

Оценка сортов груши, выделенных из генофондовой коллекции Никитского ботанического сада по комплексу хозяйственно ценных признаков, с помощью микросателлитных маркеров

Ю.В. Плугатарь¹, Р.Д. Бабина²✉, И.И. Супрун³, Т.С. Науменко¹, Я.И. Алексеев⁴

¹ Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН, Ялта, Республика Крым, Россия

² Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН, отделение «Крымская опытная станция садоводства», лаборатория селекции и сортоизучения, Симферопольский район, Республика Крым, Россия

³ Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, лаборатория генетики и микробиологии, Краснодар, Россия

⁴ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

Мобилизация и сохранение генетических ресурсов разнообразия культурных сортов груши и ее диких сородичей являются одним из основных аспектов при создании новых сортов современного интенсивного садоводства. Решающее значение при выведении сорта имеет подбор родительских пар, обладающих комплексом положительных признаков. Целью данной работы было изучение коллекционно-селекционных насаждений генофондовой коллекции груши Никитского ботанического сада по основным хозяйственно-биологическим признакам и отбор наиболее ценных сортов для использования их в селекционных программах в качестве исходного материала, а также выполнение ДНК-фингерпринтинга и оценка генетического полиморфизма выборки перспективных сортов с применением анализа микросателлитных локусов. В результате многолетних исследований по комплексу признаков выделены сорта, представляющие интерес для использования в селекционных исследованиях: Гвардейская Зимняя, Изумрудная, Изюминка Крыма, Кельменчанка, Крымская Ароматная, Крымская Медовая, Лазурная, Мария, Мрия, Надежда Степи, Незабудка, Новосадовская, Ореанда Крыма, Отечественная, Тающая, Якимовская. Образцы представленных сортов были переданы для генотипирования. Для анализа генетического полиморфизма в изучаемой группе сортов использовали семь микросателлитных ДНК-маркеров: EMPc108, EMPc117, EMPc115, CH04e03 и CH01d09, CH01f07a, CH01d08, которые были сгруппированы в два мультиплексных набора. SSR-маркеры значительно различались по уровню полиморфизма: было выявлено от трех (маркер CH04e03) до 11 (EMPc115) аллелей на локус. При этом показатель эффективного числа аллелей варьировал от 1.37 до 4.65. На основании данных оценки полиморфизма SSR-маркеров проведен анализ степени генетического сходства изученных сортов груши, который позволил оценить генетические взаимосвязи в изученной выборке генотипов. Полученные SSR-фингерпринты сортов будут использованы в качестве исходных данных для создания базы данных ДНК-паспортов сортов генофондовой коллекции груши НБС-ННЦ.

Ключевые слова: груша; хозяйственно ценные признаки; генотипирование; SSR-маркирование; генетическое разнообразие.

Microsatellites-based evaluation of the pear cultivars selected from Nikitsky botanical gardens germplasm by their economically valuable characteristics

Y.V. Plugatar¹, R.D. Babina²✉, I.I. Suprun³, T.S. Naumenko¹, Y.I. Alekseev⁴

¹ Order of the Red Banner of Labour Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center of the RAS, Yalta, Republic of the Crimea, Russia

² Order of the Red Banner of Labour Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center of the RAS, the Department of “The Crimean Horticultural Experiment Station”, Selection and Cultivars Study Laboratory, Simferopol region, Republic of the Crimea, Russia

³ North Caucasian Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Winemaking, Genetics and Microbiology Laboratory, Krasnodar, Russia

⁴ The National Scientific Center of Agricultural Biotechnologies, Moscow, Russia

Mobilization and preservation of genetic sources of diversity of the cultivated pear varieties and their wild relatives is one of the main aspects of new cultivars breeding for modern intensive horticulture. The crucial matter during a new cultivar creation goes to the selection of parental pairs, which obtain a complex of positive features. The aim of this work is to study the Gene Fund collection of pear plantings from Nikitsky Botanical Gardens in accordance with the main economically important traits and to select the most valuable genotypes for using them in breeding programs as a starting material, as well as to conduct a DNA-fingerprinting and the analyses of genetic polymorphism of promising cultivars from the collection of pear with implementing of microsatellite analyses. As a result of long-term studies the following cultivars were selected in accordance with the complex of features promising for the breeding program: Gvardeiskaya Zimnyaya, Izuminka Kryma, Izumrudnaya, Kelmenchanka, Krymskaya Aromatnaya, Krymskaya Medovaya, Lazurnaya, Maria, Mriya, Nadezhda Stepi, Nezabudka, Novosadovskaya, Oreanda Kryma, Otechestvennaya, Tauschaya, Yakimovskaya. The samples of these cultivars were forwarded for genotyping. For the genetic polymorphism analyses of the studied cultivars, seven microsatellite DNA-markers – EMPc108, EMPc117, EMPc115, CH04e03 and CH01d09, CH01f07a, CH01d08 – grouped into 2 multiplex sets were used. The SSR-markers were significantly different according to their

level of polymorphism – from 3 (CH04e03 marker) to 11 (EMPC115) alleles per a gene locus were revealed, the effective number of alleles varying from 1.37 to 4.65. Based on SSR-markers polymorphism analysis data, the rate of genetic similarity of the studied pear cultivars was estimated. This evaluation research helped estimate genetic relations inside the studied sample collection of genotypes. The SSR-fingerprints of the cultivars obtained will be used as a starting material for the creation of DNA-passports database of the “NBG – NSC” Gene Fund collection of pear cultivars.

Key words: pear; economically valuable features; genotyping; SSR-markers; genetic diversity.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Плугатарь Ю.В., Бабина Р.Д., Супрун И.И., Науменко Т.С., Алексеев Я.И. Оценка сортов груши, выделенных из генофондовой коллекции Никитского ботанического сада по комплексу хозяйственно ценных признаков, с помощью микросателлитных маркеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):60-68. DOI 10.18699/VJ18.332

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Plugatar Y.V., Babina R.D., Suprun I.I., Naumenko T.S., Alekseev Y.I. Microsatellites-based evaluation of the pear cultivars selected from Nikitsky botanical gardens germplasm by their economically valuable characteristics. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(1):60-68. DOI 10.18699/VJ18.332 (in Russian)

Природные условия Крыма исключительно благоприятны для промышленного выращивания высококачественных десертных сортов груши, особенно зимних и позднезимних сроков созревания. Груша была одной из главных культур в садах по долинам Южного берега и на чаирах в предгорье. В начале XX столетия удельный вес ее в садах Крыма достигал 26 %, а в Алуштинском районе – 86–87 %. Ежегодно на центральные рынки России вывозилось более 10 тыс. т плодов груши. За свои высокие вкусовые качества она приобрела известность на фруктовых рынках и успешно конкурировала с плодами Франции и Бельгии (Баскакова, 2015; Сотник, Бабина, 2016).

