

УДК 575.22:575:86:577.29

ОЦЕНКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПОПУЛЯЦИЙ *MALUS SIEVERSII* ДЖУНГАРСКОГО АЛАТАУ И ТАРБАГАТАЯ

Омашева М.Е.¹, Чекалин С.В.², Рябушкина Н.А.¹, Галиакпаров Н.Н.¹

¹Институт биологии и биотехнологии растений
ул. Тимирязева, 45, Алматы, 050040, Казахстан

²Институт ботаники и фитоинтродукции
ул. Тимирязева, 36д, Алматы, 050040, Казахстан

natrya7@yahoo.com

АБСТРАКТ

Территория горных областей Казахстана является одним из центров происхождения дикой яблони. Набор из семи полиморфных микросателлитных маркеров был использован для изучения биоразнообразия нескольких популяций дикой яблони хребтов Тянь-Шаня в Казахстане: трех популяций Джунгарского Алатау и одной популяции Тарбагатай, всего 120 деревьев. Был применен подход с использованием SSRs и неспецифических последовательностей в качестве адаптеров: D8S1132, DYS437, D12S1090 – для VIC, 6-FAM, NED флуоресцентных меток. В популяциях исследованного региона по семи локусам всего было выявлено 74 аллели. Среднее число полиморфных аллелей на локус составило 10,6; эффективное число аллелей 3,8. Уровень полиморфизма изученных локусов (PIC) варьировал от 0,593 до 0,779. Уровень ожидаемой (H_e) и наблюдаемой гетерозиготности (H_o) для всех семи локусов был высок, в среднем 0,724 и 0,710 соответственно. Индекс разнообразия в популяциях колебался в пределах от 1,33±0,091 (Урочище Крутое) до 1,65±0,092 (Правобережье реки Лепса), причем для наиболее близко расположенных популяций. Согласно статистике Райта, на межпопуляционную изменчивость приходилось только 3,4%, а остальная изменчивость была выявлена внутри каждой из популяций *M. sieversii*. Создан банк геномной ДНК дикой яблони популяций Джунгарского Алатау и Тарбагатай.

Ключевые слова: *Malus sieversii*, популяции, генетическое разнообразие, SSR маркеры, ДНК полиморфизм, ПЦР.

EVALUATION OF THE MOLECULAR GENETIC DIVERSITY OF *MALUS SIEVERSII* POPULATIONS IN THE DZUNGARIAN ALATAU AND TARBAGATAI MOUNTAINS

Omasheva M.Y.¹, Chekalin S.V.², Ryabushkina N.A.¹, Galiakparov N.N.¹

¹Institute of Plant Biology and Biotechnology
45 Timiryazev str., Almaty, 050040, Kazakhstan

²Institute of Botany and Phytointroduction
45 Timiryazev str., Almaty, 050040, Kazakhstan

ABSTRACT

The mountain regions of Kazakhstan are one of the centers of the origin of wild apples. A set of seven polymorphic microsatellite markers was used to study the biodiversity of apple populations in the Tien Shan region of Kazakhstan, including three populations of Dzhungarian and one population of Tarbagatai. Leaf samples were collected from 120 trees. A set of seven markers and nonspecific sequences, including D8S1132, DYS437, D12S1090, and VIC, 6-FAM, and NED fluorescent labels that were used as adapters were used. A total of 74 alleles were detected with the seven markers. The number of polymorphic alleles ranged from 5 to 14 for GD100 and GD162 loci, respectively, and the average number of alleles per locus was 10.6. The mean value of the effective number of alleles (N_e) per locus was 3.8. The polymorphic information content (PIC) ranged from 0.593 for locus GD100 to 0.779 for locus GD142, and the average was 0.691. The level of expected (H_e) and observed heterozygosity (H_o) for all of the loci was high and averaged 0.724 and 0.710, respectively. The average level of the Shannon index (I) as a sum of the loci for all of the analyzed samples

was 1.62 ± 0.085 . The indexes of diversity in the populations ranged from 1.33 ± 0.091 (Krutoe tract) to 1.65 ± 0.092 (the right bank of the Lepsy River) and for the most closely spaced populations. According to Wright statistics, the interpopulation variability accounted for only 3.4% with the remaining variability allocated within each of the *M. sieversii* populations. A genomic DNA bank of the wild apple populations of Dzhungarian and Tarbagatai has been established.

Keywords: *Malus sieversii*, population, genetic diversity, SSR markers, DNA polymorphism, PCR

