

Морфологический и генетический полиморфизм интродукционной популяции *Prunus pumila* L. в Челябинской области

DOI: 10.30901/2227-8834-2021-1-142-152



УДК:575.17:581.4+634.235

Поступление/Received: 29.01.2020

Принято/Accepted: 01.03.2021

М. С. ЛЁЗИН*, С. В. АСБАГАНОВ

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН
630090 Россия, г. Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101
* ✉ Lezin-misha@mail.ru

Morphological and genetic polymorphism of the introduced population of *Prunus pumila* L. in Chelyabinsk Province

M. S. LEZIN*, S. V. ASBAGANOV

Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the RAS,
101 Zolotodolinskaya St., Novosibirsk 630090, Russia
* ✉ Lezin-misha@mail.ru

Актуальность. Изучение генетического полиморфизма представителей *Prunus pumila* L. с широким диапазоном изменчивости морфологических признаков позволит выявить перспективные генотипы с высокой комбинационной способностью при их гибридизации.

Материал и методы. В исследование включены 39 генотипов челябинской культурной популяции и 6 генотипов из Хакасии с крайними и промежуточными проявлениями признаков размера, окраски и формы плода, формы и структуры поверхности косточки, зазубренности края и формы листовой пластинки, габитуса растений и некоторых других. Генетические дистанции рассчитаны с помощью программы Past (Gower), используя матрицу бинарных состояний наличия или отсутствия амплифицированных фрагментов. UPGMA-дендрограмма построена с помощью TREECON (version 1.3b).

Результаты и заключение. Отобранные 5 ISSR-и 2 RAPD-праймеры продемонстрировали свою эффективность в выявлении генетического полиморфизма изученных образцов. Удалось выявить связь отдельных праймеров с признаками морфологии косточек, формы листовой пластинки, габитуса растений и географического происхождения генотипа. При одновременном включении в анализ всех праймеров и генотипов кластерный анализ не смог сгруппировать клады для образцов *P. pumila* с наличием или отсутствием каких-либо признаков. Самостоятельная клада с достоверной бутстреп-поддержкой (100%) сформировалась только для генотипов систематически близкого вида *P. tomentosa* Thunb., взятых в анализ в качестве внешней группы. Причем внутри этой клады с достоверностью бутстреп-поддержки 86% выявлены различия между генотипами гибридного происхождения видов *P. pumila* × *P. tomentosa* (F₃) и генотипом вида *P. tomentosa*. В селекционных целях на основе данных индексов генетического различия выявлены перспективные родительские пары для улучшения показателей качества плодов и типа кроны.

Ключевые слова: молекулярно-генетические маркеры, морфологические признаки, ISSR-маркеры, RAPD-маркеры, кластеризация.

Background. Studying genetic polymorphism of the *Prunus pumila* L. representatives with a wide range of variability in morphological characters will make it possible to identify promising genotypes with high combining ability for hybridization.

Material and methods. The study covered 39 genotypes from the Chelyabinsk cultivated population and 6 genotypes from Khakassia, with extreme or intermediate expressions of such characters as fruit size, color and shape; stone shape and surface structure; leaf blade serration and shape; plant habitus, and some others. Genetic distances were calculated using the data matrix for binary states of presence (1) or absence (0) of amplified fragments with the Past Program (Gower). The UPGMA dendrograms were obtained in TREECON (version 1.3b).

Results and discussion. The selected 5 ISSR and 2 RAPD primers demonstrated their effectiveness in detecting genetic polymorphism in the studied accessions. In individual cases, a weak connection of separate markers with leaf blade edge serration, stone surface structure, plant habitus, and geographic origin of the genotype was detected. Concurrent inclusion of all primers and genotypes in the cluster analysis failed to group the studied *P. pumila* samples into clades according to the presence/absence of any traits, which may attest to their close genetic affinity. An independent clade with reliable bootstrap support (100%) was formed only for the genotypes of the taxonomically close sp. *P. tomentosa* Thunb., analyzed as an external group. Moreover, this clade manifested (with the 86% reliability of bootstrap support) differences between the hybrid genotypes of *P. pumila* × *P. tomentosa* (F₃) and the genotype of *P. tomentosa*. Parent pairs promising for fruit quality and shrub shape improvement through breeding were identified using the produced indices of genetic distinction.

Key words: molecular genetic markers, morphological characters, ISSR markers, RAPD markers, clustering.

Введение

Вид *Prunus pumila* L. (слива низкая) относится к подсекции *Spiraeopsis* (Koehne) Egem. секции *Microcerasus* Spach рода *Prunus* L. Вид диплоидный ($2n = 16$) (Nizhnikov, 1977; Egegin, 1985; Simagin, 2013).

P. pumila произрастает в Северной Америке, где представлен, по мнению разных исследователей, двумя – четырьмя разновидностями (Egegin et al., 1979; Yushev, 1992; Catling et al., 1999). На территории России и всей Евразии является интродуцированным, изредка признается частично натурализовавшимся видом, особенно благоприятно произрастающим в лесостепных регионах Поволжья, Урала и Сибири (Merker, 2013; Simagin, 2013). *P. pumila* – низкорослый листопадный многоствольный кустарник со стелющимися или косо восходящими побегами от 0,5 до 2 и выше метров в высоту. Листья мелкие, ланцетовидные, кожистые, блестящие. Цветки белые, мелкие. Плод – сочная костянка, обычно округлой, овальной или яйцевидной формы, с черной или почти черной окраской. Иногда встречаются желтоплодные генотипы. Масса плода в пределах 1–3, иногда до 5 и более граммов (Simagin, 2013; Flora of North America..., 2016).

Широкий полиморфизм признаков, свидетельствующий, как правило, о высоком адаптационном потенциале вида, обусловил его неоднозначный культивируемый ареал и разнообразнее использование в любительском садоводстве. По мнению ряда ученых, крупные плоды с хорошим вкусом у представителей культурной популяции могли быть унаследованы от степной западноамериканской разновидности *P. pumila* var. *besseyi* (L.H. Bailey) Wauh, нередко имеющей даже в естественных местообитаниях крупные, хорошего вкуса плоды (Hansen, 1904; Salamatov, 1959; Rohder, 2000).

В большей степени широкое распространение связано с использованием *P. pumila* в качестве подвоя для сортов сливы, абрикоса и реже персика (Putov, Puchkin 1982; Krška et al., 2002; Skvortsov, Kramarenko, 2007). При этом размножение растений происходит в основном семенным способом, что приводит к сильной генетической неоднородности посадочного материала. Ценные в этом отношении признаки «высокорослость» и «пряморослость» растений культурной популяции по мнению ряда авторов могли быть унаследованы от восточноамериканской разновидности *P. pumila* var. *pumila* (Salamatov, 1959; Catling, 1999; Rohrer, 2000; Simagin, 2013).

