы (*Prunus L.*) из коллекции ФГБНУ ФНЦ Садоводства.

Ключевые слова: ДНК, слива, ПЦР, SSR-маркеры, селекция

Abstract. The article presents the results of studies of gene polymorphism of 19 samples of plum hybrids (*Prunus L.*) from the collection of the Federal State Budgetary Scientific Institution of the Federal Scientific Center for Horticulture, obtained from distant crosses by the method of embryoculture and 4 samples of parental forms of plum (*Prunus L.*) varieties: Stanley, Kubanskaya komet, Simonovskaya, Smolinka. Molecular genetic studies of plum hybrids in order to study the gene polymorphism of plum hybrids (*Prunus L.*) obtained from distant crosses by the embryo culture method were carried out using SSR markers. The conducted studies made it possible to determine the unique compositions of the alleles of microsatellite loci of 19 forms of plum hybrids (*Prunus L.*) from the collection of the Federal State Budget Scientific Institution of the Federal Scientific Center for Horticulture.

Keywords: DNA, plum, PCR, SSR markers, selection

Введение

Немалая доля представителей рода *Prunus* имеет хозяйственную ценность и выращивается в качестве плодовых и декоративных растений. [1] Слива домашняя (*Prunus domestica* L.) является одной из наиболее трудных для генетических исследований плодовых культур. В отличие от большинства плодовых культур слива домашняя – гексаплоидный вид ($2n=48$, $x=8$), возникший путем сложной межвидовой гибридизации, тогда как большинство других видов – диплоиды. Слива русская (алыча) (*Prunus ceracifera* Ehrh.), разновидность сливы диплоид ($2n = 2x = 16$). Тем не менее, в связи с высокой сельскохозяйственной значимостью сливы домашней, изучение ее генетического разнообразия и потенциала всегда представляло большой интерес. В генетических исследованиях сливы домашней были апробированы различные типы маркерных систем [3;4;5;6]. Первые молекулярно-генетические исследования сливы с применением ДНК-маркеров основывались на методах RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) [5] и RFLP [4] генотипирования.

Несмотря на то что метод SSR-маркирования широко внедрен в исследовательскую практику важнейших косточковых культур [7;8;9], в настоящее время полиморфизм SSR-локусов сливы домашней слабо изучен на мировом генофонде.

Сохранение генетического разнообразия коллекций сельскохозяйственных культур имеет стратегическое значение для поддержания биоразнообразия, осуществления селекционного процесса и получения форм с хозяйственно-ценными признаками. Стратегия сохранения растений направлена на их долгосрочное сохранение, управление и восстановление разнообразия растений, растительных сообществ и связанных с ними сред обитания и экосистем как *in situ* (в естественных местообитаниях), так и *ex situ*.

Ускорение селекционного процесса благодаря использованию биотехнологических методов позволит на новом качественном уровне и в сжатые сроки получать ценные генотипы садовых растений, включая применение метода эмбриокультуры (*зародышей in vitro*). Эмбриокультура дает возможность вырастить гибридные растения из неполноценных зародышей. Эмбриокультура дает возможность вырастить гибридные растения из неполноценных зародышей. Однако выход гибридных растений мал и гибриды часто бывают стерильны.

В частности, ранее, во ВСТИСП (ФНЦ Садоводства) среди большого количества различных скрещиваний между алычой гибридной и сливой среди зародышей в семье от скрещивания Кубанская комета x Нарач было отобрано два гибридных сеянца, характеризующиеся повышенной устойчивостью к зимним повреждениям и хорошим качеством плодов. В настоящее время на эти сорта, названные Величавая и Тулица, получены Патенты на селекционные достижения РФ. Их гибридная природа была подтверждена молекулярно-генетическим анализом [2].

Для современной селекции плодовых культур актуально внедрение практики использования молекулярных маркеров как на этапе оценки генресурсов, так и последующего селекционного отбора гибридных форм. К одним из наиболее перспективных локус-специфичных ДНК-маркерам относят микросателлитные маркеры (SSR) [10].

Актуальность работы заключается в том, что для изучения полиморфизма генов гибридов сливы от отдалённых скрещиваний, полученных методом эмбриокультуры необходимо провести молекулярно-генетические исследования гибридов сливы с целью получения генетического профиля растений, идентификацию генов хозяйственно-ценных признаков, которые эти гибриды унаследовали от родителей.

Цель исследований – исследовать полиморфизм генов и особенности фенотипов гибридов сливы от отдалённых скрещиваний полученных методом эмбриокультуры.

