

На правах рукописи

Савельева Екатерина Николаевна

**ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ РОДА *MALUS* MILL.
(ЯБЛОНЯ) С ПОМОЩЬЮ ДНК-МАРКЕРОВ**

Специальность 03.02.07 генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2016

Работа выполнена в лаборатории генетических проблем идентификации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, заведующий лабораторией генетики растений, заместитель директора по науке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва
КУДРЯВЦЕВ Александр Михайлович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, старший научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения Главный ботанический сад им. Н. В. Цицина Российской академии наук, г. Москва
ШАНЦЕР Иван Алексеевич

кандидат биологических наук, научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта Российской академии наук, г. Москва
МЕЛЬНИКОВА Наталия Владимировна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур, г. Орел

Защита состоится «24» мая 2016 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, ГСП-1, г. Москва, ул. Губкина, 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru, тел. 8-499-135-14-31, электронный адрес отдела аспирантуры: aspirantura@vigg.ru

Автореферат разослан «_____» _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Синельщикова Татьяна Аркадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Яблоня (*Malus* Mill.) является одной из древнейших плодовых культур. Род *Malus* очень разнообразен по морфологии, виды представляют собой непростую систему экотипов, форм, вариаций (Li, 1996). Уточнение видового состава и генетической структуры рода *Malus* позволит дать более четкую оценку его потенциала для селекции яблони, в частности при поиске новых источников генов устойчивости к различным заболеваниям. На территории Российской Федерации имеются богатые коллекции образцов рода *Malus*, включающие различные виды, гибриды рода *Malus* и сорта яблони вида *M. domestica*, а также сорта народной селекции Антоновки. Материал данных коллекций в целом хорошо отражает природное разнообразие рода *Malus*, может быть использован для изучения его генетического разнообразия и филогении, а также поиска ценного в селекционном отношении материала.

Степень разработанности темы исследования. Исследованиям, направленным на изучение генетического разнообразия и филогению рода *Malus*, посвящено множество работ как в отечественной (Forte *et al.*, 2002; Nikiforova *et al.*, 2013), так и международной литературе (Phipps *et al.* 1990; Hokanson *et al.*, 1998; Robinson *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2002; Cornille *et al.*, 2013). В настоящее время геном домашней яблони полностью секвенирован (Velasco *et al.*, 2010), что облегчает его изучение и маркирование молекулярно-генетическими методами. Также большую долю занимают исследования, посвященные таксономии и классификации яблони (Rehder, 1940; Лангенфельд, 1991; Барсукова, 2012). Большое количество работ направлено на поиск и идентификацию генов устойчивости к различным заболеваниям яблони и дальнейшем применении результатов в маркер-опосредованной селекции (MAS) (Hemmat *et al.* 1998; Conner *et al.* 1998; Pereira-Lorenzo *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2014).

Цель и задачи исследования. Целью нашей работы являлось изучение внутривидового и межвидового генетического разнообразия рода *Malus* при помощи различных молекулярных маркеров с последующей оценкой родственных связей и уточнением вопросов филогении и систематики внутри рода, а также установление видовой принадлежности отечественных сортов народной селекции Антоновок. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Собрать коллекцию образцов яблони, максимально охватив всё разнообразие рода *Malus*.
2. Выделить ДНК из собранных образцов рода *Malus*.
3. Провести секвенирование и дальнейший анализ полиморфизма последовательности района транскрибируемого спейсера ITS1 и гена 5.8S рРНК у образцов *Malus*.
4. Провести AFLP-анализ образцов рода *Malus*.

5. Провести S-SAP-анализ образцов рода *Malus*, включая поиск последовательностей LTR-ретротранспозонов в базах данных, разработку и тестирование праймеров.

6. Провести NBS-профайлинг для анализа внутри- и межвидового полиморфизма последовательностей семейства NBS-LRR генов резистентности (R-генов) у различных образцов рода *Malus*.

7. Дать рекомендации по использованию различных методов молекулярного маркирования для анализа генетического разнообразия рода *Malus*, а также выработать рекомендации по использованию образцов яблони, обладающих генами устойчивости к различным заболеваниям, в маркер-опосредованной селекции.

Научная новизна работы. Впервые было проведено изучение генетического разнообразия образцов рода *Malus* из отечественных коллекций с использованием высокоинформативных молекулярных маркеров (AFLP, S-SAP). Также в ходе работы впервые были секвенированы и проанализированы последовательности района транскрибируемого спейсера ITS1 и гена 5.8S рРНК у образцов рода *Malus* отечественных коллекций. Впервые был проведен анализ генетической вариабельности последовательностей семейства NBS-LRR генов резистентности у различных видов и сортов яблони домашней рода *Malus* из отечественных коллекций. Уникальные сорта народной селекции Антоновки также были взяты в исследование впервые, ранее молекулярно-генетические методы для их анализа не применялись.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в результате работы данные о генетическом разнообразии рода *Malus* могут быть использованы для решения проблем систематики и уточнения вопросов филогении и таксономии видов рода *Malus*. Работа значительно дополняет собой обширно развивающееся направление в области изучения генетической вариабельности рода *Malus*.

Данные, полученные в результате анализа генетической вариабельности последовательностей семейства NBS-LRR генов резистентности у различных видов рода *Malus* будут полезны для маркер-опосредованной селекции при выведении новых сортов яблони. Сорта народной селекции Антоновки могут послужить новыми источниками хозяйственно-ценных признаков.

Основные положения, выносимые на защиту:

- генетическое разнообразие образцов рода *Malus* отечественных коллекций на основе анализа полиморфизма последовательности района транскрибируемого спейсера ITS1 и гена 5.8S рРНК;
- генетическое разнообразие образцов рода *Malus* отечественных коллекций на основе AFLP-анализа;

- генетическое разнообразие образцов рода *Malus* отечественных коллекций, основанное на полиморфизме по сайтам интеграции LTR-ретротранспозонов (S-SAP-анализ);
- видовая принадлежность сортов народной селекции Антоновок;
- идентификация при помощи NBS-профайлинга генотипов яблони, обладающих генами устойчивости к заболеваниям, для последующего использования в селекционном процессе.

Все исследования выполнялись соискателем лично или совместно с сотрудниками Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

Степень достоверности и апробация результатов работы.

Промежуточные и итоговые результаты работы были представлены автором на международных конференциях, в том числе на Plant Genetics and Breeding Technologies, Vienna International Plant Conference Association (VIPCA) (Vienna, 2013), XIV International Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics (Bologna, 2015), а так же на VI Съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГИС) (Ростов-на-Дону, 2014).

Материалы исследования были представлены на итоговых годовых сессиях аспирантов ИОГен РАН в 2012 - 2015 годах.

По материалам работы опубликовано пять печатных работ, из них две статьи в изданиях, рецензируемых ВАК.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В разделе «Обзор литературы» изложены литературные данные об особенностях объекта исследования, систематике, филогенетических взаимоотношениях, эколого-географическом распространении рода *Malus*. Рассмотрены типы молекулярно-генетических маркеров, их применение для изучения генетического разнообразия, филогении растений, а также их применение для маркирования хозяйственно-ценных признаков растений. Обсуждается современное состояние молекулярно-генетических исследований рода *Malus* Mill.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходный материал

Полученный материал представлен 133 образцами, включая 9 форм Антоновок российской народной селекции (1-9), 34 культурных сорта *M. domestica* Borkh. (10-43), 59 образцов диких видов яблони, 31 образец межвидовых гибридов яблони (в соответствии с классификацией ВИР (Барсукова, 2012)). Коллекция образцов была предоставлена Всероссийским научно-исследовательским институтом генетики и селекции плодовых растений имени И.В. Мичурина (ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина), Майкопской опытной станцией Всероссийского научно-исследовательского института

растениеводства им Н.И. Вавилова (Майкоп – Санкт-Петербург), а также Главным ботаническим садом им. Н.В. Цицина РАН (ГБС РАН). При отборе образцов для изучения генетического разнообразия главной задачей было максимально охватить все разнообразие видов рода *Malus*.