К таксономическим признакам также нередко относятся признаки косточки. Так, для разновидности *P. pumila* var. *depressa* (Pursh) Bean в естественных условиях отличительным признаком является веретеновидная форма косточки (Catling, 1999; Flora of North America..., 2016). По нашим наблюдениям, в культурной популяции Челябинской области данный признак не выявлен, что может свидетельствовать о неучастии этой разновидности в становлении культурной популяции *P. pumila* (Lezin et al., 2019).

Включение *P. pumila* в молекулярно-генетические исследования и, в частности, использование RAPD- и ISSR-маркеров позволили подтвердить, что изучаемый вид систематически очень близок к видам подрода *Prunophora* (Mowrey, Werner, 1990; Shimada et al., 2000; Bortiri et al., 2001).

Изучение генетического полиморфизма *P. pumila* с помощью ISSR- и RAPD-маркеров позволит определить, насколько в культурной популяции те или иные морфоло-

гические признаки могут свидетельствовать о генетической близости отдельных морфотипов между собой и отличимости от растений с иными признаками. Информация о генетических дистанциях между генотипами – донорами ценных признаков позволит составить перспективные комбинации для селекции, обеспечивающие при меньшем числе гибридных растений максимальный эффект гетерозиса.

Материалы и методы

В молекулярно-генетический анализ для изучения изменчивости вида *P. pumila* включены генотипы, отличающиеся по основным морфологическим признакам (табл. 1): морфотипы кустов; окраска, форма и размер плодов; окраска и консистенция мякоти; степень отделяемости косточки и качество отрыва плода от плодоножки; форма и характер поверхности косточки, форма и зубчатость листовой пластинки, а также хозяйственно ценный показатель – вкус плодов. Всего в опыт включено 45 генотипов, из которых 39 генотипов получены из разных мест в окрестностях г. Челябинска и 6 – из Хакасии от селекционера по косточковым культурам И. Л. Байкалова (с подписью «Б» в названии генотипов). В качестве сравнения в опыт включены 3 генотипа гибридного происхождения между видами *P. pumila* и *P. tomentosa* Thunb. F₂ и следующих поколений, полученных с ДальНИИСХ и Дальневосточной опытной станции ВИР от селекционера д-ра биол. наук В. П. Царенко. В работе использовали молодые свежие листья.

Для выделения ДНК использовали набор NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel, Germany). При выделении ДНК использован SDS-экстрагирующий буфер PL₂ с добавлением β-меркаптоэтанола в концентрации 0,2% в качестве антиоксиданта. Все процедуры выделения ДНК выполняли в соответствии со стандартным протоколом производителя.

Постановку ПЦР проводили на амплификаторе C-1000 (Bio-Rad, USA) в объеме 15 мкл. Реакционная смесь включает 8,6 мкл H₂O; 1,5 мкл 10x Tag-буфер («Евроген», Россия); 1,5 мкл 25 mM MgCl₂; 0,6 мкл dNTPs (5 mM каждого), 0,6 мкл праймер (10 пМ/мкл); 1 ед. HS Tag ДНК-полимеразы (Евроген, Россия); 2 мкл геномной ДНК, разведенной водой до концентрации 10 нг/мкл. Разделение ПЦР фрагментов проводили путем электрофореза в 1,7-процентном агарозном геле с добавлением SYBR Green I в 1x TAE-буфере при удельном напряжении 4 В/см в течение 80 мин, визуализировали под УФ в системе гель-документирования Gel Doc XR+ (BioRad, USA). Использовали маркер молекулярной массы 100 + bp DNA Ladder (Евроген, Россия).

Для амплификации RAPD-праймеров использовали следующий оптимизированный температурный профиль: первичная денатурация при 94°C – 4 мин и 95°C – 1 мин; 40 циклов: денатурация 94°C – 15 с, отжиг праймеров T_a (см. табл. 1) – 25 с, элонгация при 72°C – 120 с; финальная элонгация – 7 мин при 72°C. Для амплификации ISSR-праймеров использовали следующий оптимизированный температурный профиль: первичная денатурация при 94°C – 4 мин и 95°C – 1 мин; 40 циклов: денатурация 94°C – 15 с, отжиг праймеров T_a (см. табл. 1) – 20 с, элонгация при 72°C – 120 с; финальная элонгация – 7 мин при 72°C. Для проверки достоверности полученных ДНК-спектров опыт повторяли.

Характеристики ISSR- и RAPD-праймеров приведены в таблице 2.

Таблица 1. Характеристика образцов, включенных в анализ
Table 1. Characteristics of the accessions included in the analysis

№	Форма	Окраска плода	Масса плода	Форма плода*	Окраска мякоти*	Форма косточки	Характер поверхности косточки	Листовая пластинка	
								Форма*	Зазубренность*
1	Б 9-14	ж	2,82	О	Ж	Яйцевидная	Ровная	Л	Р-П
2	Нёвушка	ж	2,86	-	Ж	-	-	Л	М-П
40	Б 11-11	ч	2,43	ОВ	Ж	Округлая	Ровная	ЛО	М-П
41	Б 11-13	ч	2,23	Я	Ж	Удлиненная	Среднеребристая	ЛО	Т-Г
9	Б 11-14*	ч	2,07	О	Ж	Округлая	Ровная	П-Э	Т-Г
42	Б 13-14	ч	2,49	ОВ	З	Удлиненная	Ровная	П-Э	Т-Г
3	Б 13-18	ч	3,62	Я	Ж	Яйцевидная	Слаборебристая	Л	М-П
5	П 27-51	ч	-	-	-	-	-	ЛО	М-П
20	Н 1-1-3	ч	1,89	С	Б	Удлиненная	Ровная	П-Э	Т-Г
12	Н 1-1-13	ч	3,62	С	З	Округлая	Слаборебристая	Э	Т-Г
21	Н 1-1-23	ч	1,97	ОВ	Б	Эллипсоидная	Слаборебристая	П-Э	Г
28	Н 1-1-26	ч	1,93	Ш-Я	З-Р	Округлая	Слаборебристая	П-Э	Т-Г
15	Н 1-1-31	ч	3,69	О	З	Округлая	Слаборебристая	Э	Т-Г
13	Н 1-1-34	ч	2,00	О	З	Округлая	Ровная	Э	Т-Г
17	Н 1-1-39	ч	2,85	Ш-Я	К	Яйцевидная	Ровная	П-Э	Т-Г
19	Н 1-1-43	ч	2,33	О	Б	Округлая	Ровная	П-Э	Р-П
18	Н 1-1-46	ч	2,1	С	К	Яйцевидная	Слаборебристая	П-Э	Р-П
38	Н 2-1-2	ч	1,01	О	Ж	Округлая	Ровная	Л	Т-Г
31	Н 2-1-6	ч	1,79	О	З-Р	Удлиненная	Ровная	П-Э	Т-Г
6	Н 2-1-10***	ч	2,31	О	Ж	Эллипсоидная	Слаборебристая	П-Э	Т-Г
11	Н 2-1-13**	ч	16,6	ОВ	К	Эллипсоидная	Слаборебристая	ЛО	Р-П
8	Н 2-1-27*	ч	2,30	С	К	Удлиненная	Ровная	П-Э	Р-П
36	Н 2-1-31	ч	4,23	ОВ	З-Р	Эллипсоидная	Ровная	П-Э	Р-П
34	Н 2-1-32	ч	3,82	О	З-Р	Округлая	Среднеребристая	ЛО	Г
30	Н 2-1-53	ч	3,69	Я	З-Р	Округлая	Ровная	Э	Т-Г