Объект и методы исследований

Исследования проводились в лаборатории репродуктивной биотехнологии ФГБНУ ФНЦ Садоводства в 2022 г. В качестве объектов исследований использовали листья сливы (*Prunus L.*) от 4 родительских форм (Кубанская комета, Смолинка, Стенлей, Симоновская), экспланты и микрорастения гибридов сливы (*Prunus L.*) коллекции ФГБНУ ФНЦ Садоводства, полученных от отдаленных скрещиваний методом эмбриокультуры:

1. 21-4 (♀Стенлей×♂Галатея): 1) 21-4-2 (3 обр.), 2) 21-4-9 (2 обр.), 3) 21-4-1 (4 обр.);
2. 21-10 (♀Кубанская комета×♂Клейман): 1) 21-10-1 (1 обр.), 2) 21-10-2 (2 обр.);
3. 21-13 (♀Кубанская комета×♂Клайман): 1) 21-13-11 (1 обр.), 2) 21-13-10 (1 обр.);
4. 21-3 (♀Стенлей×♂Смолинка): 1) 21-3-2 (1 обр.); 2) 21-3-12 (1 обр.);
5. КК (Кубанская комета св. оп.): КК-24 (1 обр.);
6. 21-2 (♀Стенлей×♂Н17): 1) 21-2-4 (1 обр.), 2) 21-2-21 (1 обр.);

В исследованиях использовали методы выделения ДНК: модифицированный метод по Дрейперу (слива русская сорт Кубанская комета и гибриды сливы (*Prunus L.*) коллекции ФГБНУ ФНЦ Садоводства, полученные от отдалённых скрещиваний методом эмбриокультуры) и метод на основе 1,5% ЦТАБ буфера (слива домашняя сорт Смолинка и сорт Стенлей, слива русская сорт Нектаринка). Оценка полиморфизмов осуществлялась с помощью 9 пар SSR-маркеров с использованием метода ПЦР (Рис.1). Разделение продуктов SSR-PCR проводилось методом горизонтального гель-электрофореза в 2% агарозном геле с последующей визуализацией в УФ излучении (Рис 2).

Результаты и обсуждение

Впервые проводился молекулярно-генетический анализ методом SSR-PCR 19 образцов гибридов сливы коллекции ФГБНУ ФНЦ Садоводства,

полученных от отдалённых скрещиваний методом эмбриокультуры, а также 4 образцов родительских форм. На данном этапе использовались 9 пар праймеров, проведен подбор наиболее эффективных праймеров для оценки полиморфизма изучаемых гибридов. При использовании пар праймеров ВРРСТ012, UDR96-008, ВРРСТ010, было получено наибольшее количество полиморфных фрагментов (Рис. 3), с остальными малоэффективными праймерами полиморфизм выявлен в незначительной степени или не выявлен вовсе (Рис. 4).