В мировом производстве плодов среди семечковых культур груша занимает второе место после яблони. Ежегодно в мире выращивают более 17 млн т плодов груши при средней урожайности 10.2 т/га. Лидером по производству груши считается Китай (около 8 млн т). Основными производителями в Европе являются Италия, Испания, Германия, Франция.

Ценность этой культуры заключается в больших возможностях потребления ее плодов на протяжении почти целого года как свежими, так и в различных вариантах технической переработки. Плоды десертных сортов груши отличаются маслянистой, сочной консистенцией мякоти, приятным вкусом, тонким ароматом и привлекательным внешним видом. Они содержат 10–15 % сахаров, 0.12–0.40 % кислот, 0.18–0.74 % пектиновых веществ, 11–68 мг % дубильных веществ, 30–49 мг % Р-активных веществ, 5–12 мг % витамина С. Обнаружены также витамины В2, В6, фолиевая кислота (В9), играющая большую роль в процессе кроветворения. В плодах груши в значительных количествах содержится хлорогеновая кислота, относящаяся к группе фенольных соединений. Груша – профилактическое средство при ряде заболеваний, действует как желчегонное, улучшает работу почек. Многие сорта богаты микроэлементами, особенно йодом (до 20 мг %). В листьях груши обыкновенной содержание гликозида арбутина достигает 1.4–5 %. Высокоценные в питательном отношении плоды груши пользуются большим спросом у населения. Однако их среднегодовое производство удовлетворяет потребность лишь на 10–16 %.

В соответствии с Программой развития садоводства в Республике Крым до 2025 г. запланировано увеличение площадей под этой ценной плодовой культурой, преимущественно за счет новых сортов крымской селекции (Плугатарь и др., 2017). Особая заслуга в изучении и распространении сортов груши в Крыму принадлежит известному ученому-садоводу Л.П. Симиренко. Еще в конце XIX века он детально изучил в Никитском саду коллекцию груши, насчитывающую более 500 сортов европейского и местного происхождения (Вольвач, 1996).

Мобилизация и сохранение генетических ресурсов всего разнообразия культурных сортов груши и ее диких сороридей – один из основных аспектов при создании новых сортов, отвечающих требованиям современного интенсивного садоводства для конкретных регионов выращивания данной культуры (Гиричев и др., 2012).

Благодаря использованию в селекции образцов из коллекций ВИР, собранных учеными многих поколений, в настоящее время созданы и внедрены в производство новые высококачественные сорта груши, позволившие значительно повысить урожайность и расширить ареал этой ценной плодовой культуры. Селекционерами ФГБНУ «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН» (НБС-ННЦ) и Крымской опытной станции садоводства (с 2015 г. она вошла в состав НБС-ННЦ) создано более 100 сортов груши. По данным 2017 г., в Государственный реестр селекционных достижений включено и допущено к использованию 13 сортов: Васса, Гвардейская Зимняя, Десертная, Золотистая, Изумрудная, Изюминка Крыма, Мария, Мрия, Надежда Степи, Новосадовская, Отечественная, Таврическая, Якимовская.

Однако, несмотря на определенные успехи в области селекции груши, ее сортимент по-прежнему требует постоянного совершенствования и обновления сортами нового поколения. Приоритетным направлением в селекции этой ценной плодовой культуры является создание высокоадаптивных и продуктивных сортов с высоким качеством плодов, пригодных для промышленного выращивания по интенсивным технологиям в условиях Крыма и других южных регионов.

Решающее значение при создании сорта имеет подбор родительских пар, обладающих комплексом положительных признаков. Развитие методов молекулярного ДНК-маркирования и их внедрение в научную практику способствуют повышению эффективности выполнения исследований, направленных на выяснение генетических взаимосвязей образцов на внутри- и межвидовом уровне и изучение генетической структуры коллекций генофондов, создание стержневых (core) коллекций, паспортизацию и регистрацию имеющегося генофонда. Помимо этого, методы ДНК-маркирования могут быть эффективно использованы для поиска доноров генов селекционно-ценных признаков, выявления дублирующих образцов, решения спорных вопросов при включении вновь поступивших образцов. Перспективным может оказаться использование данных об уровне генетического сходства в комплексе с фенотипической характеристикой сортов при формировании родительских пар при гибридизации в селекционных программах.

В работах по изучению генетического разнообразия, идентификации сортов наиболее распространенными и высокоэффективными являются маркерные системы, основанные на вариабельности микросателлитных последовательностей генома. Микросателлиты (simple sequence repeats – SSR) – тандемные повторы простых последовательностей в структуре ДНК, источник полиморфизма которых – сайт-специфическое варьирование длины повтора, что, в свою очередь, обусловлено различием в числе единиц повтора (Schlotterer, Soller, 1997). Микросателлитные последовательности распространены повсеместно в геноме высших растений. Преимуществом SSR-маркеров – кодоминантный тип наследования, высокая дифференцирующая способность, воспроизводимость результатов.

Данный тип ДНК-маркеров широко используется в изучении генетического разнообразия груши. При этом спектр исследований варьирует от изучения генетической структуры природных популяций дикорастущих видов до анализа генетической структуры коллекций генетических ресурсов и выяснения путей формирования локальных культурных генофондов, в том числе автохтонной генплазмы. В некоторых работах сочетаются анализ фенотипического варьирования признаков и SSR-генотипирование для всесторонней оценки генофонда. Так, в работе исследователей из Индии была выполнена оценка генетического разнообразия и структуры коллекции из 48 образцов рода *Pyrus* на основе анализа 23 фенотипических характеристик и 20 SSR-маркеров (Rana et al., 2015). Примеры использования SSR-маркеров для выполнения популяционно-генетических исследований известны для различных видов рода *Pyrus*: *P. pyraeaster* (Wolko et al., 2015; Reim et al., 2017), *P. calleryana* (Liu et al., 2012), *P. caucasica* (Токмаков, Супрун, 2016). Широко применяются SSR-маркеры и для анализа генетической структуры коллекций сортов и их паспортизации (Brini et al., 2008; Tian et al., 2012; Sehic et al., 2012), а также для выяснения вероятных путей формирования автохтонного генофонда (Brini et al., 2008; Супрун и др., 2016).

Очевидно, что на современном этапе развития селекционно-генетических исследований SSR-фингерпринтинг сортов дополняет описание по основным хозяйственно-

биологическим признакам и позволяет точно идентифицировать сорта, устанавливать их происхождение, выявлять синонимы и примеси в коллекциях, оценивать уровень генетического полиморфизма в коллекциях по результатам анализа аллельного набора SSR-маркеров, использованных для генотипирования.