ВВЕДЕНИЕ

Malus sieversii – дикоплодовый вид предгорных яблонь Средней Азии и Казахстана с шаровидными сладкими, кисло-сладкими или вяжущими плодами, относящийся к роду *Malus* семейства *Rosaceae*. В Казахстане представлено более 10% мировой флоры семейства, каждый десятый из них эндемик [1]. Согласно Н.И. Вавилову [2], территория Казахстана является одним из центров происхождения диких яблонь. При этом в отношении их видового разнообразия мнения ботаников неоднозначны. Во «Флоре Казахстана» были описаны 6 видов *Malus*: *M. kirghisorum* Al. at An. Theod., *M. Sieversii* (Ldb.) M. Roem., *M. niedzwetzkyana* Dieck., *M. domestica* Borkh., *M. prunifolia* (Willd.) Borkh. и *M. baccata* (L.) Borkh. [3]. А.Д. Джангалиевым [4] признаны три вида: *M. sieversii*, *M. kirghisorum*, *M. niedzwetzkyana*. С.А. Абдулиной [5] в список рода включены только два диких вида: *M. sieversii* и *M. niedzwetzkyana*. Эти виды занесены в Красную книгу Казахстана [6]. Использование микросателлитных маркеров для сравнительной оценки популяций, собранных в Казахстане и Киргизии, позволило сделать вывод о том, что популяция Киргизстана не является уникальным и независимым видом [7]. Последующий анализ с использованием микросателлитов [8] привел исследователей к заключению, что генетические/фенотипические различия внутри таксонов *Malus sieversii*, *M. sieversii* var. *kirghisorum*, *M. sieversii* var. *turkmenorum*, *M. pumila* и *M. pumila* var. *niedzwetzkyana* значительно больше, чем между таксонами. Другими словами, *M. sieversii* – вид с широкими пределами генетических и фенотипических вариаций признаков, включающий другие перечисленные центрально-азиатские таксоны. Основываясь на ДНК-исследованиях, вид яблони Сиверса в настоящее время рассматривается как родоначальник многих современных сортов культурных яблонь [9]. Представители дикой яблони растут на склонах гор, закрепляя их, по ущельям горных рек, в лиственных, реже хвойных лесах. Часто образуют небольшие в несколько гектаров, почти сомкнутые рощи, нередко встречаются единичными экземплярами или отдельными группами [3, 10]. Отличаются высоким разнообразием форм, особенно по размерам, окраске и вкусу плодов. При этом статус *M. sieversii* в Казахстане – вид с сокращающейся численностью. Площади, занятые дикими яблонями, за последние пятьдесят лет уменьшились в результате освоения земель под сельскохозяйственные культуры и частное строительство.

Биоразнообразие растений определяется двумя характеристиками: внутривидовым и межвидовым разнообразием. Поддержание экологической пластичности диких популяций обуславливается внутри- и межпопуляционным генетическим разнообразием. Наличие нескольких аллелей по определенному локусу позволяет представителям популяций адаптироваться к изменяющимся биотическим и абиотическим факторам среды. На основе показателя гетерозиготности сделано заключение, что культурная яблоня *M. domestica* сохранила более 95% генетического разнообразия *M. sieversii*, при незначительном недостоверном уменьшении значений среднего количества аллелей на локус [11]. Но, хотя яблоня в процессе одомашнивания не утратила генетического разнообразия, разнообразие коммерчески используемых яблонь оказалось заметно ниже. По данным, приведенным авторами, из более чем 7500 существующих сортов яблони мировое производство отрасли базируется только на 10-20 сортах. Массовое поражение болезнями и вредителями, неустойчивость к внешним стрессовым

факторам, обуславливаемым изменениями климата, во многом определяется утратой в коммерчески используемом сортовом материале генетических основ устойчивости к этим факторам при целенаправленном отборе в селекционном процессе главным образом на продуктивность и товарные качества продукции. Очевидно, что популяции диких яблонь на территории Казахстана являются незаменимыми донорами генов устойчивости к стрессовым факторам, которые были утрачены в культурных сортах [11, 12]. Оценка молекулярно-генетического разнообразия с использованием современных методологических подходов должна стать обоснованием сохранения разнообразия гермоплазмы диких яблонь и развития на этой основе селекционных программ по улучшению генофонда культурной яблони Казахстана.

В настоящей работе было охарактеризовано разнообразие образцов дикой яблони трех популяций Джунгарского Алатау и одной популяции Тарбагатай (флористических подпровинций горной системы восточного Казахстана).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для работы послужили свежесобранные и хранящиеся при -80°C до выделения ДНК листья четырех популяций дикой яблони Восточного Казахстана. На рисунке 1 представлена карта расположения исследованных популяций.

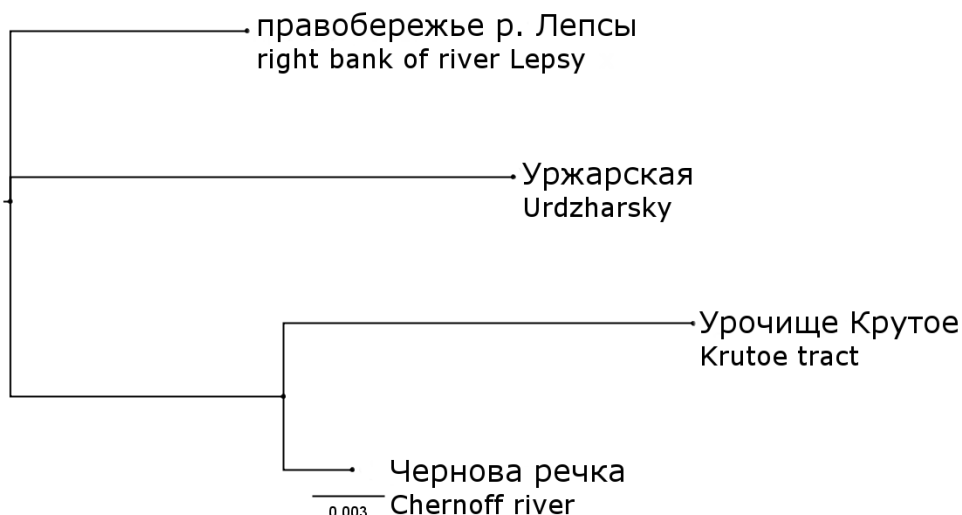


Рис. 1. Дендрограмма филогенетической связи четырех исследованных популяций (метод NJ)