Рис.1 Подготовка продуктов амплификации

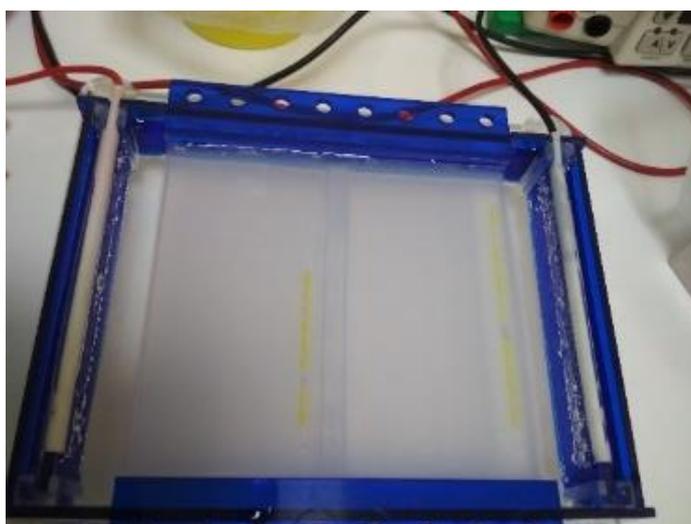


Рис.2 Разделение продуктов SSR- PCR

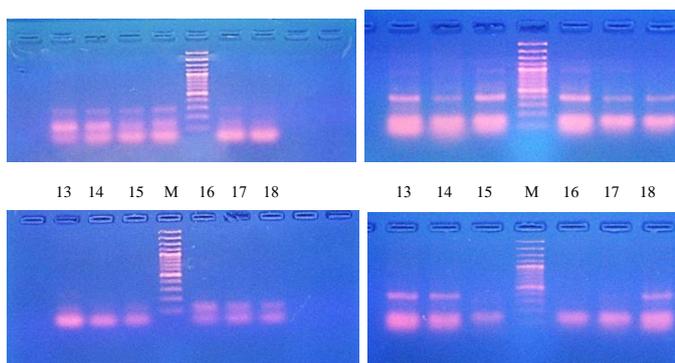


Рис. 3 Эффективные для изучения полиморфизма праймеры VPPCT010 и VPPCT012

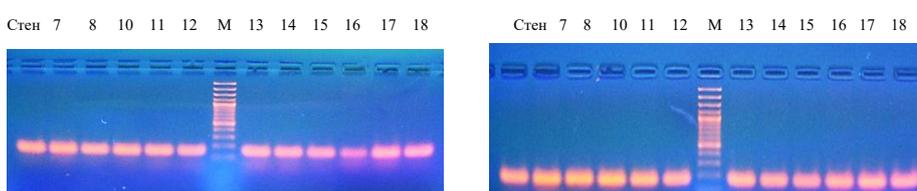


Рис. 4 Малоэффективные праймеры для изучения полиморфизма VPPCT028, VPPCT002

Выводы

Полученные результаты позволят изучить полиморфизм на основе девяти локусов SSR и определить генетическую дистанцию между родительскими формами и гибридами. В дальнейшей работе эти данные будут использованы для оценки степени родства гибрида с каждой из родительских форм.

Список использованных источников

1. Супрун И. И., Степанов И. В., Токмаков С. В., Еремин Г. В. Оценка генетического полиморфизма сливы домашней на основе анализа микросателлитных локусов © 2019 г. Генетика, 2019, том 55, № 2, с. 165–173
2. Бурменко Ю.В., Симонов В.С., Генетическая коллекция сливы ВСТИСП как основа для селекции культуры в Подмосковье// Селекция и сорторазведение садовых культур Т.6, № 2, 2019
3. Malusa, E., A new method to study genetic variation of vegetals for breeding purposes. Note I: Study on Prunus. / E. Malusa, A. Marchesini //

Fitoterapia. – 1993. – № 64. – P. 427-432.

4. Badenes, M.L. Phylogenetic relationships of cultivated *Prunus* species from an analysis of chloroplast DNA variation / M.L. Badenes, D.E. Parfitt // *Theor. Appl. Genet.* – 1995. – № 90. – P. 1035-1041.

5. Genetic diversity of *Prunus* rootstocks analysed by RAPD markers / A.M. Casas, E. Igartua, G. Balaguer, M.A. Moreno // *Euphytica.* – 1999. – № 110. – P. 139-149.

6. Genetic diversity of plums characterized by random amplified polymorphic DNA analysis. / T. Shimada, H. Hayama, T. Haji, M. Yamaguchi et al // *Euphytica.* – 1999. – № 109. – P. 143-147.

7. Downey, S.L. Polymorphic DNA Markers in Black Cherry *Prunus serotina* are identified using sequences from Sweet Cherry, Peach and Sour Cherry / S.L. Downey, A.F. Iezzoni // *J. of Am. Soc. Of Hort. Science.* – 2000. – № 125. – P. 76-80.

8. Characterisation of microsatellite markers in peach *Prunus persica* L Batsch. / B. Sosinski, M. Gannavarapu, L.D. Hager, L.E. Beck et al // *Theoretical and Applied Genetics.* – 2000. – № 101. – P. 421-428.

9. 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.J. Aranzana, et al. // *Theor. Appl. Genet.* – 2002. – № 105. – P.1 27-138.

10. Степанов И.В. «Применение SSR и REMAP маркеров в генотипировании сортов сливы домашней.» Инновационные биотехнологии в развитии АПК Материалы научно-образовательной конференции, «Молодой учёный». № 9.2 (89.2), Май, 2015 г. С. 124-125

M.V. Ryzhova

Federal Scientific Breeding and Technological Center for Horticulture and
Nursery, Moscow, Russia

**MOLECULAR GENETIC INVESTIGATIONS OF PLUM HYBRIDS OF
THE COLLECTION OF THE FSBSI FNTS OF HARDIVORS, OBTAINED
FROM REMOTE CROSSES BY THE METHOD OF EMBRYOCULTURE**