В связи с этим целью нашей работы было изучение коллекционно-селекционных насаждений груши по основным хозяйственно-биологическим признакам и отбор наиболее ценных сортообразцов для использования их в селекционных программах в качестве исходного материала, а также выполнение ДНК-фингерпринтинга и оценка генетических связей в выборке из 16 перспективных сортов, представляющих Генофондовую коллекцию груши НБС-ННЦ, по результатам анализа микросателлитных локусов.

Материалы и методы

Объектом исследований в период с 2000 по 2017 г. служила генетическая коллекция сортов груши НБС-ННЦ, произрастающая в условиях предгорной и степной части Крыма, на территории участков лаборатории предгорного садоводства (Бельбекская долина), лаборатории селекции и сортоизучения плодовых культур (бывшая Крымская опытная станция садоводства, с. Маленькое) и лаборатории степного садоводства (с. Новый сад).

Коллекция груши насчитывает 1216 сортообразцов, в том числе 270 селекционных форм. Рабочий гибридный фонд составляет около 3 тыс. гибридов. Схема посадки деревьев 4 × 2; 4 × 1.5; 4 × 3 м. Подвой – айва ВА 29 и сеянцы лесной груши. Почва содержится под черным паром, орошение стационарное. Агротехнические мероприятия в саду общепринятые. Климат здесь засушливый, с довольно мягкой, короткой и неустойчивой зимой, характеризующейся сменяющимися оттепелями и похолоданиями, а также возвратными весенними заморозками. В летний период температура в полуденные часы поднимается до 26–28 °С, абсолютный максимум 39 °С. Средняя температура января составляет –1 °С, февраля –0.3 °С, возможно ее понижение до –27...–32 °С. Годовое количество осадков в среднем достигает 480 мм (Антюфеев и др., 2002). Исследования проводили в соответствии с «Программой и методикой селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур» (1980, 1999). Для анализа погодных условий использовали данные метеопоста отделения «Крымская опытная станция садоводства».

Объектом исследований для ДНК-маркирования послужили 16 районированных и перспективных для Крыма и Южного федерального округа сортов груши отечественной селекции (Гвардейская Зимняя, Изумрудная, Изюминка Крыма, Кельменчанка, Крымская Ароматная, Крымская Медовая, Лазурная, Мария, Мрия, Надежда Степи, Незабудка, Новосадовская, Ореанда Крыма, Отечественная, Тающая, Якимовская).

Экстракцию ДНК проводили из молодых листьев с использованием метода ЦТАБ (Murray, Thompson, 1980). ПЦР выполняли в общем объеме 25 мкл при следующих концентрациях компонентов реакционной смеси: 1.5 мМ дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 0.3 мМ каждого праймера (ООО «Синтол»), 2.5 мкл ПЦР-буфера, 1 ед. Таq ДНК-полимеразы (ООО «СибЭнзим»), 50 нг ДНК.

Амплификацию проводили по следующей программе: 1 мин при 94 °С; следующие 35 циклов: 10 с при 94 °С, 30 с при 58 °С, 30 с синтез при 72 °С; финальный цикл синтеза – 2 мин при 72 °С.

В работе использовано семь микросателлитных маркеров, сгруппированных в два мультиплексных набора. В каждом наборе SSR-маркеры были сгруппированы с учетом диапазонов размеров амплифицированных фрагментов и несли разные флуоресцентные метки (ROX, TAMRA, R6G или FAM). Набор 1: EMPc108 (R6G), EMPc117 (TAMRA), EMPc115 (ROX), CH04e03 (TAMRA); набор 2: CH01d09 (ROX), CH01f07a (TAMRA), CH01d08 (FAM). Мультиплексные наборы сформированы с учетом результатов ранее выполненных исследований (Супрун и др., 2013).

Фрагментный анализ проводили на генетическом анализаторе ABIprism 3130, данные обрабатывали в программе GeneMapper 4.1. При анализе полиморфизма рассчитывали количество выявленных аллелей (Na) по изученным SSR-локусам, наблюдаемую гетерозиготность (Ho). Ожидаемую гетерозиготность (He) и эффективное число аллелей (Ne) рассчитывали по формулам

$$He = 1 - \sum p_i^2, \quad Ne = 1 / \sum p_i^2,$$

где p_i – частота i -го аллеля в локусе.

Кластерный анализ выполнен методом попарного невзвешенного кластирования с арифметическим усреднением (UPGMA), анализ методом главных координат (PCoA) – с использованием пакета программ PAST.

Результаты и обсуждение

В настоящее время генофондовая коллекция груши в Крыму сосредоточена в Никитском ботаническом саду и представлена значительным генетическим и эколого-географическим разнообразием. Это сорта из Украины (37.2%), Европы (20.8%), России (7.5%), республик СНГ (10%), США (3%) и ряда других стран. Многочисленную группу (18.4%) составляют сорта и селекционные формы крымской селекции (Никитский ботанический сад и Крымская опытная станция садоводства). Среди изучаемых сортов 15 триплоидных и 3 тетраплоидных.

Сроки цветения. В условиях Крыма массовое цветение груши наблюдается во второй декаде апреля. По многолетним данным о сроках цветения установлено, что из 260 изучаемых сортов 13.2% относятся к раннецветущим, 60.3% – к среднецветущим. В наиболее ценную позднецветущую группу входят 26.5% сортов. Среди них особый интерес для использования в селекционных исследованиях на позднее цветение представляют районированные и перспективные сорта селекции Никитского ботанического сада: Арбоск, Гвардейская Зимняя, Десертная, Джанкойская, Красавица Тавриды, Мария, Незабудка, Отечественная, Салгирская Зимняя, Тающая, Якимовская и др.

Устойчивость цветков груши к весенним заморозкам. Несмотря на то что Крым является весьма благоприятным регионом для выращивания высококачественных сортов груши, здесь довольно часто бывают стрессовые ситуации, которые наносят существенный ущерб плодовым насаждениям этой ценной культуры. Главные из

них – низкие температуры и резкие их колебания в зимний период, частые оттепели, а также весенние заморозки в период цветения (Симиренко, 1972; Бабина, 2001).

Анализ метеорологических условий за последние 50 лет показал, что в Крыму заморозки во время цветения груши бывают раз в два-три года. Гибель цветков происходит при температуре $-2 \dots -3$ °С, а молодые завязи могут выдерживать продолжительные заморозки до $-2 \dots -4$ °С. Существующие на сегодня доступные меры по защите плодовых насаждений от заморозков не всегда эффективны и достаточно дорогостоящие. Основной путь для снижения вероятности повреждения цветков заморозками – это создание и внедрение в производство новых сортов с поздним цветением и высокой устойчивостью цветков к низким температурам.