Таблица 1. Окончание
Table 1. The end

№	Форма	Окраска плода	Масса плода	Форма плода*	Окраска мякоти*	Форма косточки	Характер поверхности косточки	Листовая пластинка	
								Форма*	Зазубренность*
33	Н 2-1-58	ч	2,58	О	З-Р	Округлая	Ровная	Л	Р-П
29	Н 3-1-1	ч	2,93	О	З	Яйцевидная	Ровная	П-Э	Т-Г
39	Н 3-1-7	ч	1,81	О	Б	Эллипсовидная	Ровная	Э	Т-Г
14	Н 3-1-9	ч	2,28	С	З	Удлиненная	Слаборебристая	Л	Т-Г
10	Н 3-1-14**	ч	2,04	О	З	Округлая	Слаборебристая	П-Э	Т-Г
32	Н 3-1-26	ч	3,03	Ш-Я	З-Р	Округлая	Слаборебристая	П-Э	Т-Г
7	Н 3-1-40*	ч	2,88	О	З-Р	Яйцевидная	Среднеребристая	П-Э	Т-Г
26	Н 4-1-2	ч	3,38	Ш-Я	З-Р	Округлая	Ровная	П-Э	Т-Г
16	Н 4-1-5	ч	3,51	Я	З	Удлиненная	Ровная	П-Э	Т-Г
23	Н 4-1-6	ч	2,41	ОВ	Б	Эллипсовидная	Ровная	П-Э	Т-Г
27	Н 4-1-7	ч	1,90	О	З-Р	Округлая	Ровная	Э	Т-Г
25	Н 4-1-8	ч	2,35	Я	З-Р	Яйцевидная	Ровная	П-Э	Т-Г
22	Н 4-1-17	ч	2,64	О	Б	Эллипсовидная	Слаборебристая	Л	Р-П
24	Н 4-1-19	ч	2,00	С	Б	Эллипсовидная	Слаборебристая	З-Э	Р-П
35	Н 4-1-39	ч	5,15	С	З-Р	Яйцевидная	Слаборебристая	Л	Р-П
4	Н 3-3-21***	ч	2,07	Ш-Я	К	Яйцевидная	Слаборебристая	П-Э	Т-Г
37	VIII 24-9	ч	4,85	-	-	-	-	П-Э	М-П
43	Н 5-3-4	ч	4,5	С	Ж	Обратнойяц.	Ровная	Э	М-П
44	Н 27-2-13	ч	2,25	О	Ж	Обратнойяц.	Ровная	П-Э	Р-П
45	Н 2-2-48	ч	2,43	-	-	-	-	П-Э	М-П

Примечание: **окраска плода**: ж – желтая, ч – черная; **форма плода**: О – округлая, Я – яйцевидная, Ш-Я – широко-яйцевидная, С – сердцевидная, ОВ – овальная; **окраска мякоти**: Ж – желтая, З – зеленая, З-Р – зелено-розовая, К – красная, Б – бордовая; **форма листовой пластинки**: П-Э – продолговато-эллиптическая, Э – эллиптическая, Л – ланцетовидная, З-Р – заостренно-эллиптическая, ЛО – лопатчатая; **зазубренность края листовой пластинки**: Р-П – расставлено-пильчатая, Т-Г – тупогородчатая, Г – городчатая, М-П – мелкопильчатая.
* – карлик; ** – стланец; *** – пирамидальный куст

Note: **fruit color**: ж – yellow, ч – black; **fruit shape**: О – subglobose, Я – ovoid, Ш-Я – broadly ovoid, С – heart-shaped, ОВ – ovate; **pulp color**: Ж – yellow, З – green, З-Р – green-pink, К – red, Б – maroon; **leaf blade shape**: П-Э – oblong-elliptic, Э – elliptic, Л – lanceolate, З-Р – acuminate-elliptic, ЛО – spatulate; **leaf edge serration**: Р-П – sparsely serrate, Т-Г – bluntly serrate, Г – crenulate, М-П – serrulate.
* – dwarf shrub; ** – prostrate shrub; *** – pyramidal shrub

Таблица 2. Характеристика праймеров, использованных для изучения ДНК-полиморфизма образцов *Prunus pumila* L. и *P. tomentosa* Thunb.**Table 2.** Characteristics of primers used for studying DNA polymorphism in *Prunus pumila* L. and *P. tomentosa* Thunb.

Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Наименование праймера	Температура обжига, °С	Число амплифицируемых фрагментов, шт.	Уровень полиморфизма, %	Размер фрагментов ДНК, пн
TGCCGAGCTG	OPA 02	40	9	88,9	600-1550
GAAACGGGTG	OPA 07	40	6	100	650-1400
(AG) ₈ C	UBC 808	60	13	100	350-1700
(CA) ₈ G	UBC 818	60	13	100	450-1450
(CT) ₈ T	UBC 823	60	9	100	800-1700
(AC) ₈ G	UBC 827	60	14	100	400-1500
(AG)8YC	UBC 835	60	11	90,9	200-1300

Для количественной оценки полиморфизма маркеров полученные данные были представлены в виде матрицы состояний бинарных признаков, в которой наличие или отсутствие ПЦР-фрагментов одинакового размера рассматривалось как состояния 1 и 0. Для статистической обработки данных использовали пакет программ TREECON (version 1.3b) (Van de Peer, De Wachter, 1994). Генетические дистанции рассчитывали по методу (Nei, Li, 1979). Для построения дендрограмм применяли метод UPGMA, расчет бутстреп-индексов проводили на 100 псевдорепликах. Для расчета генетических дистанций использовали программу Past 3 (Gower).