Выделение ДНК образцов яблони

ДНК образцов выделяли из почек и листьев после проращивания черенков представителей различных видов и сортов рода *Malus* по методике Puchooa (2004), адаптированной для работы с растительным материалом с высоким содержанием фенольных соединений. Концентрацию выделенной ДНК определяли при сравнении с ДНК фага λ известной концентрации (“Fermentas”) после электрофореза в агарозном геле. В качестве буферной системы использовали 1 x TBE. Для приготовления геля использовали агарозу (“Helicon”) в конечной концентрации 1%. Для визуализации ДНК в гель добавляли раствор бромистого этидия до конечной концентрации 0,005%. Напряженность электрического поля при электрофорезе составляла 4,4 В/см. После электрофореза гели анализировали в ультрафиолетовом свете с использованием трансиллюминатора и фотографировали с использованием цифровой фотокамеры Canon EOS 20D.

Секвенирование и статистический анализ нуклеотидных последовательностей участка ITS1-5.8S ядерного генома

В ходе работы были секвенированы и проанализированы последовательности района транскрибируемого спейсера ITS1 и гена 5.8S рРНК у 41 образца рода *Malus*, включая образцы видов различных секций, гибриды, сорта яблони домашней и сорта народной селекции Антоновки. Были использованы универсальные последовательности праймеров, предложенные White *et al.* (1990). ПЦР проводили по стандартной методике Hsiao *et al.* (1994) с использованием набора реактивов (“Диалат ЛТД”, г. Москва) в амплификаторе фирмы “ABI GenAMP 9700” (США). Секвенирование фрагментов проводили с теми же праймерами, использованными для амплификации, в секвенаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems согласно протоколу фирмы-производителя. Полученные последовательности выравнивали, далее их проанализировали с помощью программы MEGA 5.1 (Tamura *et al.*, 2011). Построение дендрограмм производили с использованием программы MEGA 5.1 методами объединения соседей (Neighbor-Joining, NJ). Индексы бутстрепа (ИБ) рассчитывали по 1000 репликам.

Проведение AFLP-, S-SAP-анализа, а также NBS-профайлинг образцов рода *Malus*

AFLP. Было отобрано 90 наиболее распространенных образцов рода *Malus* из пяти секций, включая сорта яблони домашней *M. domestica*, а также гибридные виды. В качестве аутгруппы был выбран образец груши *Pyrus communis* L., сорт Бессемянка.

Выполнение AFLP-анализа проводили в соответствии со стандартной методикой, разработанной Vos *et al.* (1995).

Предварительное тестирование 17 пар универсальных праймеров позволило выбрать пять парных комбинаций праймеров, которые давали высоковоспроизводимые ДНК-спектры и позволили выявить межвидовой и внутривидовой полиморфизм: E₃₂/M₅₀, E₃₂/M₅₂, E₃₅/M₅₀, E₄₅/M₅₀, E₄₅/M₅₉.

S-SAP. Для исследования было выбран 131 образец различных видов и сортов рода *Malus*. Для проведения SSAP-анализа был использован протокол согласно Konovalov *et al.* (2010). Данный протокол был создан на основе NBS-профайлинга по van der Linden *et al.* (2004) с небольшими модификациями.

В качестве мишени для S-SAP-анализа были использованы уже известные последовательности LTR-ретротранспозонов яблони: *Ty3-gypsy-like* (dem1) (Yao *et al.*, 2001) и TRIM2 (Antonius-Klemola *et al.*, 2006). К 5'-концам LTR этих ретротранспозонов были подобраны праймеры с тремя или четырьмя различными случайными якорными нуклеотидами на 3'-конце. Данные праймеры давали высоковоспроизводимые ДНК-спектры и позволили выявить межвидовой и внутривидовой полиморфизм.

NBS-профайлинг. Для исследования было выбрано 89 образцов различных видов и сортов рода *Malus*, принадлежащим к четырем различным секциям. NBS-профайлинг и последующее разделение фрагментов на ПААГ проводили согласно методике, описанной van der Linden *et al.* (2004), с использованием двух праймеров NBS2 и NBS5.

Электрофорез амплифицированных фрагментов ДНК

Фракционирование продуктов реакции амплификации проводили путем электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в камере Sequi-Gen® GT Sequencing Cell (BIO-RAD) В качестве буферной системы использовали TBE. Проявляли гель по методу 3 из работы Vaudoin *et al.* (2007). Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали маркер молекулярной массы 100bp DNA ladder (Invitrogen). После просушивания геля просматривали его на световом столике, фотографировали и анализировали.

Анализ результатов и статистическая обработка данных

В статистический анализ были включены только четкие, воспроизводимые фрагменты. Данные, полученные в результате AFLP-, S-SAP-анализа и при проведении NBS-профайлинга были обработаны методом PCO (principal coordinates analysis – метод анализа главных координат), выполненным в программе PAST 3.10 (Hammer *et al.*, 2001).

Для проведения кластеризации и оценки генетического расстояния между образцами в S-SAP-анализе использовалась программа PAST 3.10 (Hammer *et al.*, 2001).

Для проведения оценки результатов NBS-профайлинга методом двумерного кластерного анализа в лаборатории генетики растений ИОГен РАН был разработан алгоритм статистической программы на базе программы STATISTICA v. 6 (StatSoft I. N. S., 2001). Данный алгоритм позволяет обработать большие объемы полученных в ходе исследования данных.

Генетические расстояния для РСО-анализа и при проведении кластеризации, а также при обработке данных методом двумерного кластерного анализа были рассчитаны автоматически по коэффициенту Дайса. Статистическая оценка достоверности была подсчитана методом бутстреп-анализа по 1000 репликам.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ITS-анализ образцов рода *Malus* Mill.

В работу был отобран 41 образец различных видов и сортов рода *Malus*, относящихся к пяти различным секциям *Malus*, *Gymnomeles*, *Sorbomalus*, *Chloromeles*, *Docyniopsis*. В качестве внешней группы были взяты последовательности ITS1 и гена 5.8S двух образцов из GenBank: *Pyrus* (*Pyrus dimorphophylla* EU149953) и *Spiraea salicifolia* JQ041777.

Нуклеотидные последовательности района транскрибируемого спейсера ITS1 и гена 5.8S рРНК у отобранных образцов рода *Malus* были секвенированы и далее данные они были депонированы в базе данных GenBank

Таблица 1. Характеристика нуклеотидных последовательностей ITS1 и гена 5.8S образцов рода *Malus*

	Длина	Число вариабельных сайтов	Число парсимони- информативных сайтов	GC состав (%)	Транзиции/ Трансверсии
ITS1	224- 227	32	25	67,5 %	7 (22%) \ 25 (78%)
5.8S	165	0	0	58,8 %	-

Длина гена 5.8S рРНК у всех проанализированных представителей рода яблони составила 165 п.н., на всем протяжении полиморфизма выявлено не было (Табл. 1). Длина ITS1 последовательности у рассмотренных видов *Malus* составляет 224 п.н., за исключением *M. caspiensis* и *M. sylvestris*, у которых протяженность этого участка равна 227 п.н. В последовательности фрагмента ITS1 было выявлено 32 вариабельных сайта (Табл. 1). Таким образом, уровень нуклеотидного полиморфизма изучаемого фрагмента составил 14%.