Fig. 1. The dendrogram of phylogenetic relationships of four populations (NJ method)

Образцы трех популяций собраны на территории горной системы Джунгарского Алатау, расположенных на левобережье Черновой речки – Чернова речка, на правобережье р. Лепсы – Урочище Крутое и напротив слияния с р. Чернова, область скотопосева. Листья представителей популяции Уржарская собраны в районе горного хребта Тарбагатай. На основе GPS составлен план расположения деревьев, с которых были взяты листья. Листья собирались с деревьев различного возраста: от менее 10 до 120 лет (таблица 1).

Таблица 1. Возрастной состав растений яблони Сиверса четырех исследованных популяций

Table 1. Age of apple trees genotyped for four populations

Популяция Population	Возрастные группы (лет) Age group (years)									Общ. кол. дерев. The total numbe r of trees
	до 10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-80	81-100	101-120	
	Количество исследованных деревьев Number of trees									
Уржарская (Тарбагатай) Urdzharsky (Tarbagatai)	≥5	≥5	≥5	-	≥5	-	3	2	-	40
Чернова речка Chernoff river	2	4	-	-	1	2	≥5	≥5	3	30
Урочище Кругое Krutoe tract	1	≥5	≥5	≥5	≥5	1	2	1	-	28
Правобережье р. Лепсы Right bank of the river Lepsy	-	≥5	≥5	≥5	1	-	1	-	-	22

Выделение геномной ДНК. Геномную ДНК выделяли согласно процедуре, испытанной ранее [13]. Анализ качества и количества выделенной ДНК проверяли в 1% агарозном геле, а также с использованием спектрофотометрии. Использовали для анализов ДНК с соотношением от 1,7 до 1,9 ($A_{260/280}$).

Подбор микросателлитных маркеров и условия ПЦР. Для идентификации аллелей и генетического разнообразия были использованы 7 микросателлитных маркеров (таблица 2), ранее уже использованные в исследованиях по генотипированию яблони [14] с добавлением «хвостов» к 5'-концу прямого праймера [15].

ПЦР проводили в два этапа. Первичный ПЦР в объеме 20 мкл содержал в конечной концентрации 1X Таq Буфер (750 mM Tris HCl, pH 8,8, 200 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0,1% Tween 20), 2,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTP), 0,2 mM прямого (а) и обратного (b) олигонуклеотидов одного из маркеров, 13,7 мкл деонизированной стерильной воды и 1 единицу Таq полимеразы. Концентрация геномной ДНК на одну

реакцию составляла от 40-60 нг на 20 мкл реакции. Температуру отжига выбирали в зависимости от последовательности маркера. Амплификацию проводили при следующем температурном режиме: один цикл 2 мин. при 94°C; 7 циклов, состоящих из следующих ступеней – 1 мин. при 94°C; 2 мин. при 56°C и 2 мин. при 72°C; 20 циклов – 1 мин. при 94°C, 2 мин. при 53-51°C и 2 мин. при 72°C; в заключение 1 цикл 10 мин. при 72°C. По завершении программы амплификации, 10 мкл каждой реакции проверяли в электрофорезе в 1% агарозном геле. При наличии ожидаемых продуктов остаток ПЦР разбавляли в 10 раз и 1 мкл использовали для вторичного ПЦР. Состав реакции вторичной ПЦР был идентичен первичной за исключением прямых олигонуклеотидов, вместо которых были использованы флуоресцентно-меченные «хвосты». В качестве прямых праймеров для GD12 и GD162 локусов использовались D8S1132, для GD96, GD147 – D12S1090, и для GD142, GD100, GD103 – DYS437. Программа амплификации для вторичной ПЦР была идентична первичной, при этом продолжительность последней стадии элонгации при 72°C была увеличена с 10 до 30 минут.

По окончании ПЦР-продукты семи маркеров объединялись с добавлением формамида и стандарта размеров, меченного красителем LIZ (Size standard 500 LIZ Applied Biosystems), общий объем смеси составлял 10 мкл, в котором продукты ПЦР (0,5 мкл) были предварительно разбавлены: VIC в 540 раз, NED в 120 раз и 6-FAM – в 360 раз.

Фрагментный анализ проводили с помощью капиллярного электрофореза на анализаторе ABI Prism 310 (Applied Biosystems). Полученные результаты обрабатывали с помощью программы Gene Mapper 4.0. Для точного анализа предварительно был проведен фрагментный анализ с использованием матричного и калибровочного наборов DS-33 Matrix Standard Kit G5 (Applied Biosystems).