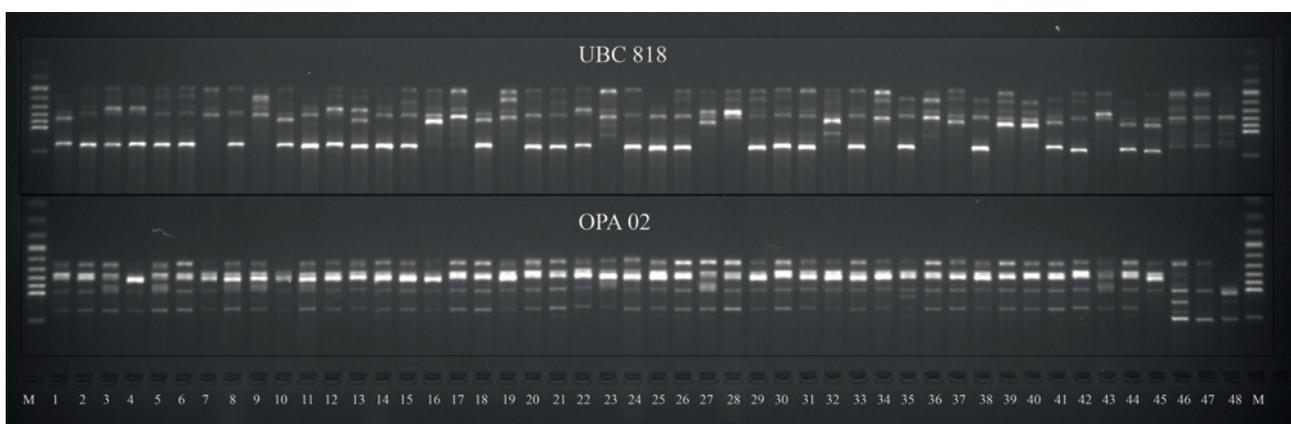
Результаты

После амплификации ДНК из протестированных 13 ISSR- и 12 RAPD-праймеров отобрали для дальнейшего анализа 5 ISSR- и 2 RAPD-праймера как наиболее информативные. После сравнения электрофореграмм, полученных с помощью эффективных праймеров, визуально (в качестве примера на рисунке 1 приведена электрофореграмма с праймерами UBC 818 и OPA 02) выявлен высокий полиморфизм изучаемых образцов (табл. 2). Суммарное число идентифицированных фрагментов –

75, длиной от 200 до 1700 пн. Из них 2 фрагмента не показали полиморфизма, 9 идентифицировали различие между видами *P. pumila* и *P. tomentosa*, но не выявляли различия между отдельными генотипами *P. pumila*. Также идентифицировано 7 редких для вида *P. pumila* фрагментов, образующих или не образующих не выше 5% одинаковых фрагментов. Наибольшее число фрагментов амплифицировалось с праймером UBC 827. В среднем один праймер инициировал 10,7 фрагментов. UPGMA-дендрограмма, построенная на основе 7 эффективных праймеров, представлена на рисунке 2.

Кластерный (UPGMA) анализ достоверно различает генотипы по видовой принадлежности. Все полученные клады в пределах вида *P. pumila* образованы с очень низкой бутстреп-поддержкой; таким образом, различия групп недостоверны. В пределах вида *P. pumila* с очень низкой достоверностью частично удалось различить генотипы по их происхождению. Четыре генотипа из шести (Б 9-14, Б 11-11, Б 11-13, Б 11-14), полученные из Хакасии, образовали самостоятельный субкластер.

По результатам исследования не выявлено тесной связи отдельных фрагментов ISSR- и RAPD-маркеров с морфологическими признаками генотипов *P. pumila*.

**Рис. 1.** Электрофореграмма PCR-ампликонов полученных с ISSR-праймером UBC 818 и RAPD-праймером OPA 02

Примечание: Расшифровка номеров образцов в таблице 1

Fig. 1. Electrophoregram of PCR amplicons obtained with the ISSR primer UBC 818 and RAPD primer OPA 02

Note: See Table 1 for accession number decoding

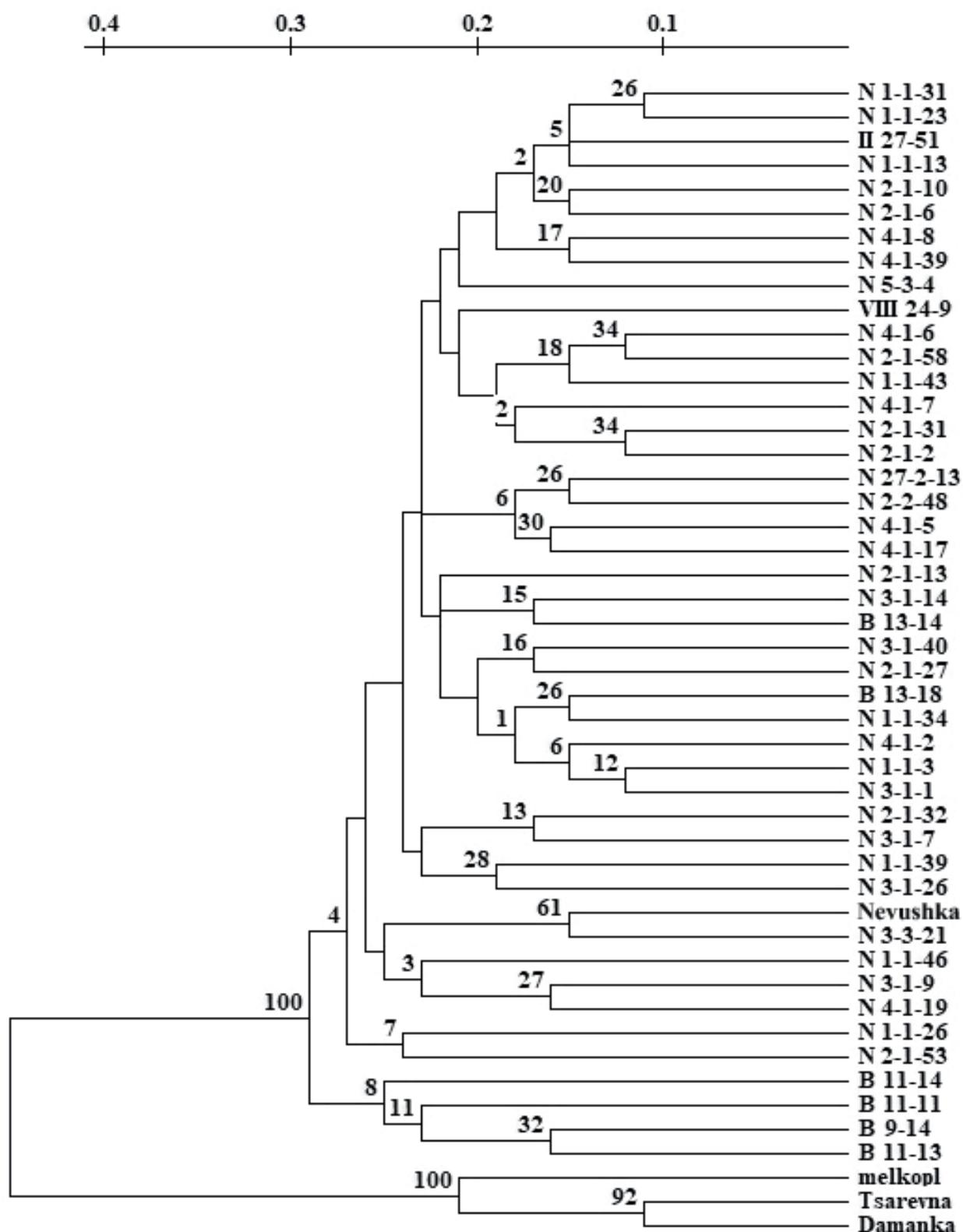


Рис. 2. UPGMA-дендрограмма, построенная по результатам использования 5 ISSR- и 2 RAPD-праймеров с бутстреп-индексами