На основе анализа последовательностей ITS1 были рассчитаны межвидовые генетические расстояния и построена дендрограмма методом объединения ближайших соседей (Neighbor-Joining) с использованием в качестве внешней группы ITS1 последовательностей *Pyrus dimorphophylla* (EU149953) и *Spiraea salicifolia* (JQ041777) (рис. 1). На дендрограмме все анализируемые виды *Malus* (БП = 76) объединены в один обширный кластер. Внутри кластера виды яблони группировались в отдельные

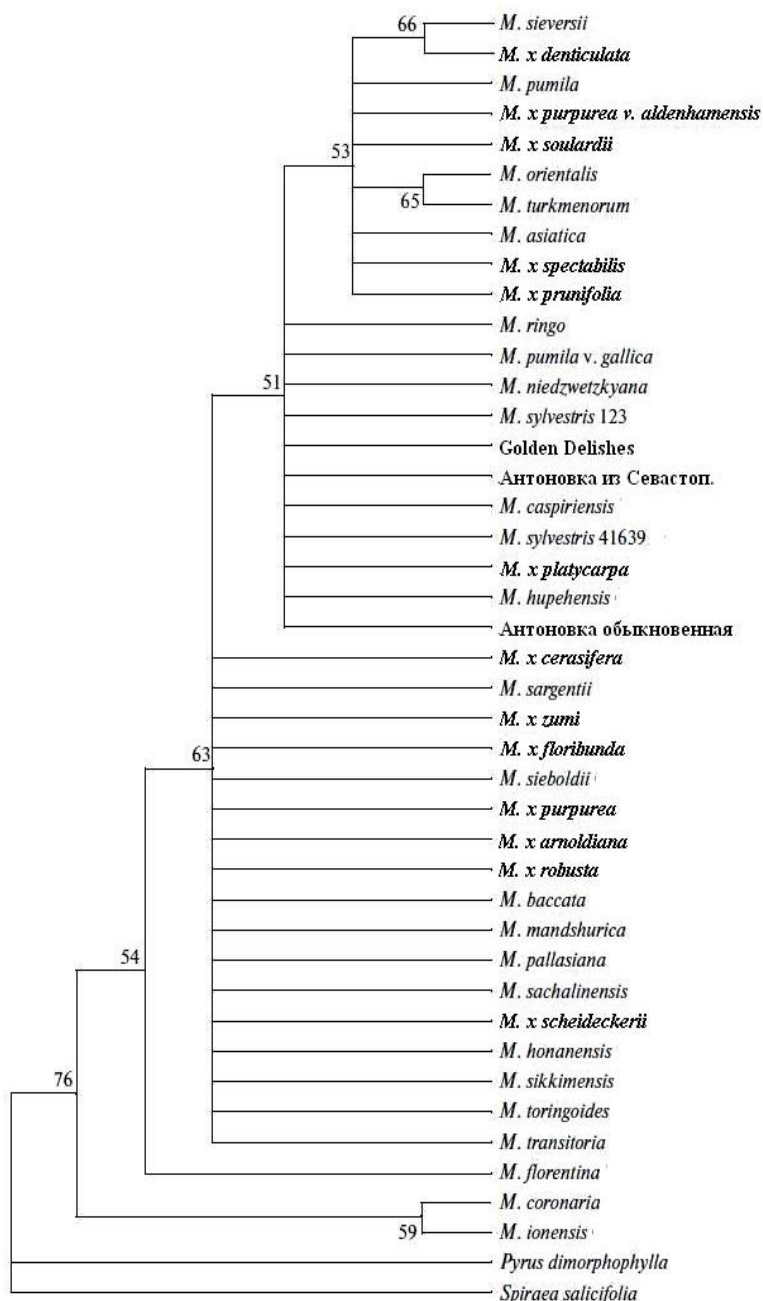


Рис. 1. Кластерный анализ методом объединения ближайших соседей (Neighbour-Joining) для 41 образца рода *Malus*

подкластеры, однако в большинстве случаев такие субкластеры имели низкую (<50) бутстреп-поддержку, показанную также в других молекулярных исследованиях рода *Malus* (Robinson *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2002), что говорит как о схожести геномов образцов яблони, так и о наличии межвидовой гибридизации. Подобные результаты также могли быть вызваны небольшой длиной секвенированных последовательностей, использованных для анализа. Гибридный вид, *M. x denticulata* ранее не включавшийся в Молекулярные исследования объединяются в один кластер (БП = 66) с *M. sieversii*. Другой вид *M. turkmenorum* ранее не включался в молекулярные исследования, произрастает на территориях Ирана, Кавказа, Турции, его таксономический статус неоднозначен. По нашим данным *M. turkmenorum* очень близок к виду *M. orientalis* (Восточные яблони) (БП = 65), возможно, это виды-синонимы.

Сорта народной селекции - Антоновка из Севастопольской и Антоновка обыкновенная относятся к секции *Malus* по данным кластеризации (БП = 51).

В один субкластер (БП = 59)

вошли виды *M. ioensis* и *M. coronaria*. Данные виды составляют североамериканскую секцию яблонь *Chloromeles*.

AFLP-анализ образцов рода *Malus* Mill.

AFLP-анализ 90 образцов коллекции рода *Malus* позволил идентифицировать 399 фрагментов, из которых 360 оказались полиморфными (присутствовали или отсутствовали у конкретного образца), уровень межвидового полиморфизма составил 90.2%.

Величина коэффициента генетических расстояний (GD), рассчитанная автоматически в программе PAST 3.10, варьировала от 0,419 (*M. sylvestris* v. *praecox* (69) и *M. ioensis* (61) до 0,964 (*M. ioensis* (61) и *M. coronaria* (58) и в среднем составила 0,668.

На полученной в результате PCO-анализа диаграмме (рис. 2) можно выделить несколько облаков концентрации образцов яблони (группы А (подгруппы a1 и a2), В, С, D).