Таблица 2. Последовательности олигонуклеотидов и характеристика микросателлитных маркеров, использованных в исследовании [14]

Table 2. Nucleotide sequences of the oligonucleotides used in the study

№	Праймер Primer	Последовательность нуклеотидов The nucleotide sequence	Мотив Motif	Диапазон размеров продукта Product size range
1	GD12f	<u>ggctaggaaggttagtggcctgaggtgttctccattgga</u>	(CT) ₃₂	141-191 п.н.
2	GD12r	ctaacgaagccgccatttcttt		
3	GD96f	<u>accaacctaggaaacacagcggcggaaagcaatcacct</u>	(TC) ₂₂	152-197 п.н.
4	GD96r	gccagccctctatggttcaga		
5	GD142f	<u>gactatggcgtgagtgcacacccaagccctaa</u>	(TC) ₁₉	123-158 п.н.
6	GD142r	ggaacctacgacagcaaaagtaca		
7	GD147f	<u>accaacctaggaaacacagtcccgccatttctctgc</u>	(AG) ₇	124-156 п.н.
8	GD147r	gtttaaccgctgctgctgaac		
9	GD162f	<u>ggctaggaaggttagtggcaggcaagtgacaagaagatg</u>	(GA) ₂₃	215-254 п.н.
10	GD162r	aaaatgtaacaaccgtccaagtg		
11	GD100f	<u>gactatggcgtgagtgcacacagcaaggtgtggtaagaaggt</u>	(GA) ₁₂	223-242 п.н.
12	GD100r	tgccgacaaggaaaaaaaaaaagtg		
13	GD103f	<u>gactatggcgtgagtgcacacagcaaggtgtggtaagaaggt</u>	(GA) ₂₀	90-133 п.н.
14	GD103r	ggataaccgtcccccttttc		
15	D8S1132	VIC- ggctaggaaggttagtggc		
16	DYS437	6-FAM- gactatggcgtgagtgcac		
17	D12S1090	NED- accaacctaggaaacacag		

Примечание: D8S1132, DYS437, D12S1090 – неспецифические последовательности, использованные в качестве «хвостов»; VIC, 6-FAM, NED – флуоресцентные метки.

Note: D8S1132, DYS437, D12S1090 – non-specific sequences were used as «tails»; VIC, 6-FAM, NED – fluorescent labels.

Статистическая обработка данных. Размеры аллелей, определенные программой GeneMapper 4.0, были конвертированы и занесены в MS Excel 2007. Фактор конверсии для каждого из маркеров был вычислен с помощью программы TANDEM v1.09 [16]. Был вычислен ряд параметров генетического разнообразия исследованных популяций. С помощью программного обеспечения GenAlex 6.5 [17] были определены частота и число аллелей, среднее количество аллелей на locus (N_a), число эффективных аллелей (N_e), количество и частота редких аллелей для каждой популяции, параметры разнообразия: индекс Шеннона, F-статистика и тест Мантеля. Ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность, индекс информативности маркера (PIC) были вычислены с помощью макроса Excel Microsatellite Tool Kit. Дендрограмма была построена с помощью программы Tree Figure Drawing Tool v.1.4 методом «neighbor joining» на основании генетического расстояния по Нею [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из подходов, позволяющим избежать ошибок при идентификации аллелей, является автоматизированное секвенирование с использованием флуоресцентно меченых фрагментов [15, 19]. В настоящем исследовании для получения образцов аллелей был использован набор праймеров, приведенный в таблице 2. Чтобы убедиться в правильности определения размеров аллелей при проведении капиллярного электрофореза, использовался контрольный сорт Голден Делишес с известными размерами аллелей [20].

Расчет доли полиморфных локусов для семи пар праймеров, использованных в генетическом анализе популяций яблони Сиверса, подтвердил их 100% полиморфизм. Для популяций исследованного региона всего было выявлено 74 аллели. Наиболее часто встречающиеся аллели всех семи локусов были представлены в каждой из анализируемых четырех популяций. Количество аллелей по локусам варьировало от 5 для GD100 до 14 для GD162, при этом среднее число аллелей на locus составило $10,57 \pm 1,043$. Мерой генетического разнообразия популяции является эффективное число аллелей N_e , т.е. число аллелей, которое можно предположить в каждой популяции. Эта величина обратна гомозиготности. Эффективное число аллелей (N_e) на locus в среднем составило $3,77 \pm 0,330$. Практически во всех локусах и популяциях эффективное число аллелей было ниже, чем фактическое число аллелей на locus, что совпадает с результатами популяционных исследований яблони [14]. В каждой из популяций были выявлены редкие аллели (P_a , *private alleles*), так в популяции Уржарская $P_a = 6$, урочище Крутое $P_a = 5$, Чернова речка $P_a = 4$, правобережье р. Лепсы $P_a = 2$.

Уровень полиморфизма изученных локусов PIC (Polymorphic Information Content), варьировал от 0,779 для локуса GD142 до наименьшего 0,593 для локуса GD100, в среднем значение составило 0,691. Уровень ожидаемой (H_e) и наблюдаемой гетерозиготности (H_o) в среднем для всех семи локусов был высок, составляя 0,724 и 0,710 соответственно. Это свидетельствует о высоком уровне полиморфизма анализируемой коллекции генотипов. Суммарно для всех локусов разница между показателями H_e и H_o была невелика – 0,724 и 0,710 соответственно. Значения ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности были сравнимы с полученными (0,749 и 0,693 соответственно) при анализе 949 индивидуумов (representing seedling trees) 8 популяций яблонь Казахстана [21]. Большая разница между двумя показателями (H_e и H_o) в локусе GD100 может

свидетельствовать о выявлении нулевых аллелей. Одной из причин проявления нулевых аллелей могут быть как «несовершенство» соответствующих праймеров, так и мутации по месту связывания, что препятствует присоединению праймера. Но доказать это в настоящем эксперименте затруднительно, так как в первую очередь необходим анализ предыдущих поколений и расщеплений по данному признаку [20]. Хотя следует упомянуть, что такой же низкий показатель H_o для локуса GD100 был выявлен в работе [21].

