УДК 575:631.523:634.75:634.37

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИКО-ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ОЦЕНОК ГЕНОФОНДА ПЛОДОВЫХ И ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР В СЕЛЕКЦИИ

Гаджиева А.Ф., Ахундова Н.И., Гасанов Н.А.

Институт генетических ресурсов Национальной академии наук Азербайджана, Баку, e-mail: gadjieva-aynura@rambler.ru

Методическим подходом к изучению био-генетико-цитологического разнообразия генофондной коллекции унаби и земляники служило исследование геномов различных сортов и форм собранного генофонда, цитологические исследования числа хромосом. Цель исследования – изучение цитогенетических особенностей различных сортов для использования их в селекционных работах. Установлено, что в геномах различных сортов унаби имеет место количественное изменение содержания ДНК и РНК, изменение структуры ДНК хроматина, доли различных фракций ДНК. Показано, что стародавние сорта, как местные, так и интродуцированные, характеризуются пониженным содержанием ДНК в клетке сравнительно с новыми селекционными сортами. Предположительно, у стародавних сортов в процессе эволюции выработались механизмы регуляции, позволяющие им обходиться меньшим количеством ДНК за счет сброса повторов. Отмечены также различия в упаковке хроматина и доле лабильной, стабильной и остаточной фракции ДНК. Эти факты свидетельствуют о некоторой нестабильности и пластичности новых сортов и гибридов унаби. На основании показателя РНК/ДНК, разницы в содержании и синтезе ДНК и РНК выявлены высоко-, средне- и малоустойчивые к солевому и осмотическому стрессу сорта земляники. Установлена взаимосвязь между высоким содержанием ДНК, РНК, лабильной и стабильной фракции ДНК хроматина и устойчивостью к соли и засухоустойчивости образцов. Коллекции земляники и унаби по числу хромосом полиморфны, состоят из диплоидных, триплоидных, тетраплоидных, гексаплоидных и октаплоидных образцов. На основании данных созданы 3 новых крупноплодных сорта унаби и соле- и засухоустойчивые формы земляники.

Ключевые слова: генофонд, коллекция, унаби, земляника, геном, ДНК, РНК, хромосомный комплекс

USE OF GENETIC AND CYTOLOGICAL ASSESSMENTS OF THE GENE POOL OF FRUIT AND BERRY CROPS IN BREEDING

Gadzhieva A.F., Akhundova N.I., Gasanov N.A.

Genetic Resources Institute of ANAS, Baku, e-mail: gadjieva-aynura@rambler.ru

Genetic and cytological diversity of varieties of jujube and straw berry collections were studied. Differences of genomes of various varieties of jujube were determined. Ancient varieties are characterized by lowered content of the DNA and structured DNA compared to new varieties. Apparently, these varieties during the process of evolution worked out mechanisms of regulation allowing them to sustain with less amount of the DNA at the expense of reset of repetitions. The new varieties are characterized by high amplitude of inter-variety oscillations according to the DNA synthesis. Differences between these groups according the DNA synthesis in the mitochondrial and chloroplast systems were noted. The gene fund of strawberry is represented by varieties with different paces of the DNA and RNA synthesis. High content of the DNA and RNA characterize varieties, which are highly resistant to the salt and osmotic stresses. Low content testify about low stress resistance of varieties, while intermediate content about medium resistance. Collections of jujube and strawberry are polymorphic according to number of chromosomes are represented by diploid, triploid, tetraploid and hexaploidand samples. Two new local large-fruit varieties of jujube were created. Stress resistant forms of strawberries were singled out.

Keywords: collection, jujube, strawberry, genome, DNA, RNA, chromosome complex

Почвенно-климатические условия республики включают многие климатические зоны [1–3]. Из них 60% территорий занимает зона субтропиков. Здесь возможно выращивание традиционных культур умеренного пояса: яблони, груши, сливы, земляники, смородины и др. [4, 5]. Но с давних времен эти и сугубо субтропические культуры выращиваются, плодоносят в зоне сухих субтропиков.

В последнее время усилился интерес к возделыванию культуры земляники. Местный ассортимент крупноплодных сортов этой культуры невелик.