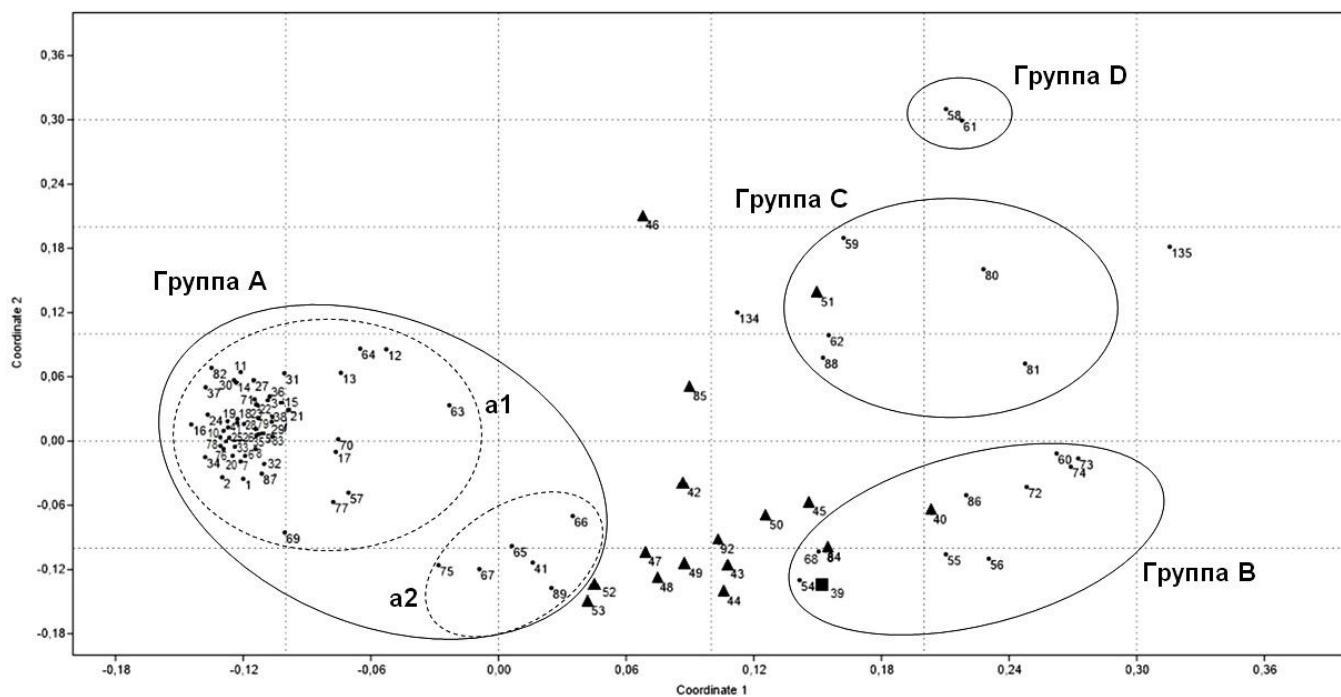


Рис. 2. PCO-анализ образцов рода *Malus* по данным AFLP-анализа; ▲ - гибридные виды; ■ - форма яблони Якутская

В группу А входят виды секции *Malus* (настоящие яблони). Подгруппа a1 включает виды секции *Malus* Европейского и Центрально-Азиатского регионов произрастания – *M. pumila* (70, 71), *M. sylvestris* (69, 77-79), *M. caspiensis* (57), а также сорта яблони домашней *M. domestica* (10–38, 82, 83).

Сорта вида *M. domestica* являются ядром подгруппы a1, расположены очень близко друг от друга. Все сорта народной селекции Антоновки (1–9) находятся в группе А вместе с сортами яблони домашней *M. domestica* (подгруппа a1). Таким образом, можно с

полной уверенностью говорить о принадлежности Антоновок к виду яблоня домашняя *M. domestica*. Особое внимание к исследованию этих сортов народной селекции объясняется наличием у них хозяйственно-ценных признаков, таких как устойчивость ко многим сельскохозяйственным вредителям, а также устойчивость к низким температурам (Visser *et al.*, 1974; Calenge *et al.*, 2004; Dunemann *et al.*, 2010).

Образцы вида *M. pumila* (70, 71) расположены в подгруппе а1. Лангенфельд (1991) упоминает, что название *M. pumila* используется в классификациях различных систематиков как “эпитет” для обозначения того или иного вида секции *Malus*. Самостоятельным видом, по его мнению, *M. pumila* не является (Лангенфельд, 1991).

Подгруппа а2 включает виды *M. asiatica* (41), *M. orientalis* (65-67), *M. turkmenorum* (89). Вид *M. orientalis* произрастает на более увлажненных территориях Кавказа, относится к ирано-кавказскому ареалу произрастания яблонь. Данный вид сыграл важную роль в формировании генома домашней яблони в результате распространения домашней яблони по “Шелковому пути” из Среднеазиатского региона в Европейский (Cornille *et al.*, 2012). *M. turkmenorum* (90) также относится к ирано-кавказскому ареалу произрастания яблонь секции *Malus*, однако занимает, в отличие от *M. orientalis*, более восточные засушливые области Кавказа; кроме того, встречается в Иране. Таким образом, расположение образцов этих двух видов на диаграмме в подгруппе а2 указывает на их близость. Образцы вида *M. sieversii* на диаграмме расположены в обеих подгруппах а1 (76, 87) и а2 (75) и покрывают все разнообразие видов секции *Malus*, группа А. Вид *M. sieversii* являлся диким предшественником яблони домашней *M. domestica*, на что указывают как морфологические признаки (Robinson *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2002; Coart *et al.*, 2003), так и молекулярно-генетические данные (Velasco *et al.*, 2010). Наличие образцов вида *M. sieversii* в подгруппе а1 на диаграмме вместе с образцами яблони домашней подтверждает данные о том, что *M. sieversii* являлся главным предковым видом *M. domestica*. Кроме того, наличие образца вида *M. sieversii* и в подгруппе а2 дает возможность говорить о его близости с ирано-кавказскими видами.

Группа В включает виды секции *Gymnomeles*: *M. hupehensis* (60), *M. pallasiana* (68), *M. baccata* (54–56), *M. mandshurica* (86), *M. sachalinensis* (72) (Zohary *et al.*, 2000). Сюда же входят и некоторые межвидовые гибриды, полученные с участием видов секции *Gymnomeles* – *M. × arnoldiana* (40, *M. × floribunda* × *M. baccata*), *M. × robusta* (84, *M. baccata* × *M. × prunifolia*). Здесь также оказалась форма яблони Якутская (39), которая ранее считалась формой вида *M. domestica*. Наши данные показывают, что Якутская является результатом одомашнивания одного из видов ягодных яблонь секции *Gymnomeles*; скорее всего, это вид *M. baccata*, так как на диаграмме образец формы Якутская (39) тесно группируется именно с этим видом. Образцы *M. sieboldii* (74) и *M. sargentii* (73) располагаются также в группе В, данные виды традиционные систематики относят к секции *Sorbomalus* (Лангенфельд, 1991). На диаграмме они группируются вместе с видами секции *Gymnomeles*. Систематик Г.Г. Тарасенко (1941) объединяет данные два вида в одну группу с видом *M. baccata* секции *Gymnomeles* по

географическому принципу и признакам строения органов. Для уточнения систематического положения видов *M. sieboldii* и *M. sargentii* следует провести дополнительные исследования.

Группа образцов С на диаграмме включает виды секции *Sorbomalus*, которые произрастают на территории Восточной Азии: *M. toringoides* (81), *M. transitoria* (80), *M. kansuensis* (62). Единственным видом группы С, не произрастающим на территории Восточной Азии, является вид *M. florentina* (59), который распространен на территории Северной Италии и Югославии (Барсукова, 2012). Систематическое положение вида до сих пор вызывает вопросы. Наш анализ образцов рода *Malus* методом AFLP-маркирования показал, что вид *M. florentina* достоверно принадлежит секции *Sorbomalus*, что согласуется с мнением Лангенфельда (1991).

В группе С также располагается вид *M. sikkimensis* (88), произрастающий в Восточных Гималаях и горных лесах Сиккима, который относится к древней секции яблонь *Docyniopsis* (Лангенфельд, 1991). Межвидовой гибрид *M. × soulardii* (51) относится к группе С.