Fig. 2. UPGMA dendrogram based on the results of using 5 ISSR и 2 RAPD primers with bootstrap indices

Слабая связь прослеживается с амплифицируемыми фрагментами длиной 850 пн праймера UBC 818 и зазубренностью края листовой пластинки. Наличие фрагмента длиной 850 пн всегда совпадало только с тупогородчатым краем листовой пластинки, но при этом из 21 генотипа ступогородчатым краем листовой пластинки ампликон проявился только в восьми случаях. Немного более тесная связь отмечена для праймера UBC 835 с амплифицируемыми фрагментами (ампликоны, бенды) длиной 1100 пн. Бенды проявились только у генотипов с ровной структурой поверхности косточки. Однако среди 19 образцов маркер отметил только 8. Можно также привести примеры с еще меньшей связью: 1) амплифицируемые фрагменты длиной 1400 пн праймера UBC 818 и признак очень плохого отрыва плода от плодоножки (из 6 случаев отмечен 1); 2) амплифицируемые фрагменты длиной 600 пн праймера UBC 818 и слаборбистая поверхность косточки (из 13 случаев отмечено 3). Также частично наблюдается закономерность между наличием фрагментов длиной 920 пн праймера UBC 827 и сильнорослой или пирамидальной формой кроны, а отсутствие – со стланцевой формой кроны. Возможно, этот маркер и имеет более тесную связь с особенностями характера развития растений, но эти особенности могут неправильно трактоваться и вносить определенную путаницу. Для выяснения связи морфологических признаков габитуса растений с проявлением отдельных маркеров были выбраны модельные растения, по которым имеются наиболее достоверные представления об их особенностях становления и проявления габитуса.

Поочередное исключение или включение отдельных праймеров при статистическом анализе позволило установить, что праймеры OPA 02 и UBC 808 вносят наименьший вклад в идентификацию типа крон. Однако их парное исключение из расчетов не повысило качество груп-

пировки клад на UPGMA-дендрограмме и бутстреп-поддержку. При различных комбинациях маркеров прослеживается закономерность, когда первичным критерием кластеризации выступает географическое происхождение, а потом морфологические особенности (рис. 3). На субкластерном уровне наблюдается почти полное выделение в отдельную кладу генотипов из Хакасии, и только на следующем уровне кластеризации во второй кладе наблюдается группировка по их особенностям габитуса. В определении географического происхождения наименьший вклад внес также праймер OPA 02. Немного в большей степени, но также низкий вклад внесли праймеры OPA 07, UBC 823 и UBC 818. Выделение генотипа VIII 24-9 со стланцевой формой кроны челябинской популяции во внешнюю группу свидетельствует об иных более значимых признаках при кластеризации.

Различные комбинации праймеров для генотипов с разной формой и величиной плода не показали никакой зависимости при кластеризации.

Для морфологических признаков косточки удалось подобрать комбинации праймеров, максимально отражающие их распределение при кластеризации. Установлено, что самый большой вклад в группировку генотипов по признакам морфологии косточек обеспечил праймер UBC 823. Максимальная точность и бутстреп-поддержка получена при одновременном использовании праймеров OPA 07, UBC 818, UBC 823 и UBC 835 (рис. 4).

Как показали результаты кластеризации, группа с ребристой поверхностью косточки образована с наибольшей бутстреп-поддержкой.

С некоторыми генотипами иногда наблюдалась группировка по окраске мякоти, по форме листовой пластинки. Но добиться достоверной кластеризации по этому признаку не удалось, вероятно, по причине малой выборки маркеров и отсутствия генотипов, схожих по всем признакам, кроме окраски мякоти. По окраске плода (ге-

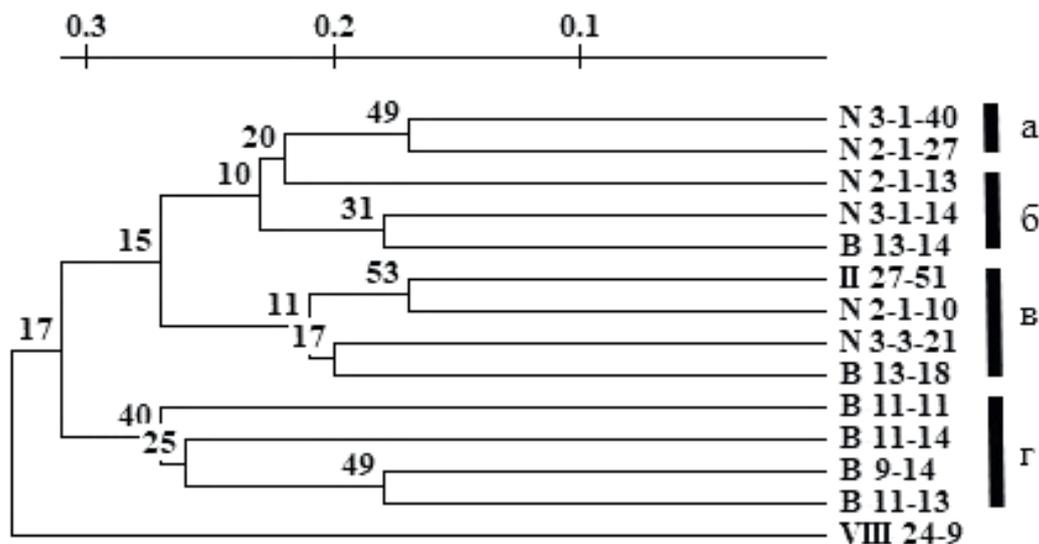


Рис. 3. UPGMA-дендрограмма модельных морфотипов *Prunus pumila* L., построенная без участия праймера OPA 02:

а) шаровидные плотнокустовые карлики; б) стланцы; в) пирамидальные и древовидные кустарники (генотипы из Хакасии отмечены в названии заглавной буквой «В»)

Fig. 3. UPGMA dendrogram of the model *Prunus pumila* L. morphotypes obtained without the use of the OPA 02 primer:

а) globular dense dwarf shrubs; б) procumbent shrubs; в) pyramidal shrubs and arbuscles (genotypes from Khakasia are marked with "B" in the names)