По многолетним исследованиям установлено, что в зависимости от сорта степень повреждения цветков заморозками в коллекционных насаждениях варьировала от 0 до 90%. Полученные данные позволили выделить сорта с высокой устойчивостью (до 30%) генеративных органов к низким температурам. К ним относятся: позднецветущие – Арбоск, Бере Арданпон, Буковинка, Гвардейская Ранняя, Гурзуфская, Десертная, Жанна д'Арк, Мария, Мервей Рибе, Первомайская, Якимовская; среднецветущие – Золотистая, Золушка, Изумрудная, Изюминка Крыма, Мраморная, Надежда Степи, Ноябрьская Молдавии, Ореанда Крыма, Таврическая.

Выделенные по этому признаку сорта представляют интерес для промышленного выращивания в регионах с повышенной опасностью весенних заморозков в период цветения, а также для использования в селекционных исследованиях.

Скороплодность и урожайность груши. Одним из главных факторов увеличения производства плодов груши является внедрение новых скороплодных и высокоурожайных сортов, в высокой степени адаптированных к природным условиям Крыма. Сорта, вступившие в плодоношение в более ранние сроки, значительно быстрее окупают капитальные затраты на закладку сада и уход за молодыми насаждениями в сравнении с сортами, вступающими в плодоношение в более поздние сроки.

С целью выявления скороплодных сортов проведена оценка по времени вступления в пору плодоношения 220 сортов, привитых на айве ВА 29. В результате исследований установлено, что 180 сортов начали плодоносить в 3–4-летнем возрасте. Среди них районированные и перспективные сорта собственной селекции: Десертная, Дива, Золотистая, Золушка, Изюминка Крыма, Лазурная, Мария, Мрия, Надежда Степи, Новосадовская, Ореанда Крыма, Старокрымская, Таврическая, Якимовская. В более поздние сроки – на 4–5-й год заплодоносили 40 сортов.

По урожайности изучаемые сорта груши объединены в четыре группы:

- высокоурожайные (более 30 т/га). В эту группу вошло 85 сортов, в том числе: Десертная, Дива, Золушка, Изумрудная, Изюминка Крыма, Красавица Тавриды, Киргизская Зимняя, Крымская Медовая, Лазурная, Надежда Степи, Ореанда Крыма, Таврическая, Якимовская;
- урожайные (20.1–30.0 т/га). Всего 101 сорт: Васса, Виктория Крыма, Виола, Деканка Зимняя, Золотистая, Кель-

менчанка, Наталка, Незабудка, Отечественная, Памяти Милешко, София, Старкримсон, Тающая и др.;

- среднеурожайные (15.1–20.0 т/га). Всего 20 сортов: Бере Арданпон, Гранд Чемпион, Ласточка, Любимица Клаппа, Мервей Рибе, Санта Мария и др.;
- малоурожайные (ниже 10 т/га). Эту группу пополнили 14 сортов, в том числе Бере Прекос Мореттини, Вильямс Руж Дельбара, Курортница и др.

Устойчивость к парше. Болезни и вредители плодовых культур существенно снижают урожай и ухудшают товарные качества плодов. Наибольший вред плодовым культурам, в частности груше, наносит парша. В борьбе с паршой достаточно эффективно использование фунгицидов. Однако их применение сопряжено с повышением себестоимости продукции, а главное, приводит к загрязнению окружающей среды, нарушению взаимосвязей в естественных биоценозах, уничтожению не только возбудителей болезней, но и полезных насекомых и микроорганизмов. В связи с этим основным направлением в защите растений должно быть использование устойчивых сортов.

Из 558 исследуемых сортов с высокой устойчивостью к парше (0–0.5 балла) выделено около 100 образцов. Среди них заслуживают внимания для внедрения в производство и использования в селекционных программах: Виола, Гвардейская Ранняя, Гранд Чемпион, Гурзуфская, Десертная, Золотая Осень, Золушка, Изюминка Крыма, Изумрудная, Крымская Ароматная, Крымская Медовая, Лазурная, Мария, Мрия, Надежда Степи, Отечественная, Степная Красавица, Сокровище, Тающая, Якимовская.

Сроки созревания и качество плодов. В сорimente груши остро ощущается недостаток ультраранних и позднезимних сортов. Известно, что у большинства видов и сортов груши в процессе эволюции сформировалось свойство осеннего срока созревания плодов. Этот признак доминирует, поэтому отбор и создание новых раннеспелых и позднезимних сортов является актуальной задачей. Многолетнее изучение 780 сортов груши различного эколого-географического происхождения позволило по срокам созревания разделить их на раннелетние, летние, осенние, зимние, позднезимние.

К раннелетним отнесены 22 сорта. Среди них – Бере Жиффар, Енисейка, Земистане, Красивая, Магдалина Зеленая, Молдавская Ранняя, Пловдиска, Солнечная, Трапезица, Ультраранняя и др.

Летнюю группу представляют 107 сортов, среди них – Белка, Бере Прекос Мореттини, Вильямс, Вильямс Руж Дельбара, Гвардейская Ранняя, Имениница, Любимица Клаппа, Ореанда Крыма, Степная Красавица, Старкримсон.

В наиболее многочисленную осеннюю группу входят 328 сортов, в том числе районированные и перспективные: Виктория, Гранд Чемпион, Десертная, Крымские Зори, Лазурная, Надежда Степи, Новосадовская, Старокрымская, Санта Мария, Таврическая, Якимовская.

Зимнюю и позднезимнюю группу представляют 323 сорта: Бере Арданпон, Васса, Гвардейская Зимняя, Деканка Зимняя, Джанкойская Зимняя, Дива, Золотистая, Изумрудная, Изюминка Крыма, Кельменчанка, Киргизская Зимняя, Крымская Зимняя, Мария, Мрия, Наталка, Незабудка,

Оливье де Серр, Отечественная, Пасс Крассан, София, Триумф Пакгама, Тающая и др.

При внедрении в производство новых сортов груши большое внимание уделяется величине и внешнему виду плодов, которые характеризуют их товарность. По определению Л.П. Симиренко, «Груша должна быть, прежде всего, крупной и красивой: если она невзрачна и малого размера, то никакие вкусовые достоинства не сделают ее прибыльным сортом» (Симиренко, 1972). В результате проведенных исследований изучаемые сорта груши по средней массе плодов распределены на четыре группы: исключительно крупные (более 350 г), очень крупные (251–350 г), крупные (201–250 г), выше (151–200 г) и ниже средней величины (менее 150 г).