На диаграмме отделилась группа североамериканских яблонь секции *Chloromeles* – *M. ioensis* (61) и *M. coronaria* (58) – группа D. В настоящее время американские яблони используются в основном как декоративные растения (Барсукова, 2012).

Гибридные виды, в формировании которых участвовали виды из групп А и В, на диаграмме занимают промежуточное положение между этими группами (на рис. 2 обозначены треугольниками). Это *M. × cerasifera* (42 - 44), *M. × prunifolia* (47), *M. × purpurea* (48–50), *M. × scheideckerii* (85), *M. × spectabilis* (52, 53, 92), *M. × floribunda* (45), *M. × platycarpa* (46).

Таким образом, было показано, что в целом классическая систематика рода *Malus*, выделяющая секции на основании различий по морфологическим признакам и эколого-географическим признакам, правомерна и вполне может быть использована для классификации яблони. Сорты народной российской селекции Антоновки относятся к виду *M. domestica*. Яблоня Якутская является одомашненным видом секции *Gymnomeles*, предположительно вид *M. baccata*. Виды *M. sargentii* и *M. sieboldii* вероятно относятся к секции *Gymnomeles*. Возникло предположение, что вид *M. sieversii* был предком не только яблони домашней, но и других видов секции *Malus*.

S-SAP-анализ образцов рода *Malus* Mill.

S-SAP-анализ 131 образца из пяти секций рода *Malus* позволил идентифицировать 708 фрагментов, из них 679 полиморфных фрагментов (264 фрагмента – для LTR-ретротранспозона TRIM2 и 415 полиморфных фрагментов, полученных для LTR-ретротранспозона dem1). Таким образом, уровень межвидового полиморфизма составил 95,9 %.

Был проведен многомерный анализ по двум главным координатам (PCO) в программе PAST 3.10 также отдельно для каждого ретротранспозона, в которой

автоматически были рассчитаны коэффициенты попарного генетического сходства/различия между образцами (использовался коэффициент Дайса) (Hammer *et al.*, 2001). Для LTR-ретротранспозона *dem1* величина коэффициента генетических расстояний (GD) варьировала от 0,072 (*M. hupehensis* (60) и *M. coronaria* (58) до 0,985 (*M. domestica* Golden Spur (82) и *M. domestica* Spay Gold (12) и в среднем составила 0,467. Для LTR-ретротранспозона TRIM2 величина коэффициента генетических расстояний (GD) варьировала от 0,072 (*M. florentina* (87) и *M. sachalinensis* (72) до 0,983 (Антоновка Зимняя (6) и Антоновка из Севастопольской (7) и в среднем составила 0,509.

PCO-анализ образцов рода *Malus*, основанный на данных по LTR-ретротранспозону TRIM2, позволил выделить несколько облаков концентрации образцов на диаграмме, хотя в целом расположение образцов говорит о слабой генетической дифференциации внутри рода *Malus* (рис. 3). Результаты распределения видов на основании полиморфизма по сайтам интеграции LTR-ретротранспозона *dem1* на рис. 4. менее выражены. Группа А (рис. 3 и 4) включает виды европейского и центрально-азиатского региона, относящихся к секции *Malus* - *M. sieversii* (75, 76, 87, 129, 130), *M. orientalis* (65-67, 121-123), *M. turkmenorum* (89, 95, 131), *M. neidzwetskyana* (63, 64, 119, 120), *M. sylvestris* (69, 77-79) и *M. asiatica* (41), сорта вида *M. domestica* (10-38, 82, 83, 90, 96). Как уже было отмечено выше, Н.И. Вавилов определил Центральную Азию, в том числе и современную территорию Тянь-Шаня на границе с Казахстаном, Узбекистаном, Киргизией и Китаем в качестве центра происхождения домашней яблони *M. domestica*. (Vavilov, 1930).

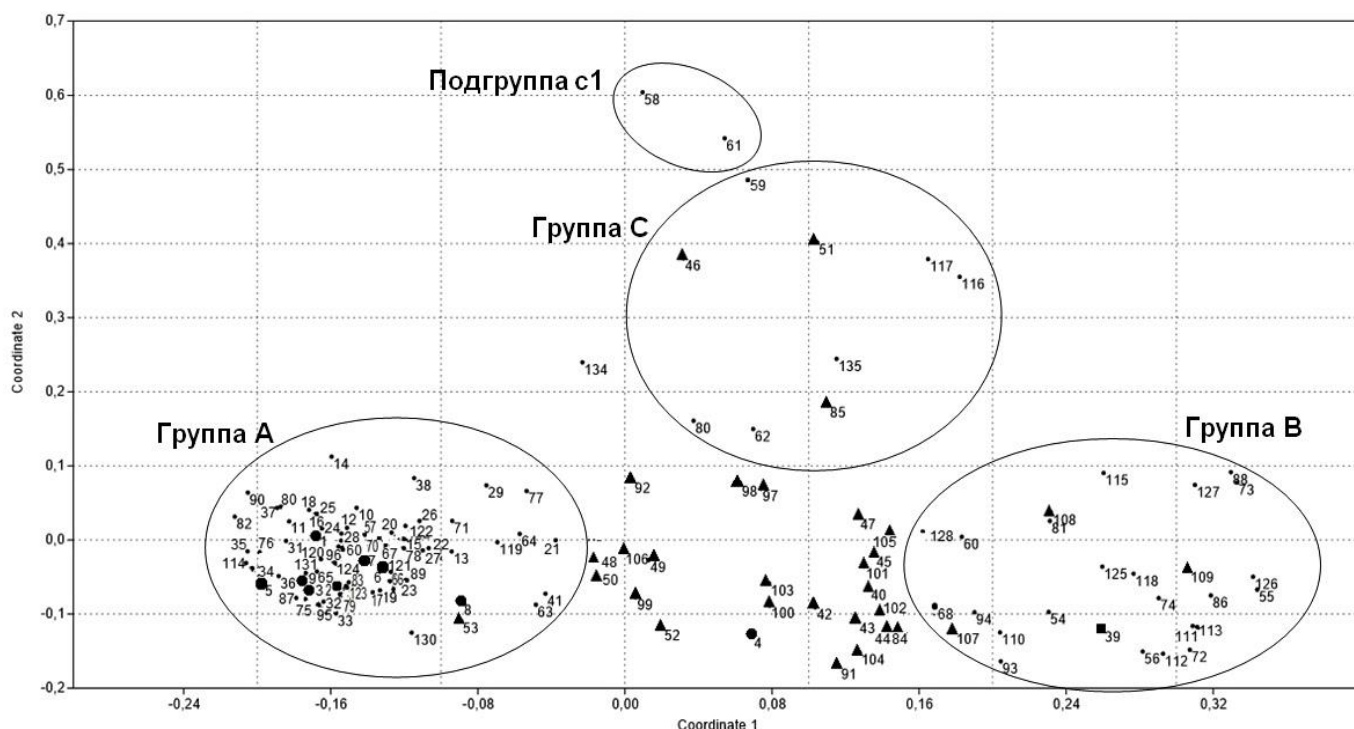


Рис. 3. PCO-анализ образцов рода *Malus* по данным S-SAP-маркирования на основе сайтов встраивания LTR-ретротранспозона TRIM2; ▲ - гибридные виды; ● - сорта народной селекции Антоновки; ■ - форма яблони Якутская

Одомашнивание яблони началось примерно 4000 лет назад на территории Ближнего Востока (Zohary *et al.*, 2000) с последующим распространением плодовой культуры по Шелковому пути в Европу и Северную Африку (Juniper *et al.*, 2006). Основным предком яблони домашней *M. domestica* является вид *M. sieversii*, что подтверждается не только сравнением по морфологическим признакам, но и исследованиями последовательностей ДНК двух видов (Watkins *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 2000; Robinson *et al.*, 2001; Forte *et al.* 2002; Harris *et al.*, 2002, Cornille *et al.*, 2012). В нашем анализе образцы этого вида также попадают в группу А, объединяются вместе с образцами вида *M. domestica*.