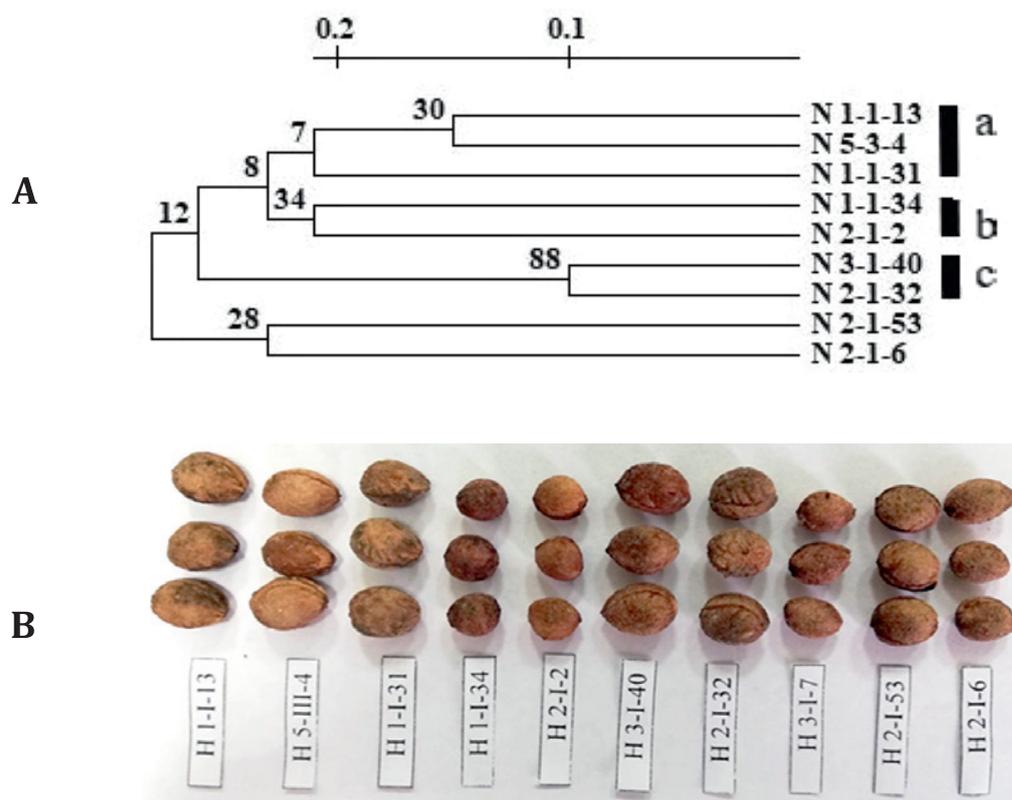


Рис. 4. Степень дифференциации генотипов *Prunus pumila* L. по морфологии косточек: А – генетическая; В – морфологическая.

а – генотипы с вытянутым основанием косточки, б – генотипы с мелкой округлой косточкой, с – генотипы с ребристой поверхностью косточки

Fig. 4. The degree of differentiation among *Prunus pumila* L. genotypes according to the stone morphology: А – genetic, В – morphological.

а – genotypes with an attenuate stone base; б – genotypes with a small subglobose stone; с – genotypes with a costate stone surface

нотипы Б 9-14 и Нёвушка – желтоплодные), степени отрыва плода от плодоножки и отделяемости мякоти от косточки также не удалось выявить зависимость кластеризации при подборе разных комбинаций использованных в работе праймеров.

Для включенных в исследование генотипов *P. pumila* получено 990 значений генетических дистанций: максимальное значение – 0,44, минимальное – 0,11.

Обсуждение результатов исследования

Несмотря на отсутствие достоверных генетических различий между изученными генотипами *P. pumila*, между образцами *P. tomentosa* генетические различия достоверны. Сорта 'Даманка' и 'Царевна' отличаются с высокой бутстреп-поддержкой от формы «мелкоплодная» (см. рис. 2.). Сорт 'Даманка' характеризуется темно-бордовой, почти черной окраской плодов, и из всех генотипов с такой окраской плодов это самый крупноплодный образец (по нашим данным – 2,70 г). Сорт 'Царевна' – один из самых крупноплодных известных сортов *P. tomentosa* (по нашим данным – 3,50 г) (рис. 5). Форма «мелкоплодная» – это генотип с самыми мелкими плодами из известных авторам генотипов (0,64 г). Это значение соотносится с минимальными значениями для вида по литературным данным (Gu et al., 2003). На основе полученных характеристик генотипа можно предположить, что он наиболее близок к диким родичам.

В соответствии с ранее проведенным исследованием (Lezin et al., 2019) изменчивости морфологических признаков плода выявлено, что в изучаемой интродукционной популяции отсутствует признак веретеновидной формы косточки, свойственный разновидности *depressa* в естественных местообитаниях. При этом разновидность *P. pumila* var. *susquehanae* Wildenow, занимающая схожий ареал с разновидностью *depressa*, но с иными экологическими условиями произрастания, также могла не принять участие в формировании культурной популяции *P. pumila*. Данные молекулярно-генетического анализа, не выявившие никакой генетической специфичности внутри вида *P. pumila*, позволяют сделать предположение, что в становлении культурной популяции могли принять участие только морфологически близкие и наиболее ценные в практическом использовании разновидности *besseyi* и *pumila*.

С помощью подбора генотипов и подбора праймеров удалось выявить, что в некоторых случаях наблюдается зависимость группировки генотипов по их морфологическим признакам. Следовательно, такие праймеры низко консервативны и могут иметь ценность при генетической паспортизации доноров хозяйственно ценных признаков и сортов *P. pumila*.

В селекционных целях представляет ценность поиск генотипов, сочетающих в себе высокие вкусовые и иные показатели качества плодов при компактном или пирамидальном типе кроны с прочными скелетными побега-