Исключительно крупные плоды отмечены у 23 сортов, в том числе: Бере Крыма, Выставочная, Львовский Сувенир, Наталка, Реале Туринская Тающая, Фрагранте. Очень крупные плоды определены у 150 сортов, среди них – Амазонка, Бирюзовая, Выставочная, Дюшес Англем, Жак Телье, Карл Вюртембергский, Кельменчанка, Ле Брюн, Легенда, Маргарита Марилья, Незабудка, Орбита, Пасс Крассан, Сильва, Старокрымская София, Ракета, Верна и др. Большинство (325) изучаемых сортов имеют плоды массой 200–250 г.

По вкусовым качествам основная масса сортов (83 %) оценена на 4.5–5 баллов. Особую ценность за высокие вкусовые качества и привлекательный внешний вид плодов представляют сорта: Арбоск, Выставочная, Десертная, Доктор Жюль Гюйо, Жанна д'Арк, Изюминка Крыма, Красавица Тавриды, Крымская Ароматная, Крымская Медовая, Мрия, Мария, Меллина, Нектарная, Новосадовская, Отечественная, Осенняя Костыка, Санта Мария, Тающая, Хайланд, Якимовская и др.

Учитывая ценность свежих плодов груши, которые являются важной составной частью рациона сбалансированного питания человека, садоводство должно обеспечить население плодами круглогодично. Поэтому важно не только вырастить и собрать их, но и сохранить с минимальными потерями в течение максимального срока. Изучение коллекционного фонда груши по продолжительности хранения плодов позволило выделить сорта с наиболее длительной лежкоспособностью (180–240 дней): Аббат Фетель, Гвардейская Зимняя, Доктор Тиль, Жанна д'Арк, Изумрудная, Изюминка Крыма, Кельменчанка, Крымская Медовая, Мария, Мрия, Наталка, Ноябрьская Молдавии, Оливье де Серр, Отечественная, Пасс Крассан, София, Салгирская Зимняя, Тающая, Форель Зимняя и др.

В результате многолетних исследований выделены сорта селекции Никитского ботанического сада, представляющие интерес для использования в селекционных программах в качестве источников ценных признаков. Краткая характеристика их основных параметров представлена в табл. 1.

При проведении генотипирования оптимальное объединение SSR-маркеров в мультиплексных наборах, выполненное с учетом диапазонов длин амплифицируемых фрагментов по конкретным локусам, согласно литературным данным, и температурам отжига праймерных пар, позволило эффективно идентифицировать целевые фрагменты при выполнении фрагментного анализа.

Table 1. Main sources of commercially valuable traits of pear cultivars selected for use in breeding and genetic studies

Cultivar	Ripening Term (third of the month.)	First year of fruiting	Frost resistance of flowers, %	Disease resistance, score		Output per hectare, tons	Fruit quality		Storage time, days
				scab	thermal burn of leaves		weight, g	taste, score	
Gvardeiskaya Zimnyaya	1.10	3–4	5–7	0.5	1.0	28–30	250	4.5	240
Izumrudnaya	1–2.10	3–4	5–10	0.5	0.5	35–37	320	4.7	240
Izuminka Kryma	3.09	3	10–20	0.2	0.5	30–35	290	4.8	220
Kelmenchanka	1.10	3	12–15	0	0	28–30	280	4.5	210
Krymskaya Aromatnaya	1.09	3	15–19	0.5	1.5	28–32	310	4.9	95
Krymskaya Medovaya	3.09	3–4	15–20	0	0	32–35	320	5.0	210
Lazurnaya	1–2.09	3	7–9	0	0.5	32–35	290	5.0	110
Mariya	1–2.10	3	5–8	0	0	38–45	260	4.9	240
Mriya	2–3.09	3–4	10–15	0.5	0.5	32–35	270	5.0	220
Nadezhda Stepi	1.09	3–4	10–18	0.5	1.0	28–30	210	4.7	90
Nezabudka	1.10	3	5–9	1.0	0.5	27–29	280	4.5	190
Novosadovskaya	–	3–4	5–10	0.5	0.5	–	220	4.5	150
Oreanda Kryma	3.08	3	3–5	1.0	0.5	35–38	210	4.8	90
Otechestvennaya	2–3.09	3–4	5–7	0.5	0	23–25	310	5.0	220
Tayushchaya	2–3.09	4	10–12	0	0.5	25–28	380	4.8	210
Yakimovskaya	1.09	3	5–7	0	0	35–40	290	4.9	120

Note. Dash-no data.

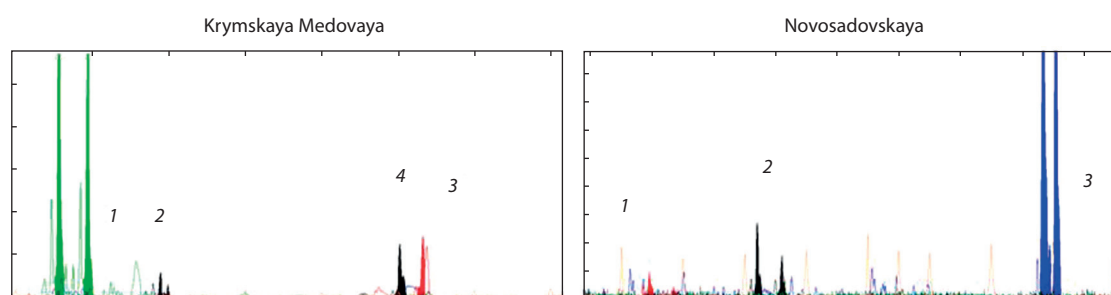


Fig. 1. Allele profiles for the SSR marker set. Krymskaya Medovaya: 1, EMPc108 (R6G); 2, EMPc117 (TAMRA); 3, EMPc115 (ROX); 4, CH04e03 (TAMRA). Novosadovskaya: 1, CH01d09 (ROX); 2, CH01f07a (TAMRA); 3, CH01d08 (FAM).

На рис. 1 представлены аллельные профили образцов Крымская Медовая и Новосадовская по различным наборам SSR-маркеров. Наличие двух пиков по каждому маркеру говорит о гетерозиготности изучаемого образца по данным локусам.

В результате анализа изученной выборки сортов были получены уникальные (генотип-специфичные) SSR-фингерпринты для всех изученных сортов (табл. 2). Размер амплифицированных фрагментов указан в парах оснований. Как видно из табл. 2, количество выявленных аллелей и гетерозиготность, характеризующаяся одновременным присутствием двух амплифицированных фрагментов разного размера, сильно различаются.