В республике издавна возделывается ценное субтропическое растение унаби (*Zizyphus jujube Mill*). Местный ассортимент этой культуры был представлен в основном мелкими и среднекрупными сортами. После ввоза в прошлом веке крупноплодных сортов – интродуцентов началась работа по созданию новых местных крупноплодных сортов, адаптированных к условиям республики. Возникла необходимость создания генофонда этих культур, изучения их фенотипа, биохимических анализов, роста, развития и плодоношения в зоне сухих субтропиков [6–8].

В наше время генофонд растений изучается и на уровне исследования особенностей как фено- так и генотипа, исследования геномов, комплекса хромосом образцов. Эти работы помогут создать новые местные сорта, учитывая сбалансированность их геномов и перенос во время гибридизации генов от родителей [9–11].

Материалы и методы исследования

В работе использовались:

1) сорта, формы, гибриды в генофонде земляники (55 образцов);

2) сорта, формы, гибриды унаби (36 образцов).

Работа заключалась в изучении как фенотипических признаков образцов генофондов, их биохимических особенностей, так и генотипов, синтеза ДНК, РНК, структурного состояния ДНК хроматина в ядерной генетической системе, исследования комплекса хромосом образцов. Содержание ДНК в клетке велось спектрофотометрически методом фракционирования ДНК, воздействием на хроматин растворами разной ионной силы. Изучение фенологических особенностей сортов проводилось методом сравнительной характеристики.

В основу метода фракционирования положен принцип ступенчатого воздействия на хроматин факторами депротеинизации.

Цитологические анализы проводились по общепринятой для плодовых культур методике. Материал окрашивали гематоксилином. Определение содержания фракции проводилось на свежем листовом материале методом центрифугирования и дальнейшего спектрофотометрирования.

Контроль генетической устойчивости к солевому стрессу (0,2 М NaCL) и осмотическому стрессу (Пег-0,5 атм) заключался в изучении восстановительных особенностей синтеза ДНК и структуры ДНК хроматина [12, 13].

Полученные данные позволяют охарактеризовать генофонд культур, по генетико-цитологическим показателям, это дает возможность использовать их в селекционных работах при создании новых перспективных сортов [3, 4, 6, 9].

Результаты исследования и их обсуждение

В Институте собрана генофондная коллекция земляники, включающая как местные сорта и формы, так и интродуцированные сорта различного географического происхождения. Образцы различаются по темпам роста и развития, срокам урожайности, величине и вкусу, цвету плодов и некоторым биохимическим показателям. По величине и массе плодов все сорта делятся на мелко-, средне- и крупноплодные. Величина плодов, их фенотип, содержание хлорофилла и сахара – сорта полиморфны.

Исследование характера роста, развития, фенотипов, а также генетические анализы: биосинтеза ДНК и РНК, комплекса хромосом выявили полиморфность [14] у различных образцов земляники в коллекции как по фенотипу, так и по генотипу (табл. 1).

Исключение составили два сорта: гибрида канадской селекции Кавальер и Реддекоут в одной комбинации скрещивания (Sparki x Valentayn), которые характеризуются схожим характером синтеза ДНК. Очевидно, здесь имеет место сходство ДНК родителей, что привело к высокому сходству структуры их геномов. Остальные исследованные сорта отличаются между собой по интенсивности синтеза ДНК, содержанием лабильной фракции от 2,38 мг/100 г у сорта Лермонтовская до 13,02 мг/100 г у сорта Дильбер. Анализ фракционного состава ДНК хроматина в ядерном геноме также выявил сходство и в фракционном состоянии ДНК хроматина у сортов Кавальер и Реддекоут (6,69 мг/100 г – 6,39 мг/100 г), довольно значительную разницу по содержанию лабильной фракции ДНК с других сортов от 0,07 мг/100 г у сорта Лермонтовская до 9,09 мг/100 г у сорта Дильбер, что свидетельствует о полиморфности этого показателя.

Учитывая, что в республике климат характеризуется частыми засухами, высокой температурой, наличием засоленных почв, отбор и создание засухоустойчивых и солеустойчивых сортов земляники имеет большое значение.

Реакция ядерной генетической системы выявила усиление экспрессии генов, увеличение функциональной активности у устойчивых к стрессам сортов земляники (табл. 2).