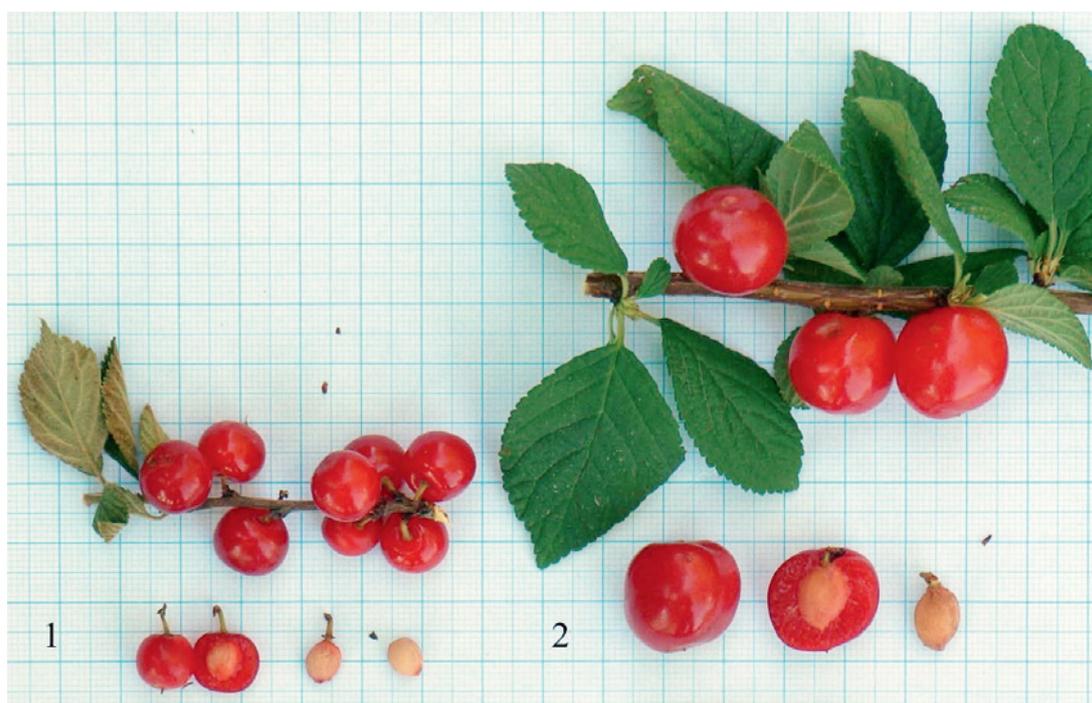


Рис. 5. Величина плода исследуемых форм и сортов *Prunus tomentosa* Thunb.: 1 – мелкоплодная; 2 – ‘Царевна’
Fig. 5. Fruit size in the studied forms and varieties of *Prunus tomentosa* Thunb.: 1 – small-fruited; 2 – ‘Tsarevna’

ми, обеспечивающими максимальную технологичность при уходе за насаждениями. Матрица генетических различий для выдающихся по рассмотренным признакам генотипов, рассчитанная в программе Past 3 (Gower), приведена в таблице 3.

Значения генетических различий желтоплодного генотипа Б 9-14 с выделенными по типу крон генотипами очень близки. Наименее перспективной в этом случае бу-

дет скрещивание с генотипом Б 13-18. В остальных случаях при гибридизации генотипов с требуемым типом кроны и соответствующим качеством плодов наиболее перспективной будет комбинация Б 11-11 × Н 3-3-21 с индексом 0,37. В комбинациях по улучшению качества плодов наиболее успешными будут комбинации Б 9-14 × Н 27-2-13, Б 11-11 × Б 13-14, Б 11-11 × Н 5-3-4, Б 11-11 × Н 2-2-48.

Таблица 3. Индексы генетического различия для перспективных пар скрещиваний
Table 3. Genetic distinction indices for promising pairs in crosses

Генотипы с необходимым типом кроны/качеством плодов	Генотип с хорошим качеством плодов и номер на электрофореграмме						
	Б 9-14 (1)	Б 11-11 (40)	Б 11-13 (41)	Б 13-14 (42)	Н 5-3-4 (43)	Н 27-2-13 (44)	Н 2-2-48 (45)
Б 13-18 (3)	0,24	0,28	0,24	0,24	0,16	0,25	0,19
Н 3-3-21 (4)	0,28	0,37	0,25	0,23	0,28	0,27	0,28
Н 27-51 (5)	0,29	0,25	0,19	0,19	0,21	0,17	0,19
Н 2-1-10 (6)	0,29	0,31	0,24	0,24	0,21	0,25	0,27
Б 11-11 (40)	0,28	0,00	0,17	0,31	0,31	0,29	0,31
Б 11-13 (41)	0,16	0,17	0,00	0,24	0,24	0,23	0,27
Б 13-14 (42)	0,24	0,31	0,24	0,00	0,24	0,28	0,24
Н 5-3-4 (43)	0,27	0,31	0,24	0,24	0,00	0,23	0,21
Н 27-2-13 (44)	0,31	0,29	0,23	0,28	0,23	0,00	0,15
Н 2-2-48 (45)	0,27	0,31	0,27	0,24	0,21	0,15	0,00

Заключение

Кластерный (UPGMA) анализ достоверно различает генотипы по видовой принадлежности (*P. pumila*, *P. tomentosa*). Все полученные клады в пределах вида *P. pumila* образованы с очень низкой бутстреп-поддержкой. Таким образом, различия групп недостоверны.

По результатам исследования не выявлено тесной связи отдельных фрагментов ISSR- и RAPD-маркеров с морфологическими признаками генотипов *P. pumila*. В некоторых случаях наблюдается группировка отдельных генотипов со схожими морфологическими признаками.

При различных комбинациях маркеров прослеживается закономерность, когда первичным критерием кластеризации выступает географическое происхождение, а потом – морфологические особенности.

На основе индексов генетического различия выделены перспективные пары для гибридизации на улучшение вкусовых качеств плодов: Б 9-14 × Н 27-2-13, Б 11-11 × Б 13-14, Б 11-11 × Н 5-3-4, Б 11-11 × Н 2-2-48. На улучшение вкусовых качеств плодов и типа кроны выделена перспективная комбинация для гибридизации Б 11-11 × Н 3-3-21 с наибольшим индексом генетического различия 0,37.