Большинство сортов народной селекции Антоновки группируются вместе с образцами сортов домашней яблони на диаграмме РСО-анализа (рис. 3, 4). Исключение составляет Антоновка Ольгинская (4), которая выпадает из пула домашних яблонь. Судя по положению на рис. 3 и рис. 4 Антоновка Ольгинская является гибридным видом, в формировании которого принимал участие какой-то вид из секции *Gymnomeles*.

Группа В (рис. 3, 4) включает виды, относящиеся к секции *Gymnomeles* - *M. baccata* (54-56, 110-113, 93), *M. mandshurica* (86, 94), *M. sachalinensis* (72, 125, 126), *M. hupehensis* (60, 118). Ареал произрастания видов данной секции - Восточная Сибирь, Приморье, Северный Китай, Монголия, Тибет и Гималаи (Барсукова, 2012). Кроме того, в группу В попадают гибридные виды, такие как *M. × robusta* (66), *M. × zumi* (73, 74).

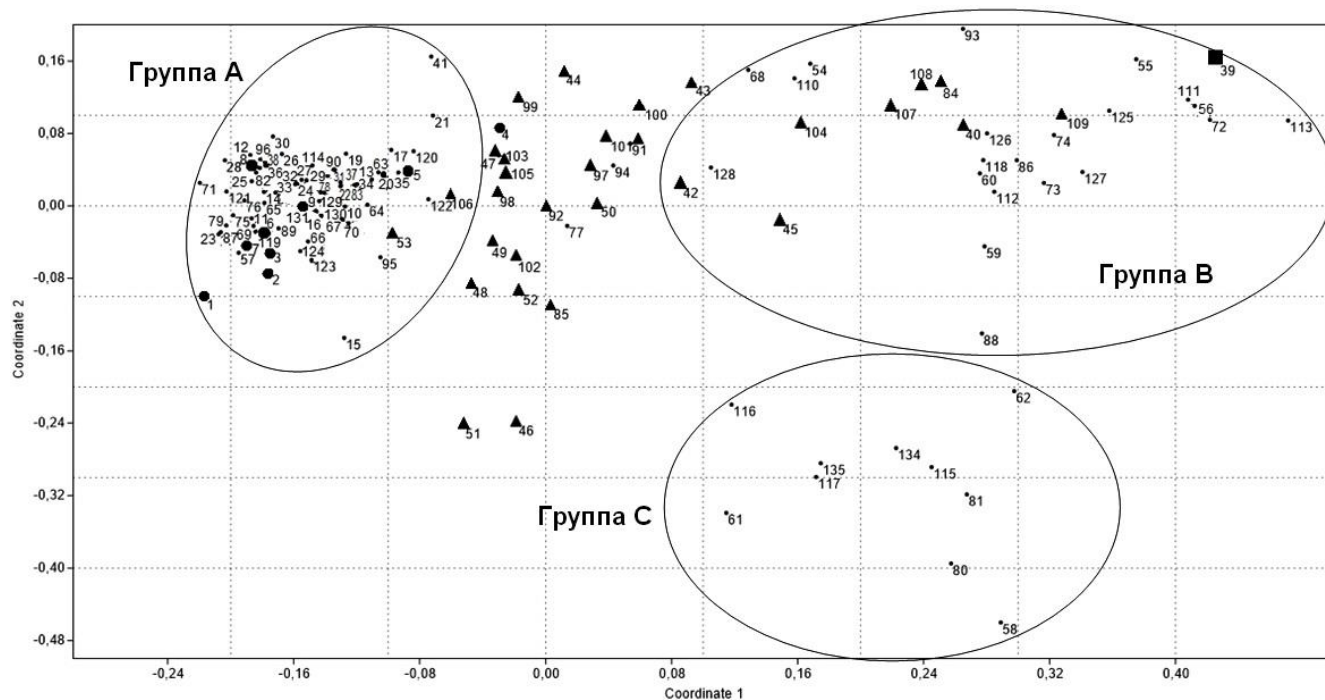


Рис. 4. РСО-анализ образцов рода *Malus* по данным S-SAP-маркирования на основе сайтов встраивания LTR-ретротранспозона dem1; ▲ - гибридные виды; ● - сорта народной селекции Антоновки; ■ - форма яблони Якутская

В группу В (рис. 3, 4) также попали виды *M. sargentii* (73, 127) и *M. sieboldii* (74, 128). Традиционные систематики относят эти виды к секции *Sorbomalus*, например, Лангенфельд (1991) данные виды считает экологически и морфологически обособленными разновидностями вида *M. toringo*, секция *Sorbomalus*. Однако, систематик Тарасенко (1941) объединяет данные два вида в одну группу с видом *M. baccata* секции *Gymnomeles* по эколого-географическому принципу и признакам строения органов. Наши данные больше подтверждают последнее предположение.

Также в группу В попал вид *M. pallasiana* (68), который по мнению ряда авторов (Барсукова, 2012) является одной из форм яблонь секции *Sorbomalus*. На основании результатов наших исследований мы подтверждаем, что вид *M. pallasiana* относится к секции *Gymnomeles*.

Во всех случаях анализа Якутская (39) попадает в группу В, включающую виды секции *Gymnomeles*. Следовательно, данная форма не относится к виду *M. domestica*, как считалось ранее, а является результатом одомашнивания одного из видов ягодных яблонь.

Виды, представляющие группу С, входят в секцию *Sorbomalus*, произрастают на территории Центральной Азии - *M. honanensis* (117) и Восточной Азии - *M. transitoria* (80), *M. kansuensis* (62), североамериканский вид *M. fusca* (116). Филогенетически секция делится на три ветви – серии *Yunnanenses*, *Kansuenses* и *Toringonae* (Лангенфельд, 1991). Отдельно стоит отметить вид *M. florentina* (59, 115) - яблоня флорентийская, которая в диком виде распространена в Северной Италии, встречается в Югославии (Барсукова, 2012). Происхождение и филогенетическое положение вида до сих пор не выяснено. В наших исследованиях оба образца *M. florentina* (59, 115) группируются вместе с образцами *Sorbomalus*, следовательно, данный вид относится именно к этой секции.

Подгруппа с1 включает виды секции *Chloromeles* – *M. ioensis* (61) и *M. coronaria* (58). Это яблони Северной Америки, исторически произрастающие в Центральных и Восточных штатах США и на юге Канады. (Лангенфельд, 1991).