Показатели, характеризующие уровень гетерогенности изученной выборки образцов груши и полиморфизм

SSR-маркеров, приведены в табл. 3. Из данных табл. 2 и 3 видно, что уровень аллельного полиморфизма по SSR-маркерам, использованным в работе, значительно варьирует: от трех аллелей по маркеру CH04e03 до 11 – по маркеру EMPc115.

При этом величина показателя N_e (количество эффективных аллелей) не для всех маркеров одинаково пропорционально высока при высоком значении показателя N_a (количество выявленных аллелей) (см. табл. 3). В первую очередь это обусловлено неравномерным распределением частот встречаемости аллелей SSR-маркеров. При отборе SSR-маркеров для выполнения дальнейших исследований по изучению генетической структуры коллекции и ДНК-паспортизации сортов необходимо учитывать оба этих показателя. На данный момент можно сказать о низ-

Table 2. Microsatellite DNA-profiles of the studied pear cultivars from the NBG – NSC gene pool collection

Variety	EMPc108		EMPc117		EMPc115		CH04e03		CH01d09		CH01f07a		CH01d08	
Gvardeiskaya Zimnyaya	88	91	101	103	181	200	180	180	157	183	186	275		
Izumrudnaya	91		120	124	202		180		151	153	183	275	278	
Izyuminka Kryma	88		103	105	176	186	180	206	151	157	183	197	281	
Kelmenchanka	82	91	120		186		180		131	157	183	186	275	281
Krymskaya Aromatnaya	91		118	120	183	192	180		153	157	179	186	275	281
Krymskaya Medovaya	91	99	118	120	196		180		153	157	183	186	278	281
Lazurnaya	91	99	118	120	186		180		131		183	186	278	281
Mariya	99		118	120	186	202	180		153	157	183	192	277	281
Mriya	84	88	120	124	182	186	180		135	153	186	193	275	281
Nadezhda Stepi	88	102	105		184	186	197		131	157	179	201	238	278
Nezabudka	91		98	120	186		180		131	151	183	211	278	281
Novosadovskaya	91	112	120		180	182	197		149	157	183	192	277	281
Oreanda Kryma	91	108	114	122	186		180		135	153	179	183	278	281
Otechestvennaya	99		99	105	186		180		153		183	186	281	
Tayushchaya	91		99	120	186		180		153	157	183	186	275	281
Yakimovskaya	108		114	120	182	186	180		143	157	179	183	275	278

Table 3. Polymorphism for SSR loci studied in 16 pear varieties from the NBG – NSC gene pool collection

Index	EMPc108	EMPc117	EMPc115	CH04e03	CH01d09	CH01f07a	CH01d08
Na	8	10	11	3	7	8	5
Ne	3.793	4.655	3.220	1.373	4.231	3.606	3.261
Ho	0.500	0.813	0.500	0.063	0.813	0.938	0.813
He	0.736	0.785	0.689	0.271	0.764	0.723	0.693

Designations: N, number of accessions in the group of genotypes under study; Na, number of detected alleles; Ne, number of effective alleles; Ho, observed heterozygosity; He, expected heterozygosity.

кой перспективности дальнейшего использования SSR-маркера CH04e03. Возможна его замена в мультиплексном наборе 1 на SSR-маркер с близким диапазоном амплифицируемых фрагментов.

При сравнении уровня генетического разнообразия изученной выборки сортов груши и коллекций сортов груши из других регионов мира наиболее наглядным было бы сопоставление с результатами работы (Sehic et al., 2012), в которой использовался набор из десяти SSR-маркеров для анализа выборки, включающей сорта шведской и мировой селекции из разных регионов мира. В этом исследовании были использованы SSR-маркеры EMPc117, CH04e03, CH01d09, CH01f07a и CH01d08, которые рассматривались и в нашей работе. В цитируемой работе при анализе выборки из 50 сортов по маркерам CH04e03 и CH01d08 было выявлено 6 и 7 аллелей соответственно – наименьшие показатели из всех SSR-маркеров. В нашем исследовании эти маркеры тоже проявили наиболее низкий уровень полиморфизма (3 и 5 аллелей). Для маркеров EMPc117, CH01d09 и CH01f07a было выявлено 12, 15 и 14 аллелей на локус. За исключением SSR-маркера CH01d09, это со-

поставимые результаты по уровню полиморфизма: маркеры EMPc117 и CH01f07a по результатам нашего исследования также можно отнести к более полиморфным. Различия по уровню полиморфизма SSR-маркера CH01d09 (у шведского коллектива он наиболее полиморфен – 15 аллелей) могут объясняться различиями в уровне полиморфизма участка его геномной локализации в генофонде груши из разных регионов. В целом можно сделать заключение, что изученная выборка крымских сортов обладает высоким уровнем аллельного полиморфизма SSR-маркеров, участвующих в исследовании. Это может быть обусловлено вовлечением в селекцию сортов из разных регионов мира (Бельгия, Франция, Германия, США).

Для анализа генетических взаимосвязей в экспериментальной выборке сортов, на основе данных SSR-генотипирования был выполнен кластерный анализ и анализ методом главных координат (рис. 2 и 3).

Анализ полученной в результате кластеризации дендрограммы позволяет выделить в выборке исследованных сортов две основные группы (кластера). В первый кластер вошли сорта Изюминка Крыма и Гвардейская Зимняя, ко-

торые имеют в качестве материнского компонента формы, полученные из США. Второй кластер включает 12 сортов: Кельменчанка, Тающая, Лазурная, Крымская Медовая, Незабудка, Отечественная, Мария, Изумрудная, Мрия, Крымская Ароматная, Якимовская, Ореанда Крыма. В качестве родительских форм при их создании использовались сорта из Западной Европы (Франция, Бельгия, Германия). Шесть сортов из этой группы, как следует из результатов анализа методом главных координат, генетически более однородны и образуют отдельную группу (см. рис. 3).

Внутри второго кластера в отдельные подкластеры выделились сорта Мрия и Крымская Ароматная, а также Якимовская и Ореанда Крыма. В результате микросателлитного анализа исследуемых пар сортов именно эти пары оказались наиболее сходны друг другу. Генетическое сходство объясняется происхождением (исключительно из Бельгии) форм, участвовавших в скрещиваниях при создании сортов.