Таблица 1

Структурное состояние ДНК хроматина у различных сортов земляники

№	Сорта и формы	Фракции ДНК, мг на 100 г			ДНК общее, мг на 100 г	Лаб/стаб
		лабильная	стабильная	остаточная		
1	Кавальер	2,88	2,19	1,62	6.69	1,30
2	Реддекоут	2,45	2,93	1,01	6.39	0,93
3	Лермонтовская	0,07	0,72	1,59	2.38	0,88
4	Гибрид 237	6,40	2,07	1,06	9.5	3,1
5	Дильбер	9,09	2,14	1,79	13.03	4,3

Таблица 2

Изменение синтеза ДНК у стрессоустойчивых сортов земляники в ядерно-генетической системе

№	Сорта и формы	ДНК фракции				Устойчивость к стрессам
		Лабильная мг/100 г	Стабильная мг/100 г	Остаточное мг/100 г	Общее мг/100 г	
1	Кавальер	2,88	2,19	1,62	6,69	Высокоустойчивый
	NaCE	3,43	3,52	2,65	9,60	
	PEQ	3,85	4,73	2,76	11,34	
2	Реддекоут	2,46	2,93	1,01	6,39	Среднеустойчивый
	NaCE	2,53	3,77	1,33	7,63	
	PEQ	1,28	1,06	0,58	7,63	
3	Гибрид	6,40	2,07	1,06	9,53	Неустойчивый
	NaCE	4,18	2,20	0,66	7,04	
	PEQ	3,59	1,33	0,33	5,25	

Таблица 3

Комплекс хромосом различных сортов земляники в генофондной коллекции

№	Сорта и формы	Происхождение страна	Число хромосом, 2п Число клеток
1	Боровицкая	Россия, гибрид	28 (18), 42 (1), 56 (2)
2	Реддекоукт	Канада, гибрид	42 (16), 56 (3)
3	Волгоградская	Россия, гибрид	42 (15)
4	Дильбер	Узбекистан, форма	42 (19)
5	Ельшанка	Россия, гибрид	42 (20)
6	Берюлевская	Россия, гибрид	42 (22)
7	Оранжевая	Россия, гибрид	28 (14)
8	Кармен	Казахстан, форма	14 (2), 42 (11), 56 (1)
9	Кавальер	Канада, гибрид	56 (5), 42 (4)
10	Ташкентская	Узбекистан, форма	42 (10)
11	Шунтукская	Северный Кавказ, гибрид	42 (23)
12	Пионерка	Россия, гибрид	42 (10), 56 (7)
13	Олег Кошевой	Россия, форма	42 (17)
14	Машук	Россия, форма	42 (11), 56 (4)

Реакция генетической системы ядра выявила и снижение ДНК, РНК, показателя лабильной фракции ДНК хроматина, РНК/ДНК у стрессонеустойчивых сортов. В данном случае речь идет об изучении синтеза нуклеиновых кислот в качестве генетического маркера.

Цитологический анализ образцов генофонда земляники свидетельствовал, что генофондная коллекция земляники, включающая сорта различного происхождения, по комплексу хромосом полиморфна (табл. 3).

В Институте создана и пополняется генофондная коллекция плодовой культуры унаби, включающая местные, стародавние [3], новые сорта и гибриды, интродуцированные, в основном селекционные сорта [4].

Образцы генофонда унаби полиморфны по фенотипам, от очень крупноплодных до мелких, также обладают различными генотипами (табл. 4).

Данные свидетельствуют о полиморфности величины плодов различных сортов, от мелких до крупных. Но часть местных стародавних сортов мелкоплодных в сравнении с новыми по содержанию ДНК в клетках (0,372–0,485 пг) – разница составляет 23,5% –уступают крупноплодным, интродуцированным (0,505–1,06 пг) – разница 52,5%.

Геномы новых сортов содержат больше ДНК, что необходимо для кодирования белков клетки.