Образцы гибридных видов на всех диаграммах занимают промежуточное положение между основными группами. Гибридные виды образовались на границах ареалов произрастания негибридных видов, являются более устойчивыми к патогенам и к неблагоприятным условиям среды, чем истинные виды (Урбанович и др., 2010). К таким видам относятся *M. × cerasifera* (42-44, 99, 100), *M. × spectabilis* (52, 92), *M. × purpurea* (48-50, 105, 106), *M. × prunifolia* (47, 102-104), *M. × arnoldiana* (40), *M. × floribunda* (45, 101), а также гибриды с участием яблони домашней *M. sargentii* × сорт Ренет Симиренко (97) и *M. sieboldii* × сорт Спартан (98).

Далее была проведена Neighbour-Joining (NJ) кластеризация образцов рода *Malus* в программе PAST 3.10, генетические расстояния были рассчитаны автоматически (рис. 5). Для получения более высоких значений бутстреп-поддержки в главных узлах при построении дендрограммы были исключены гибридные образцы яблони, а также были смоделированы обобщенные генотипы истинных видов.

Такой генотип характеризовался наиболее частым для вида состоянием по каждому из 264 маркеров ретротранспозона TRIM2, поскольку маркеры на основе данного ретротранспозона являлись более информативными, чем dem 1. В качестве аутгруппы использовалась китайская слива *Prunus salicina*, сорт Красный шар (135) и груша *Pyrus communis*, сорт Бессемянка (134).

В целом, группировка видов на дендрограмме совпадает с результатами РСО-

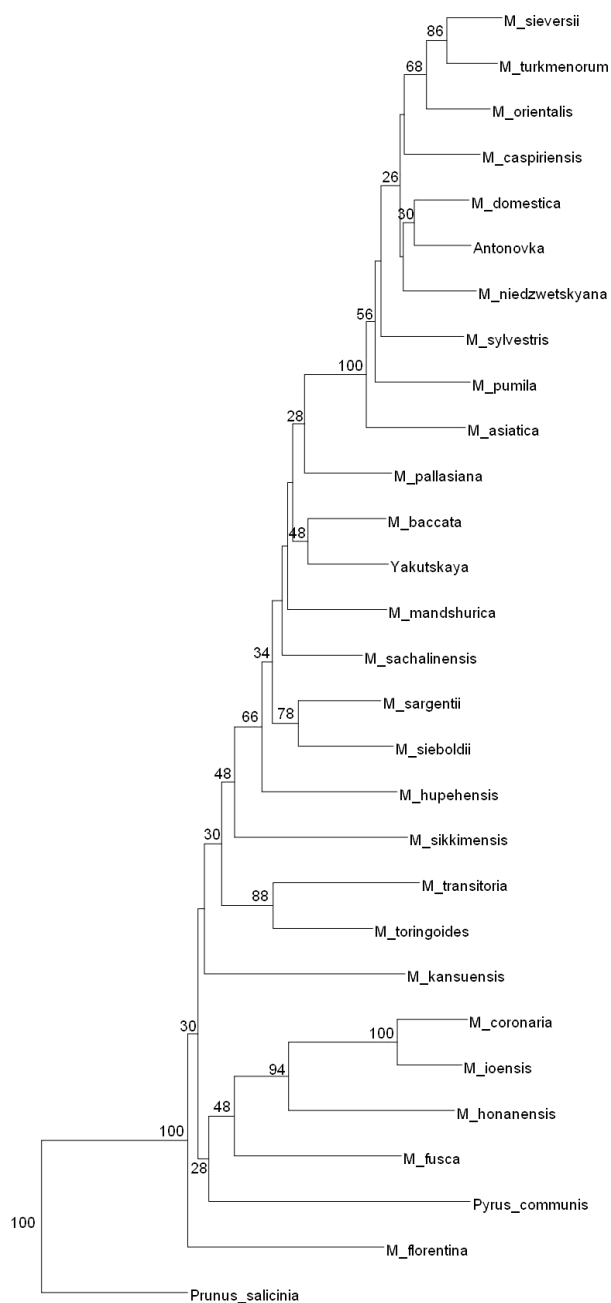


Рис. 5. Neighbour-Joining кластеризация образцов рода *Malus* по данным S-SAP-маркирования на основе сайтов встраивания LTR-ретротранспозона TRIM2 методом обобщенного генотипа

анализа. В один кластер с БП = 100 объединяются образцы секции *Malus* – *M. pumila*, *M. niedzwetzkyana*, *M. sieversii*, *M. turkmenorum*, *M. orientalis*, *M. caspiensis*, сорта вида *M. domestica*, *M. sylvestris*, *M. asiatica*. Сорта народной селекции Антоновок также входят в данную группу. Образцы секции *Gymnomeles* (*M. hupehensis*, *M. mandshurica*, *M. sachalinensis*, *M. baccata*, *M. pallasiana*) образуют кластер с БП = 66. Здесь же находится и яблоня Якутская. Интересно отметить, что два вида *M. sargentii* и *M. sieboldii* также группируются с образцами секции *Gymnomeles*. Также необходимо отметить, что североамериканские виды *M. coronaria* и *M. ioensis* группируются вместе с видами секции *Sorbomalus* (БП = 94), следовательно, подтверждено происхождение североамериканских яблонь от рябиновидных.

Полученные результаты подтверждают, что S-SAP-маркеры чрезвычайно эффективны при изучении филогении и генетического разнообразия растений. Каждый LTR-ретротранспозон имеет собственную историю заселения

генома растения, и потому всегда можно выбрать тот ретротранспозон, который был наиболее активен в момент дивергенции рода (Gao *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2011). Маркер на основе такого ретротранспозона будет достаточно информативным при описании генетического разнообразия. Так, в нашей работе S-SAP маркеры, созданные на основе LTR-ретротранспозона TRIM2 (рис. 3) лучше дифференцировали образцы рода *Malus*, чем маркеры, созданные на основе LTR-ретротранспозона dem1 (рис. 4), хотя в целом оба транспозона дают не противоречивые результаты.

NBS-профайлинг образцов рода *Malus* Mill.

NBS-профайлинг 89 образцов коллекции рода *Malus* позволил идентифицировать 209 фрагментов (83 фрагмента для праймера NBS2 и 126 фрагментов для праймера NBS5), из которых 165 оказались полиморфными. Таким образом, уровень межвидового полиморфизма составил примерно 79 %.

Был проведен многомерный анализ по двум главным координатам (PCO) в программе PAST 3.10, в которой автоматически были рассчитаны коэффициенты попарного генетического сходства/различия между образцами (использовался коэффициент Дайса) (Hammer *et al.*, 2001). Величина коэффициента генетических различий (GD) варьировала от 0,573 (*M. soulardii* (51) и *M. sieboldii* (74)) до 0,967 (*M. domestica* Golden Rezystern (13) и *M. domestica* Spay Gold (12)) и в среднем составила 0,797.

В целом, полученные данные по NBS-профайлингу образцов рода *Malus* совпадают с данными, полученными в результате AFLP- и S-SAP-маркирования. Полученная диаграмма представлена на рис. 6, на ней можно выделить облака концентрации образцов яблони – группы (A (подгруппа a1), B, C, D).

Группа A включает виды секции *Malus*: *M. asiatica* (41), *M. sieversii* (75, 76), *M. sylvestris* (69, 77-79), *M. orientalis* (65 - 67), *M. turkmenorum* (95), *M. caspiciensis* (57), *M. pumila* (70, 71), *M. niedzwetskyana* (63, 64), а также сорта вида *M. domestica* (10 – 38, 82).

Все дикие виды секции *Malus* смещены к нижнему полюсу группы, в то время как сорта яблони домашней смещены к верхнему полюсу на диаграмме.