Сорта Новосадовская и Надежда Степи выделены в отдельные ветви дендрита, и кроме того, в пространстве главных координат эти образцы также наиболее удалены от остальных (см. рис. 3). Рассматривая происхождение этих двух сортов, можно сделать вывод о соответствии данных об их происхождении и отнесении их в отдельные группы (аутгруппы). Так, сорт Надежда Степи, выделенный в аутгруппу и максимально генетически удаленный от всех сортов из экспериментальной выборки, является сеянцем от свободного опыления сорта Марианна (Бельгия), который не представлен в родословной ни одного из изученных сортов. Сорт Новосадовская, несмотря на то, что имеет в качестве одной из родительских форм сорт Оливье де Серр (Франция), тоже выделен в отдельную ветвь, что может быть обусловлено влиянием аллелей, унаследованных от второй родительской формы – сорта Триумф Виены (Франция), который не представлен в родословной ни одного из сортов выборки.

В целом, оценивая распределение сортов в иерархическом дендрите, полученном по данным UPGMA-анализа, и результаты анализа методом

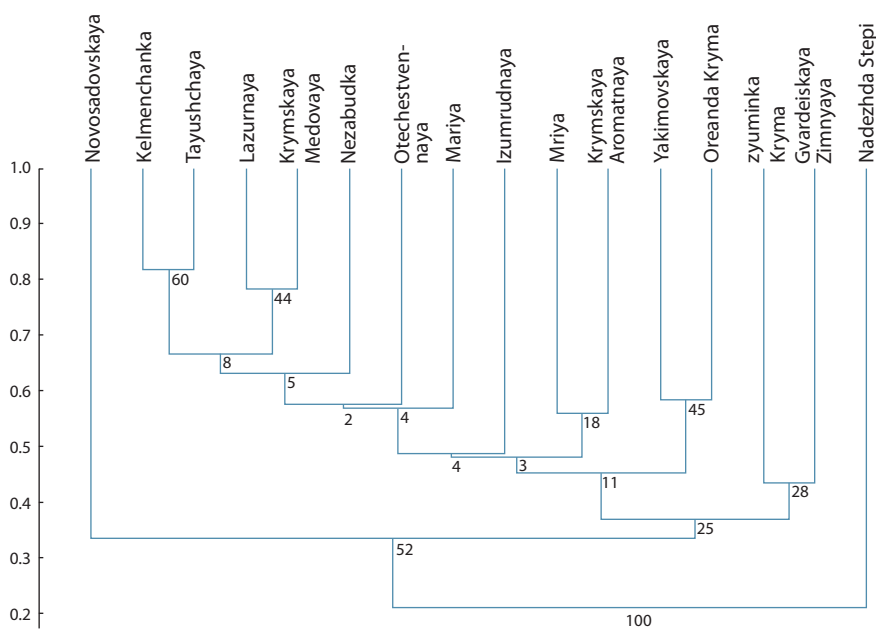


Fig. 2. UPGMA clusterization of pear specimens studied.

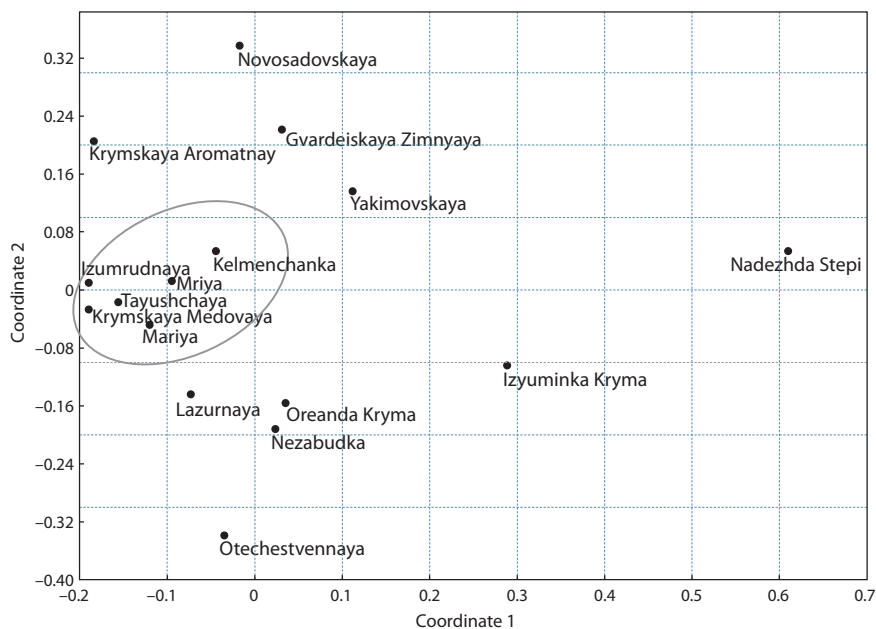


Fig. 3. Distribution of pear specimens studied in the principal coordinate space.

главных координат, можно сказать о наличии группы сортов, отнесенных ко второму кластеру, генетически близких друг другу.

Это может быть следствием использования в качестве родительских форм узкой группы сортов из Бельгии и Франции. Так, сорт Деканка Зимняя (Бельгия) указан как родительская форма у четырех сортов, сорт Бере Боск – у трех, Оливье де Серр – тоже у трех. Поскольку в изучаемую выборку вошли наиболее перспективные сорта селекции НБС-ННЦ, это может свидетельствовать о перспективности использования в селекции сортов из Франции и Бельгии. При этом для повышения уровня гетерогенности перспективно формирование родительских пар с учетом как комплекса фенотипических признаков, так и степени их генетического сходства – для обеспечения наибольшего генетического разнообразия в гибридном фонде.

Заклучение

В результате многолетних исследований выделены сорта груши по основным хозяйственно-биологическим признакам, представляющие интерес для использования их в качестве родительских форм и для выращивания в промышленных насаждениях по интенсивным технологиям. Использование в селекционных программах коллекционных сортов различного эколого-географического происхождения позволило создать в НБС-ННЦ более 100 сортов, 13 из которых включены в Государственный реестр селекционных достижений и допущены в производство: Васса, Гвардейская Зимняя, Десертная, Золотистая, Изумрудная, Изюминка Крыма, Мария, Мрия, Надежда Степи, Новосадовская, Отечественная, Таврическая, Якимовская.

Для выделенных образцов был проведен ДНК-фингерпринтинг и изучен генетический полиморфизм ряда сортов из Генофондовой коллекции груши НБС-ННЦ с применением анализа микросателлитных локусов. Использование семи микросателлитных маркеров позволило идентифицировать изученные сорта груши и объективно охарактеризовать степень их генетического родства. Полученные результаты показывают перспективность применения в селекции сортов из Франции и Бельгии. Для обеспечения наибольшего генетического разнообразия в гибридном фонде коллекции груши НБС-ННЦ следует учитывать при формировании родительских пар как комплекс фенотипических признаков, так и степень их генетического сходства.