У стародавних сортов Таян-цзао и трех местных стародавних сортов народной селекции содержание лабильной фракции

составляет соответственно 0,247; 0,231; 0,286; 0,293 пг в клетке, здесь имеет место незначительная амплитуда колебания этого показателя. У новых селекционных, интродуцированных сортов этот показатель резко колеблется от 0,203 пг у сорта Даргомский, 0,480 пг у сорта Южанин, 0,563 пг у сорта Таджикский до 0,960 пг у сорта Вахш.

По содержанию стабильной фракции отмечается аналогичная картина. Колебания содержания стабильной фракции ДНК у четырех стародавних сортов незначительны – от 0,119 пг у сорта Азербайджан до 0,142 пг у сорта Ширван. Этот же показатель у новых сортов колеблется от 0,076 мг у сорта Вахш до 0,288 пг у сорта Даргомский. Этот факт свидетельствует, что, очевидно, у стародавних сортов существует механизм регуляции, позволяющий обходиться меньшим количеством ДНК за счет сброса повторяющейся некодируемой части генома. У гибридов и новых селекционных сортов увеличение содержания ДНК в клетке говорит о существовании механизмов регуляции, способствующих увеличению количества ДНК в клетке, приводящих к образованию копий генов или повторов. На данный момент функцию «избыточной» ДНК связывают с повторяющимися последовательностями. Для культуры унаби, очевидно, срок эволюционных процессов сортов имеет значение.

У стародавних сортов (с 1 по 4 в таблице) показатель изменчивости генома имеет малый разброс в пределах 1,9–2,1, в то время как у новых селекционных сортов, часто гибридного происхождения, этот показатель имеет очень широкую амплитуду колебания – от 0,7 у сорта Даргомский до 12,6 у сорта Вахш. Это свидетельствует об определенной нестабильности, несбалансированности этих новых сортов, их изменчивости, большей пластичности, чем стародавние сорта. Сброс содержания ДНК у стародавних сортов идет в основном за счет утраты эухроматина.

Унаби по комплексу хромосом относится к полиморфным растениям. Коллекция включает диплоидные, триплоидные (часто бессемянные или мягкосемянные образцы), тетраплоидные и пентаплоидные. В коллекции в большинстве образцов, особенно местного происхождения, в хромосомном наборе основное число составляет 24 хромосомы. Однако у нового местного селекционного крупноплодного сорта Хурмаи (районирован), созданного нами путем гибридизации местного мелкоплодного сорта ♀Апшеронский (2n = 24) с крупной косточкой и бессемянным интродуцентом триплоидным сортом ♂Таян-цзао, при цитологическом анализе Хурмаи отмечено наряду с клетками 2n = 24 хромосомы и появление триплоидных клеток 2n = 36 хромосом с тонкой косточкой в плоде, что свидетельствует о влиянии у отцовского родителя, мягко- и бессемянного сорта Таян-цзао.

Использование полученных данных помогло создать и выделить новые перспективные сорта унаби: Хурмаи (районирован), Нурана и Новруз крупноплодные сорта переданы в сортоиспытание, новый гибридный раннеспелый сорт Зогалы консервного назначения, а также соле- и засухоустойчивые сорта земляники, отобранные по показателям ДНК и фракции ДНК хроматина, выступающие в качестве генетических маркеров. Эти сорта могут заменить стрессонеустойчивые.

Таблица 4

Содержание ДНК и РНК в листьях местных стародавних сортов, форм и крупноплодных интродуцированных сортов унаби

№	Сорта и формы	Число хромосом, 2n	РНК	ДНК	РНК/ДНК
			Пг на одну клетку		
1	Азербайджан местный мелкоплодный	24	9,135 ± 0,5	0,372 ± 0,01	24,5
2	Местный 2 Ширван	24	6,230 ± 0,2	0,442 ± 0,02	14,1
3	Местный 5 Апшеронский	24	11,4 ± 0,33	0,465 ± 0,02	24,5
4	Таян-цзао	24; 28; 36	6,523 ± 0,2	0,389 ± 0,03	16,7
5	Даргомский	24; 20; 48	10,409 ± 0,37	0,505 ± 0,05	20,5
6	Юбилейный	24; 20; 28; 36	6,73 ± 0,26	0,687 ± 0,04	9,7
7	Таджикский	24	8,961 ± 0,30	0,693 ± 0,10	12,9
8	Вахш	24	11,630 ± 0,08	1,060 ± 0,08	10,9
9	Южанин	24	9,715 ± 0,50	0,634 ± 0,09	15,3

Выводы

1. Образцы земляники и унаби в генофонде представлены сортами и формами с разными фенотипическими, генотипическими показателями и разнообразным комплексом хромосом. Коллекции полиморфны по фено- и генопоказателям.