Максимальное значение индекса (меры) разнообразия Шеннона (I) для суммы всех анализированных образцов дикой яблони было отмечено для локуса GD142, составляющего 1,90. Наименьшее значение I было для локуса GD100 = 1,23, но при этом средний уровень полиморфизма по всем локусам составил $1,62 \pm 0,085$. Показатель вероятности идентичности (PI, Probability of Identity) представляет собой оценку средней вероятности обнаружения у двух неродственных индивидуумов, выбранных из одной и той же популяции, одинакового мультилокусного генотипа. Значение PI обратно пропорционально значению PIC, и чем меньше PI, тем информативнее является маркер. Наименьшее значение PI было отмечено для локуса GD142 = 0,062, что подтверждает, что данный locus является наиболее полиморфным по отношению к другим. Наибольшее значение было отмечено для GD100, где $PI = 0,178$.

Сравнение генетического разнообразия между популяциями выявило большее количество аллелей на locus в популяции Чернова речка ($8,14 \pm 0,670$) и большее количество эффективных аллелей ($4,32 \pm 0,313$) на Правобережье р. Лепсы Джунгарского Алатау (таблица 3). Индекс разнообразия в популяциях колебался в пределах от $1,33 \pm 0,091$ до $1,65 \pm 0,092$. Поскольку в данных популяциях показатели гетерозиготности (H_o ; H_e) были близки по значению, это может свидетельствовать о генетическом равновесии внутри каждой из популяций.

Таблица 3. Значение показателей генетической изменчивости популяций Восточного Казахстана

Table 3. Value of indicators of genetic variability of populations of East Kazakhstan

Популяция Population		N_s	N_e	I	H_o	H_e	F_{is}
Тарбагатай (Уржарская) Urdzharsky (Tarbagatai)	среднее mean	7,429	3,821	1,533	0,723	0,720	-0,005
	SE	0,948	0,404	0,118	0,057	0,030	0,073
Чернова речка Chernoff river	среднее mean	8,143	3,272	1,499	0,655	0,687	0,054
	SE	0,670	0,205	0,060	0,078	0,021	0,099
Урочище Крутое Krutoe tract	среднее mean	6,714	2,984	1,330	0,718	0,641	-0,097
	SE	0,606	0,326	0,091	0,090	0,037	0,099
Правобережье р. Лепсы Right bank of the river Lepsy	среднее mean	7,429	4,322	1,650	0,751	0,761	0,025
	SE	0,869	0,313	0,092	0,101	0,018	0,126

Примечание: N_s – среднее количество аллелей на locus; N_e – эффективное количество аллелей на locus; H_o – наблюдаемая гетерозиготность; H_e – ожидаемая гетерозиготность; PIC – индекс информативности маркера; PI – вероятность идентичности; I – информационный индекс Шеннона; SE – стандартная ошибка среднего; F – индекс фиксации Райта.

Note: N_s – average number of alleles per locus; N_e – effective numbers of alleles per locus; H_o – observed heterozygosity; H_e – expected heterozygosity; PIC – polymorphic information index; PI – probability of identity; I – Information Shannon index; SE – mean standard error; F – Wright's fixation index.

Для оценки инбридинга в популяциях был рассчитан индекс фиксации Райта (см. F, таблица 3), отражающий степень избытка или дефицита гетерозигот в популяциях. Согласно полученным значениям, в популяциях Чернова речка и Правобережье р. Лепсы может иметь место небольшой дефицит гетерозигот (положительные значения), особенно в популяции Чернова речка (+0,054). Это означает, что гомозиготизация особей относительно данной популяции составляет 5,4%. В популяции урочище Крутое индекс Райта имел отрицательное значение, что может указывать на избыток гетерозигот. Значения статистики Райта очень близкие к 0 для популяции Уржарская (Тарбагатай) могут подтверждать генетическое равновесие в популяции. Об этом свидетельствует и практическое совпадение показателей H_o и H_e . Значение гетерозиготности по локусам на различных уровнях структуры популяций (субпопуляция, метапопуляция), рассчитанное на основе (F-statistics). представлено в таблице 4. Наибольший дефицит гетерозиготности был зафиксирован в локусе GD100 (+0,485), в то время как локусы GD103, GD12, GD142, GD147 показали избыток гетерозигот. Показатель F_{it} , отражающий гомозиготизацию особей относительно вида в целом, в среднем составил (0,029).

Таблица 4. Значение показателей F-статистики Райта для полиморфных локусов в исследованных популяциях дикой яблони

Table 4. Evaluation of Wright's F-statistic for polymorphic loci in the studied populations of wild apple

Локус Locus	F_{is}	F_{it}	F_{st}	N_m
GD12	-0,148	-0,103	0,039	6,235
GD96	0,046	0,089	0,045	5,336
GD142	-0,144	-0,097	0,041	5,905
GD147	-0,047	-0,022	0,024	10,337
GD162	0,058	0,085	0,029	8,447
GD100	0,485	0,506	0,040	5,927
GD103	-0,276	-0,251	0,020	12,379
Среднее	-0,004	0,029	0,034	7,795
SE	0,093	0,091	0,004	1,017

Примечание: F_{is} – коэффициент инбридинга индивидуумов относительно субпопуляции; F_{it} – коэффициент инбридинга индивидуумов относительно метапопуляции; F_{st} – эффект субпопуляции относительно к метапопуляции.