Acknowledgments

The study was supported by the Federal Agency for Scientific Organizations, program for development of gene pool collections, project 0829-2017-0002. SSR genotyping was performed at the Genomic and Postgenomic Technologies Shared Access Center, North Caucasian Zonal Research Institute of Horticulture, Viticulture, and Wine-Making, Krasnodar, Russia.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Antufeev V.V., Vazhov V.I., Ryabov V.A. Spravochnik po klimatu stepnogo otdeleniya Nikitskogo botanicheskogo sada [The guide of climate conditions of the steppe department of the Nikitsky Botanical Gardens]. Yalta, 2002.

Babina R.D. Economical and biological evaluation of pear cultivars in the Crimean environment. Horticulture: Interdisciplinary topical scientific collection. Kiev: Nora-print Publ., 2001;52:37-45 (in Ukrainian)

Baskakova V.L. . Fruit quality estimation in winter pear cultivars in the Crimean steppe. Sbornik nauchnykh trudov GNBS = Bulletin of SNBG. 2015;140:150-157. (in Russian)

Brini W., Marsa M., Hormaza J.I. Genetic diversity in local Tunisian pears (*Pyrus communis* L.) studied with SSR markers. Scientia Horticulturae. 2008;115:337-341.

Girichev V.S., Vysotsky V.A., Marchenko L.A., Alekseenko L.V., Danilova A.A., Artyuhova A.V. Collections of fruit, berry, and ornamental plants as a tool for increasing breeding effectiveness. Sel'skokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2012;5:48-53. (in Russian)

Kimura M., Crow J.F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. Genetics (US). 1964;49:725-738.

Liu J., Zheng X., Potter D., Hu Ch., Teng Yu. Genetic diversity and population structure of *Pyrus calleryana* (Rosaceae) in Zhejiang province, China. Biochem. Syst. Ecol. 2012;45:69-78. DOI 10.1016/j.bse.2012.06.027.

Lobanov G.A. (Ed.). Programma i metodika selektsii plodovykh, yagodnykh i orekhoplodnykh kultur [Program and Methodology of the Breeding of Orchard Crops]. Michurinsk, 1980. (in Russian)

Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 1980;10:4321-4325.

Plugatar Y.V., Smykov A.V., Opanasenko N.E., Sotnik A.I., Babina R.D., Tankevich V.V., Mitrofanova I.V., Shoferistov E.P., Gorina V.M., Komar-Temnaya L.D., Khokhlov S.Yu., Chernobaj I.G., Lukicheva A.A., Fedorova S.S., Baskakova V.L., Litchenko N.A., Shishkina E.L., Litvinova T.V., Balykina E.B. K sozdaniyu promyshlennykh sadov plodovykh kultur v Krymu [On the creation of industrial orchards in Crimea]. Simferopol, 2017. (in Russian)

Rana J.C., Chahota R.K., Sharma V., Rana M., Verma N., Verma B., Sharma T.R. Genetic diversity and structure of *Pyrus* accessions of Indian Himalayan region based on morphological and SSR markers. Tree Genet. Genomes. 2015;11:821. DOI 10.1007/s11295-014-0821-2.

Reim S., Wolf H., Lochschmidt F., Proft A. Species delimitation, genetic diversity and structure of the European indigenous wild pear (*Pyrus pyraster*) in Saxony, Germany. Genet. Resour. Crop Evol. 2017;64:1075-1085. DOI 10.1007/s10722-016-0426-8.

Schlotterer C., Soller M. Polymorphism and locus-specific effects on polymorphism at microsatellite loci in natural *Drosophila melanogaster* populations. Genetics. 1997;146:309-320.

Sedov E.N., Ogo'l'tsova T.P. (Eds.). Programma i metodika selektsii plodovykh, yagodnykh i orekhoplodnykh kultur [Program and Methodology of the Breeding of Orchard Crops]. Orel, 1999. (in Russian)

Sehic J., Garkava-Gustavsson L., Fernandez-Fernandez F., Nybom H. Genetic diversity in a collection of European pear (*Pyrus communis*) cultivars determined with SSR markers chosen by ECPGR. Scientia Horticulturae. 2012;145:39-45. DOI 10.1016/j.scienta.2012.07.023.

Simirenko L.P. Pomologiya. Tom 2. Grusha [Pomology. Volume 2: Pear]. Kiev: Urozhay Publ., 1972;9-36. (in Ukrainian)

Sotnik A.I., Babina R.D. Grusha i persik v Krymu [Pear and Peach in the Crimea]. Simferopol: Antikva Publ., 2016. (in Russian)

Suprun I.I., Tokmakov S.V., Bandurko I.A., Ilnitskaya E.T. SSR-polymorphism of modern cultivars and autochthonous forms of the pear tree from North Caucasus. Genetika = Genetics (Moscow). 2016; 52(11):1270-1279. DOI 10.1134/S1022795416100112. (in Russian)

Suprun I., Tokmakov S., Stepanov I., Balapanov I. Development of multiplex sets of SSR markers for use in the study of genetic diversity within the genera *Malus*, *Prunus* and *Pyrus*. Nauchnye trudy GNU SKZNIISiV. Tom 1. Metodologicheskoe obespechenie selektsii sadovykh kul'tur i vinograda na sovremennom etape [Proceedings of North-Caucasian Research Institute of Horticulture and Viticulture. Vol. 1. Methodological support of the breeding of orchard and grape cultivars: state of the art]. Krasnodar, 2013;30-38. (in Russian)

Tian L., Gao Y., Cao Y. Identification of Chinese white pear cultivars using SSR markers. Genet. Resour. Crop. Evol. 2012;59:317-326. DOI 10.1007/s10722-011-9785-3.

Tokmakov S.V., Suprun I.I. The analysis of SSR-polymorphism in the natural Caucasian pear population in the piedmont area of North-Western Caucasus. Mezhdunarodnyy sammit molodykh uchenykh "Sovremennye resheniya v razvitiy sel'skokhozyaystvennoy nauki i proizvodstva" [International Summit of Young Scientists "Latest amenities in agricultural sciences development and production"]. 2016;206-212. (in Russian)

Volvach P.V. Introduction to the book of Simirenko L.P. Mestnye starodavnie sorta plodovykh kul'tur Kryma [Traditional Local Fruit Cultivars of Crimea]. Simferopol: Tavria Publ., 1996;3-30. (in Russian)

Wolko L., Bocianowski J., Antkowiak W., Slomski R. Genetic diversity and population structure of wild pear (*Pyrus pyraster* (L.) Burgsd.) in Poland. Open Life Sci. 2015;10:19-29. DOI 10.1515/biol-2015-0003.