2. Генофонд унаби состоит из стародавних и новых сортов. Стародавние сорта характеризуются пониженным содержанием ДНК в клетках по сравнению с новыми сортами. Возможно, этот факт свидетельствует об образовании копии генов у новых сортов и говорит об экологической зависимости сортов унаби.

3. Нуклеиновые кислоты представляют одно из главных определяющих звеньев в регуляции многих процессов, являясь генетическим тестом. Образцы характеризуются разными генотипами.

4. Генофонды земляники и унаби состоят из образцов диплоидных, триплоидных, тетраплоидных, гексаплоидных и октоплоидных. Генофонд полиморфен.

5. Использование полученных традиционных и генетико-цитологических данных помогло создать соле- и засухоустойчивые сорта земляники и выделить новые перспективные крупноплодные сорта унаби, проходящие испытание и районированные.

Список литературы

1. Ахундова Н.И. Сбор и изучение коллекции унаби и фейхоа на Апшеронском полуострове // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. М., 2013. С. 19–21.

2. Ахундова Н.И., Галиева Х.А. Морфофизиологические и цитогенетические особенности унаби в Азербайджане // XVII Международный симпозиум «Нетрадиционное растениеводство. Селекция. Охрана природы. Эниология. Экология и здоровье» (г. Алушта, 13–21 сентября 2008 г.). Симферополь, 2008. С. 437–439.

3. Тагиев Г.М. Новые селекционные сорта унаби в Азербайджане // Сухие субтропические культуры. Тбилиси, 1981. С. 186–187.

4. Сандалова М.В. Перспективы селекции ремонтантных и нейтрально-дневных сортов земляники садовой // Аграрная наука – сельскому хозяйству. 2013. С. 203–205.

5. Шабанова Е.А. Цитогенетический анализ как метод оценки стабильности генетического материала местных древесных растений в культуре тканей // Состояние лесов и актуальные проблемы лесоуправления. 2013. С. 234–237.

6. Боронникова С.В., Васильева Ю.С., Жуланов А.А., Пришнивская Я.В. Нуклеотидный полиморфизм адаптивно значимых генов-кандидатов в популяциях *Larix sibirica* Ledeb. Урала. Генетика. М., 2017. Т. 53. № 5. 9 с.

7. Дубровский М.Л., Лыжин А.С., Вван-Ункан Н.Ю. Получение и отбор генотипов плодово-ягодных культур с измененным уровнем плоидности // Методика. Мичуринск: ВНИИ ГиСпР, 2013. 52 с.

8. Смирнов А.В. Моделирование наследственной изменчивости расчетных признаков. Изд. ТСХА, 2013. № 6. С. 77–79.

9. Ямских И.Е., Куцев М.Г. Полиморфизм популяций *Anemole bailensis* на основе морфологических данных // Турчзаминовье. 2012. Вып. 15. № 4. С. 82–89.

10. Дунаева С.Е., Антонова О.Ю., Швачко Н.А., Гавриленко Т.А. Сохранение генетического разнообразия вегетативно размножаемых культур растений в контролируемых условиях среды в ВИР // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2012. Вып. 169. С. 245–256.

11. Муллагулов Р.Ю. Использование параметров генетической структуры природных популяций растений в выборе принципов охраны // Актуальные проблемы генетики и молекулярной биологии в рамках фестиваля науки. 2012. С. 19.

12. Bray E.A. Molecular responses to water deficit. Plant Physiol. 1993. Vol. 103. P. 1035–1040.

13. Zhu J.K. Salt and drought stress signal transduction in plants. Annu. Rev.Plant Biol. 2002. Vol. 53. P. 247–273.

14. Разин С.В., Быстрицкий А.А. Хроматин; упакованный геном. БИНОМ Лаб. знаний. 2013. 172 с.