Note: F_{is} – inbreeding coefficient of individuals regarding to subpopulations; F_{it} – inbreeding coefficient of individuals regarding to metapopulation; F_{st} – the effect of subpopulation regarding to metapopulation.

Показатель подразделенности F_{st} для всех множественных аллелей был подсчитан как средневзвешенный по всем исследованным популяциям и варьировал в полиморфных локусах от 0,02 (GD103) до 0,45 (GD96), при этом среднее значение составило 0,034, что

говорит о том, что на межпопуляционную изменчивость может приходиться только 3,4%, а остальная изменчивость находится внутри каждой из популяций *M. sieversii*. Поток генов был вычислен для всех исследованных популяций яблони (таблица 4), при этом его значение зависело от показателя F_{st} . Определенная средняя величина N_m для всех популяций составила 7,795. Это говорит о том, что в популяции с эффективным размером N_e примерно 8 деревьев имеют привнесенные гены, или по-другому, что изученные популяции *M. sieversii* обменивались генетическим материалом в среднем с интенсивностью 8 мигрантов на поколение.

Генетическое расстояние по Нью (D) [18] между сравниваемыми популяциями дикой яблони Восточного Казахстана было невысоким, в пределах 0,058 до 0,168. Наибольшее значение генетического расстояния ($D = 0,168$) было выявлено между популяциями урочище Крутое и Уржарская (Тарбагатай). Наименьшее – было зафиксировано между популяциями Чернова речка и урочище Крутое $D = 0,058$ (рисунок 1). В целом, низкие значения генетических расстояний коррелируют с близким географическим положением исследуемых популяций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование микросателлитов доказало свою эффективность для оценки генетических ресурсов яблони, организации и управления коллекциями в селекционном процессе и др. [21]. Семь микросателлитных маркеров, использованных для молекулярно-генетического анализа четырех популяций Восточного Казахстана, выявили высокие уровни гетерозиготности; изученные популяции находятся в состоянии генетического равновесия ввиду того, что показатели ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности близки по значениям. Показатели генетического разнообразия также весьма высоки. Так, средний показатель генетического разнообразия всех анализированных образцов дикой яблони по семи локусам $PI_C=0,691$; индекс Шеннона, отражающий вклад редких аллелей, $I=1,624$. Хотя в настоящей работе среднее значение количества аллелей на анализированные локусы ниже, чем в исследовании [21] (10,6 и 14,7 соответственно), следует учитывать существенно большее в последнем случае использованное количество образцов, причем полученных из семян. Исследование уровня полиморфизма популяций Джунгарского Алатау и Тарбагатай показало, что эти популяции, расположенные в географическом плане близко друг к другу, также близки и генетически. Согласно коэффициенту F_{st} , подразделенность исследованных популяций составляет всего 3,4%.

Оценка генетического разнообразия диких популяций яблони Сиверса с помощью современных молекулярно-генетических подходов, безусловно, послужит основой правильного и рационального сохранения генофонда. Одним из важнейших моментов при этом является создание в будущем базовой коллекции (core collection) наиболее ценных генотипов, заключающих в себе максимально высокий уровень генетического разнообразия для дальнейшего использования в селекционных программах.

Финансирование

Работа была выполнена в рамках Гранта 0043/ГФ по подприоритету: «Фундаментальные исследования в области естественных наук» Бюджетной программы

055, финансируемой Государственным учреждением «Комитет науки Министерства образования и науки Республики Казахстан».