References / Литература

- Bortiri E., Oh S.H., Jiang J., Bagett S., Granger A., Weeks C. et al. Phylogeny and systematics of *Prunus* (Rosaceae) as determined by sequence analysis of ITS and the chloroplast trnL-trnF spacer DNA. *Systematic Botany*. 2001;26:797-807. DOI: 10.1043/0363-6445-26.4.797
- Catling P.M., McKay-Kuja S.M., Mitrow G. Rank and typification in North American dwarf cherries, and a key to the taxa. *Taxon*. 1999;48(3):483-488. DOI: 10.2307/1224559
- Eremin G.V. Remote hybridization of stone fruit plants (Otdalennaya gibridizatsiya kostochkovykh plodovykh rasteniy). Moscow: Agropromizdat; 1985. [in Russian] (Еремин Г.В. Отдаленная гибридизация косточковых плодовых растений. Москва: Агропромиздат; 1985).
- Eremin G.V., Yushev A.A., Novikova L.N. The investigation of the species of the genus *Microcerasus* Webb emend Spach in connection with their utilization in breeding. *Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding*. 1979;65(3):70-86. [in Russian] (Еремин Г.В., Юшев А.А., Новикова Л.Н. Исследование видов рода *Microcerasus* Webb emend Spach в связи с их селекционным использованием. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 1979;65(3):70-86).
- Flora of North America: North of Mexico. Vol. 9. Magnoliophyta: Picramniaceae to Rosaceae. Oxford, UK: Oxford University Press; 2016.
- Gu C., Li C., Lu L., Jiang S., Alexander C., Bartholomew B., Brach A.R., Boufford D.E., Ikeda H., Ohba H., Robertson K.R., Spongberg S.A. Rosaceae A. L. Jussieu. In: Wu Z.Y., Raven P.H., Hong D.Y. (eds). *Flora of China*. Vol. 9 (*Pittosporaceae* through *Connaraceae*). Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press; 2003. p.46-434.
- Hansen N.E. The western sand cherry. Brookings, SD: South Dakota Agricultural College Experiment Station; 1904.
- Krška B., Oukropec I., Mařák J. The possibilities of propagation of the rootstock of *Prunus pumila* L. 'Pumiselekt' by hardwood cuttings. *Acta Horticulturae*. 2002;658:647-649. DOI: 10.17660/ActaHortic.2004.658.98
- Lezin M.S., Simagin V.S., Lokteva A.V. Specific features in the expression intraspecies variability of *Prunus pumila* fruits in Chelyabinsk Province in the process of introduction. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2019;180(3):82-90. [in Russian] (Лёзин М.С., Симагин В.С., Локтева А.В. Особенности проявления внутривидовой изменчивости плодов *Prunus pumila* в Челябинской области при интродукционном процессе. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2019;180(3):82-90). DOI: 10.30901/2227-8834-2019-3-82-90
- Merker V.V. Invasive and potentially invasive species of dendroflora of introduced the Chelyabinsk area. In: *Integration of botanical research and education: traditions and prospects: Proceedings of the International Scientific Conference devoted to the 125th anniversary of the Department of Botany (Integratsiya botanicheskikh issledovaniy i obrazovaniya: traditsii i perspektivy. Trudy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, posvyashchennoy 125-letiyu kafedry botaniki)*. Tomsk: Tomsk State University; 2013. p.115-117. [in Russian] (Меркер В.В. Инвазивные и потенциально инвазивные виды интродуцированной дендрофлоры Челябинской области. В кн.: *Интеграция ботанических исследований и образования: традиции и перспективы. Труды Международной научно-практической конференции, посвященной 125-летию кафедры ботаники*. Томск: Томский государственный университет; 2013. С.115-117).
- Mowrey B.D., Werner D.J. Phylogenetic relationships among species of *Prunus* as inferred by isozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 1990;80(1):129-133. DOI: 10.1007/bf00224026
- Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76(10):5269-5273. DOI: 10.1073/pnas.76.10.5269
- Nizhnikov V.S. On the taxonomy of *Cerasus pumila* (L.) Michx. and *C. besseyi* (Bailey) Lunell (Rosaceae) (O taksonomii *Cerasus pumila* (L.) Michx. i *C. besseyi* (Bailey) Lunell (Rosaceae)). *Botanicheskii zhurnal = Botanical Journal*. 1977;62(4):533-536. [in Russian] (Нижников В.С. О таксономии *Cerasus pumila* (L.) Michx. и *C. besseyi* (Bailey) Lunell (Rosaceae). *Ботанический журнал*. 1977; 62(4):533-536).
- Putov V.S., Puchkin I.A. *Cerasus besseyi* (Bailey) Lunell for breeding clone stocks of plum in Western Siberia (Vishnya peschanaya dlya seleksii klonovykh podvoev slivy v Zapadnoy Sibiri). *Scientific and Technical Bulletin of the N.I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry*. 1982;123:48-50. [in Russian] (Путов В.С., Пучкин И.А. Вишня песчаная для селекции клоновых подвоев сливы в Западной Сибири. *Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства им. Н.И. Вавилова*. 1982;123:48-50).
- Rohrer J.R. The sand cherry in Wisconsin and neighboring States. *The Michigan Botanist*. 2000;39(4):59-69.
- Salamatov M.N. Cherries in Western Siberia (Vishnya v Zapadnoy Sibiri). Novosibirsk; 1959. [in Russian] (Саламатов М.Н. Вишня в Западной Сибири. Новосибирск; 1959).
- Shimada T, Hayama H, Nishimura K, Yamaguchi M., Yoshida M. The genetic diversities of 4 species of subgenus *Lithocerasus* (*Prunus*, Rosaceae) revealed by

RAPD analysis. *Euphytica*. 2001;117:85-90. DOI: 10.1023/A:1004193327542

Simagin V.S. Introduction research results on stone fruit plants (Itogi introduktsionnykh issledovaniy po kostochkovym plodovym rasteniyam). In: I.Yu. Koropachinskii, A.B. Gorbunov (eds). *Introduction of unconventional fruit, berry and vegetable plants in Western Siberia (Introduktsiya netraditsionnykh plodovykh, yagodnykh i ovoshchnykh rasteniy v Zapadnoy Sibiri)*. Novosibirsk: GEO; 2013. p.8-23. [in Russian] (Симагин В.С. Итоги интродукционных исследований по косточковым плодовым культурам. В кн.: *Интродукция нетрадиционных плодовых, ягодных и овощных растений в Западной Сибири* / под ред. И.Ю. Коропачинского, А.Б. Горбунова. Новосибирск: GEO; 2013. С.8-23).

Skvortsov AK, Kramarenko LA. The apricot in Moscow and Moscow Province (Abrikos v Moskve i Podmoskovye).

Moscow: KMK; 2007. [in Russian] (Скворцов А.К., Крамаренко Л.А. Абрикос в Москве и Подмосковье. Москва: КМК; 2007).

Van de Peer Y., De Wachter R. TREECON for Windows: software for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Bioinformatics*. 1994; 10(5):569-570. DOI: 10.1093/bioinformatics/10.5.569

Yushev AA. Volume and systematics of the genus *Cerasus* Mill. as well as breeding use of specific potential in cherries. *Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding*. 1992;146:16-26. [in Russian] (Юшев А.А. Объем и систематика рода *Cerasus* Mill. и селекционное использование видового потенциала вишен. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 1992;146:16-26).

Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of financial activities

Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

The authors declare the absence of any financial interest in the materials or methods presented.

Для цитирования / How to cite this article

Лёзин М.С., Асбаганов С.В. Морфологический и генетический полиморфизм интродукционной популяции *Prunus pumila* L. в Челябинской области. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2021;182(1):142-152. DOI: 10.30901/2227-8834-2021-1-142-152

Lezin M.S., Asbaganov S.V. Morphological and genetic polymorphism of the introduced population of *Prunus pumila* L. in Chelyabinsk Province. Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 2021;182(1):142-152. DOI: 10.30901/2227-8834-2021-1-142-152

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация / Additional information

Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2021-1-142-152>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employer

Авторы одобрили рукопись / The authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

ORCID

Lezin M.S. <https://orcid.org/0000-0002-1422-4983>

Asbaganov S.V. <https://orcid.org/0000-0002-7482-7495>