ЛИТЕРАТУРА

1. Gemedjieva N., Teixeira da Silva J.A., Ryabushkina N. Representation of endemics in floristic subprovinces of Kazakhstan // *Asian and Australasian J. Plant Science and Biotechnolog.* – 2010. – Vol. 4. – Special Issue10. – P. 56-63.
2. Вавилов Н.И. Роль Центральной Азии в происхождении культурных растений. Происхождение и география культурных растений. – Москва, 1987. – С. 132-134.
3. Флора Казахстана. – Алма-Ата, 1961. – Т. 4. – С. 402-405.
4. Джангалиев А.Д. Дикая яблоня Казахстана. – Алма-Ата, 1977. – С. 5-34.
5. Абдулина С.А. Список сосудистых растений Казахстана. – Алматы, 1999. – С. 21.
6. Красная книга Казахской ССР. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных и растений. Ч. 2. Растения. – Алма-Ата, 1981. – 260 с.
7. Volk G.M., Richards Ch.M., Henk A.D., Reilley A. Novel Diversity Identified in a Wild Apple Population from the Kyrgyz Republic // *Hortscience.* – 2009. – Vol. 44. – P. 516-518.
8. Volk G.M., Henk A.D., Richards C.M., Forsline P.L., Chao C.T. *Malus sieversii*: a diverse Central Asian apple species in the USDA-ARS National Plant Germplasm System // *HortScience.* – 2013. – Vol. 48. – P. 1440-1444.
9. Velasco R., Zharkikh A., Affourtit J. et al. The genome of the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.) // *Nature Genetics.* – 2010. – Vol. 42, №10. – P. 833-839.
10. Иващенко А.А. Растительный мир Казахстана. Научно-популярное издание. – Алматы: Алматыкітап, 2004. – С. 127.
11. Gross B., Henk A.D., Richards C.M., Fazio G., Volk G.M. Genetic diversity in *Malus × domestica* (Rosaceae) through time in response to domestication // *American Journal of Botany.* – 2014. – Vol. 101, №10. – P. 1770-1779.
12. Forsline P.L., Aldwinckle H.S. Evaluation of *Malus sieversii* seedling populations for disease resistance and horticultural traits // *Acta Hort.* – 2004. – №663. – P. 529-534.
13. Aubakirova K., Omasheva M., Ryabushkina N. et.al. Evaluation of five protocols for DNA extraction from leaves of *Malus sieversii*, *Vitis vinifera*, and *Armeniaca vulgaris* // *Genet. Mol. Res.* – 2014. – Vol. 13, №1. – P. 1278-1287.
14. Hokanson S.C. et al. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus domestica* Borkh. Core subset collection // *Theor. Appl. Genet.* – 1998. – №94. – P. 671-683.
15. Missiaggia A., Grattapaglia D. Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers // *Genetics and Molecular Research.* – 2006. – Vol. 5. – P. 72-78.
16. Matschiner M., Salzburger W. TANDEM: integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows // *Bioinformatics.* – 2009. – Vol. 25, №15. – P. 1982-1983.
17. Peakall R., Smouse P.E. GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research and update // *Bioinformatics.* – 2012. – Vol. 28, №19. – P. 2537-2539.
18. Nei M. Genetic distance between populations // *Am. Nat.* – 1972. – Vol. 106. – P. 283-292.
19. Baric S., Monschein S., Hofer M., Grill D., Dalla Via J. Comparability of genotyping data obtained by different procedures – an inter-laboratory survey // *Journal of Horticultural science & Biotechnology.* – 2008. – №83(2). – P. 183-190.

20. Genomic, Genetic, and Breeding Resources for Rosaceae Crop Improvement // <http://www.rosaceae.org>.

21. Richards Ch.M., Volk G.M., Reilley A.A., Henk A.D., Lockwood D.R., Reeves P.A., Forsline P.L. Genetic diversity and population structure in *Malus sieversii*, a wild progenitor species of domesticated apple // *Tree Genetics & Genomes*. – 2009. – Vol. 5. – P. 339-347.

REFERENCES

1. Gemedjieva N., Teixeira da Silva J.A., Ryabushkina N. Representation of endemics in floristic subprovinces of Kazakhstan. *Asian and Australasian J. Plant Science and Biotechnolog.*, 2010, vol. 4, special issue 10, pp. 56-63.

2. Vavilov N.I. Rol Centralnoy Azii v proiskhozhdenii kulturnykh rasteniy [The role of Central Asia in the origin of cultivated plants. Origin and geography of cultivated plants]. Moscow, 1987, pp. 132-134.

3. Flora Kazakhstana [Flora of Kazakhstan]. Almaty, 1961, vol. 4, pp. 402-405.

4. Dzhangaliev A.D. Dikaya yablonya Kazakhstana [Wild apple of Kazakhstan]. Almaty, 1977, pp. 5-34.

5. Abdulina S.A. Spisok sosudistyyh rasteniy Kazakhstana [List of vascular plants in Kazakhstan]. Almaty, 1999, pp. 21.

6. Krasnaya kniga Kazakhskoy SSR. Redkie i nakhodyaschiesya pod ugrozoy ischezashchie vidy zhivotnykh i rasteniy.chast 2.rasteniy [The Red Book of the Kazakh SSR. Rare and endangered species of animals and plants. Part2. Plants]. Alma-Ata, 1981, pp. 260.

7. Volk G.M., Richards Ch.M., Henk A.D., Reilley A. Novel Diversity Identified in a Wild Apple Population from the Kyrgyz Republic // *Hortscience*, 2009, vol. 44, pp. 516-518.

8. Volk G.M., Henk A.D., Richards C.M., Forsline P.L., Chao C.T. *Malus sieversii*: a diverse Central Asian apple species in the USDA-ARS National Plant Germplasm System // *HortScience*, 2013, vol. 48, pp. 1440-1444.

9. Velasco R., Zharkikh A., Affourtit J. et al. The genome of the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.). *Nature Genetics*, 2010, vol. 42, no. 10, pp. 833-839. doi: 20802477. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.654>.

10. Ivashchenko A.A. Rastitelnyy mir Kazakhstana [The flora of Kazakhstan]. Almaty: Almaty kitap, 2004, pp. 127.

11. Gross B., Henk A.D., Richards C.M., Fazio G., Volk G.M. Genetic diversity in *Malus domestica* (Rosaceae) through time in response to domestication. *American Journal of Botany*, 2014, vol. 101. no. 10, pp. 1770-1779.

12. Forsline P.L., Aldwinckle H.S. Evaluation of *Malus sieversii* seedling populations for disease resistance and horticultural traits. *Acta Hort.*, 2004, no. 663, pp. 529-534.

13. Aubakirova K., Omasheva M., Ryabushkina N. et.al. Evaluation of five protocols for DNA extraction from leaves of *Malus sieversii*, *Vitis vinifera*, and *Armeniaca vulgaris*. *Genet. Mol. Res.*, 2014, vol. 13, no. 1, pp. 1278-1287. doi: 24634185.

14. Hokanson S.C. et al. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus domestica* Borkh. Core subset collection. *Theor. Appl. Genet.*, 1998, no. 94, pp. 671-683. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s001220050943>.

15. Missiaggia A., Grattapaglia D. Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers // *Genetics and Molecular Research*, 2006, vol. 5, pp. 72-78. doi: 16755499.

16. Matschiner M., Salzburger W. TANDEM: integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows. *Bioinformatics*, 2009, vol. 25, no. 15, pp. 1982-1983. doi: 19420055.

17. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research and update. *Bioinformatics*, 2012, vol. 28, no. 19, pp. 2537-2539. doi: 22820204.

18. Nei M. Genetic distance between populations. *Am. Nat.*, 1972, vol. 106, pp. 283-292.

19. Baric S., Monschein S., Hofer M., Grill D., Dalla Via J. Comparability of genotyping data obtained by different procedures – an inter-laboratory survey. *Journal of Horticultural science & Biotechnology*, 2008, no. 83(2), pp. 183-190.

20. Genomic, Genetic, and Breeding Resources for Rosaceae Crop Improvement. Available at: <http://www.rosaceae.org> (accessed 10 January 2015).

21. Christopher M. Richards & Gayle M. Volk & Ann A. Reilley & Adam D. Henk & Dale R. Lockwood & Patrick A. Reeves & Philip L. Forsline. Genetic diversity and population structure in *Malus sieversii*, a wild progenitor species of domesticated apple. *Tree Genetics & Genomes*, 2009, pp. 5:339–347. doi: 10.3732/ajb.1400297.

ЖОҢҒАР АЛАТАУЫ ЖӘНЕ ТАРБАҒАТАЙ ТАУЛАРЫНДАҒЫ *MALUS SIEVERSII* ПОПУЛЯЦИЯЛАРЫНЫҢ ГЕНЕТИКАЛЫҚ ӘР ТҮРЛІЛІГІН БАҒАЛАУ

Омашева М.Е.¹, Чекалин С.В.², Рябушкина Н.А.¹, Галиакпаров Н.Н.¹

¹Биология және биотехнология институты
Тимирязев к-сі, 45, Алматы, 050040, Қазақстан

²Ботаника және фитointродукция институты
Тимирязева к-сі, 36д, Алматы, 050040, Қазақстан

natrya7@yahoo.com

ТҮЙІН

Қазақстанның таулы аймақтары жабайы алма ағаштарының шығу тегі орталықтарының бірі болып келеді. Жеті полиморфты микросателитті маркерлер жиынтығын қолдану арқылы Қазақстандағы Тянь-Шань тауының жотасындағы бірнеше жабайы алма ағаштары популяцияларының: үш Жоңғар Алатауы популяциялары және бір Тарбағатай популяциясының биоәртүрлілігі зерттелді. Жاپырақтар үлгілері 120 ағаштардан жиналып алынды. Жеті маркерлер жиынтықтары және адаптер ретінде спецификалық емес тізбектер пайдаланылды: D8S1132, DYS437, D12S1090 – VIC, 6-FAM, NED флюоресцентті таңба үшін. Зерттелген аймақтағы популяциялардан жеті локус бойынша барлығы 74 аллелдер анықталды. Соның ішінде локус бойынша полиморфты аллелдер GD100 үшін 5-тен GD162 үшін 14-ке дейін түрленді, сондай ақ аллелдің орташа көрсеткіші 10,6 құрады. Аллелдердің эффективті саны (N_e) әр локусқа орташа көрсеткіші 3,8 болды. Зерттелген локустардың полиморфизм деңгейі (PIC) GD100 локусы үшін 0,593-тен GD142 локусы үшін 0,779-ке дейін түрленді, жеті локус үшін орташа көрсеткіші 0,691 құрады. Күтілетін (H_e) және байқалатын (H_o) гетерозиготалықтың деңгейі барлық жеті локустарда жоғары болды, орта есеппен алғанда 0,724 және 0,710 құрады. Шеннонның әртүрлілік индексінің деңгейі (I) жалпы локустар бойынша барлық үлгілер үшін орта есеппен алғанда $1,62 \pm 0,085$ құрады. Әртүрлілік индексі популяция арасында $1,33 \pm 0,091$ (Тік шатқалы) $1,65 \pm 0,092$ дейін (Лепс өзенінің оң жақ жағалауы) ауытқыды, сонымен бірге жақын орналасқан популяциялар үшін де. Жоңғар Алатауы және Тарбағатай тауларында өсетін жабайы алма ағаштары популяцияларының геномды ДНК банкі құрылды. Райт статистикасына сүйенсек, популяция аралық өзгергіштік 3,4% ғана құрады, ал қалған өзгергіштік *M. sieversii* әр бір популяция ішінде анықталды.

Biotechnology. Theory and Practice/Биотехнология. Теория и практика.
2015, no. 1, pp. 26-34
DOI: 10.11134/btp.1.2015.3

Кілттік сөздер: *Malus sieversii*, популяциялар, генетикалық әр түрлілік, SSR маркерлер, ДНҚ полиморфизмі, ПТР.