Интересно отметить, что сорта народной селекции Антоновки также находятся в группе A, однако большинство из них занимает центральное положение в группе (1-7), не смешиваясь с сортами яблони домашней или дикими видами. Антоновка Красная (8) и Антоновка Краснобочка (9), смещены к полюсу с сортами яблони домашней *M. domestica*. Наши предыдущие исследования показали, что данные сорта народной селекции можно достоверно отнести к секции *Malus*, что подтверждают результаты NBS-профайлинга. Следует также отметить еще один образец из коллекции сортов яблони домашней – Сочи 26/1 (90). На рис. 6 он объединяется вместе с сортами народной селекции Антоновки, подгруппа a1. Данный образец относится к элитной форме (то есть обладает ценными хозяйственными признаками), при прохождении государственного сортоиспытания может получить статус сорта. Сочи 26/1 обладает иммунитетом к парше яблони, в дальнейшем может использоваться как родительская форма для создания новых

сортов. Кроме того, в группу А попадают два вида *M. × cerasifera* (42) и *M. × arnoldiana* (40), их положение смещено к нижнему полюсу группы. Оба вида являются гибридными, образовались с участием видов из разных секций, в том числе секции *Malus*.

Группа В на диаграмме (рис. 6) включает виды секции *Gymnomeles*: *M. baccata* (54-56, 93), *M. mandshurica* (94), *M. sachalinensis* (72), *M. pallasiana* (68), *M. hupehensis* (60). Следует отметить, что яблони Якутская (39) также входит в группу В. Якутская обладает сходными R-генами с видами секции *Gymnomeles* и может использоваться в селекционном процессе для выведения новых сортов яблони. Помимо этого, в группу В входят *M. sargentii* (73), *M. sieboldii* (74), которые традиционные систематики относят к секции *Sorbomalus* (Барсукова, 2012). По результатам филогенетических отношений последовательностей семейства NBS-LRR генов резистентности данные виды оказались ближе к видам секции *Gymnomeles*.

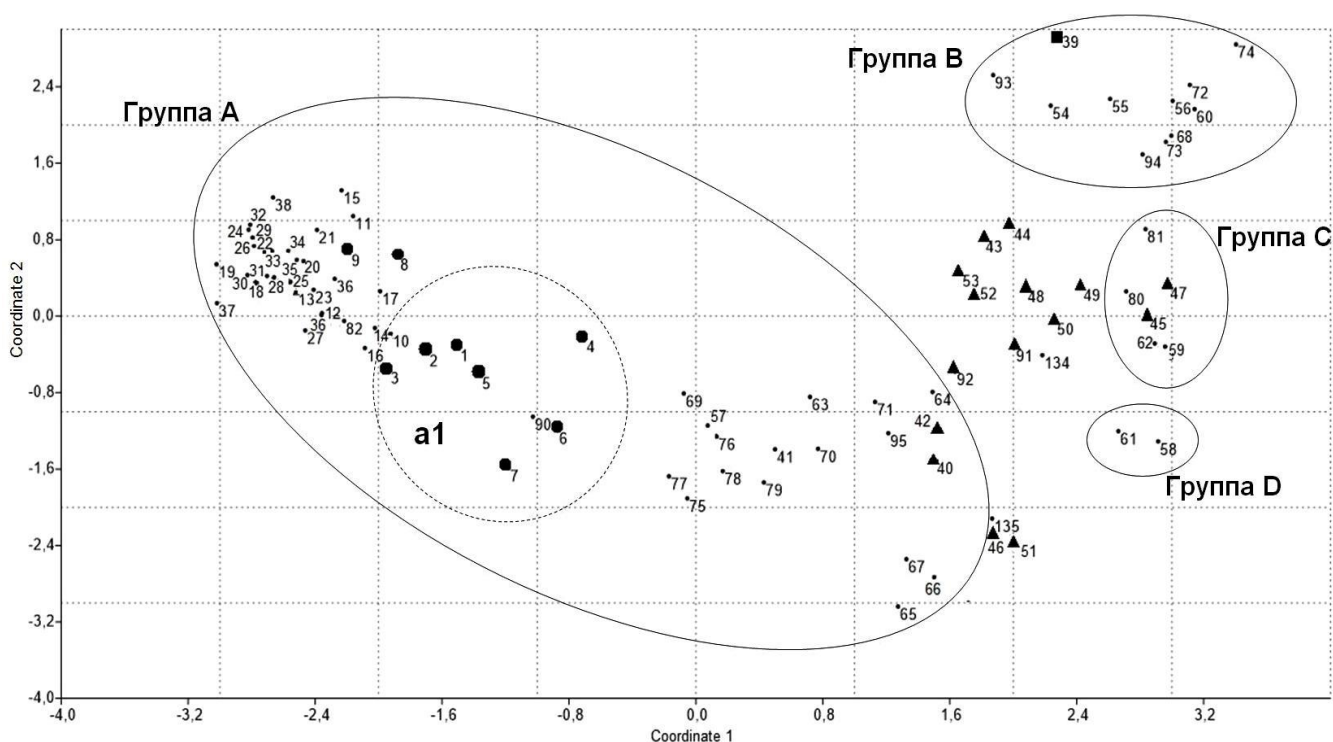


Рис. 6. PCO-анализ образцов рода *Malus* по данным NBS-профайлинга; ▲ - гибридные виды; ● - сорта народной селекции Антоновки; ■ - форма яблони Якутская

Группа С включает виды секции *Sorbomalus*: *M. florentina* (59), *M. kansueinsis* (62), *M. toringoides* (81), *M. transitoria* (80). Также в данную группу входят два гибридных вида *M. × floribunda* (45) и *M. × prunifolia* (47).

В группу D входят два североамериканских вида секции *Chloromeles* - *M. coronaria* (58), *M. ioensis* (61).

Гибридные виды яблони занимают в основном промежуточное положение между группами на диаграмме: *M. × cerasifera* (43, 44), *M. × purpurea* (48-50), *M. × spectabilis* (52, 53, 92), *M. × platycarpa* (46), *M. × robusta* var. *persicifolia* (91), *M. × soulardii* (51).

Как уже было замечено выше, на диаграмме рис. 6, полученной в результате РСО-анализа образцов рода *Malus*, сорта народной селекции Антоновки занимают промежуточное положение между дикими видами секции *Malus* и сортами яблони домашней *M. domestica*. Таким образом, цель дальнейшего анализа Антоновок состояла в поиске уникальных последовательностей, которые позволили объединить практически все Антоновки в единую группу. Для этого полученные по NBS-профайлингу данные были проанализированы методом двумерного кластерного анализа (Neighbour-Joining), генетические расстояния были рассчитаны автоматически по коэффициенту Дайса. Разработка данного алгоритма программы была сделана в лаборатории генетики растений ИОГен РАН на базе программы STATISTICA v. 6 (StatSoft I. N. С., 2001). Таким образом, была получена двумерная матрица, которая позволила выявить фрагменты максимального сходства образцов яблони (рис. 7). На полученной матрице выделяют две группы фрагментов (выделены прямоугольниками пунктиром, группа 1 – фрагменты (п. н.): 196, 144, 142, 81, 156, 208, группа 2 – фрагменты (п. н.): 109, 315), которые не только четко выделяют кластер Антоновок от остальных сортов яблони домашней, но и возможно являются маркерами уникальных генов устойчивости к заболеваниям.

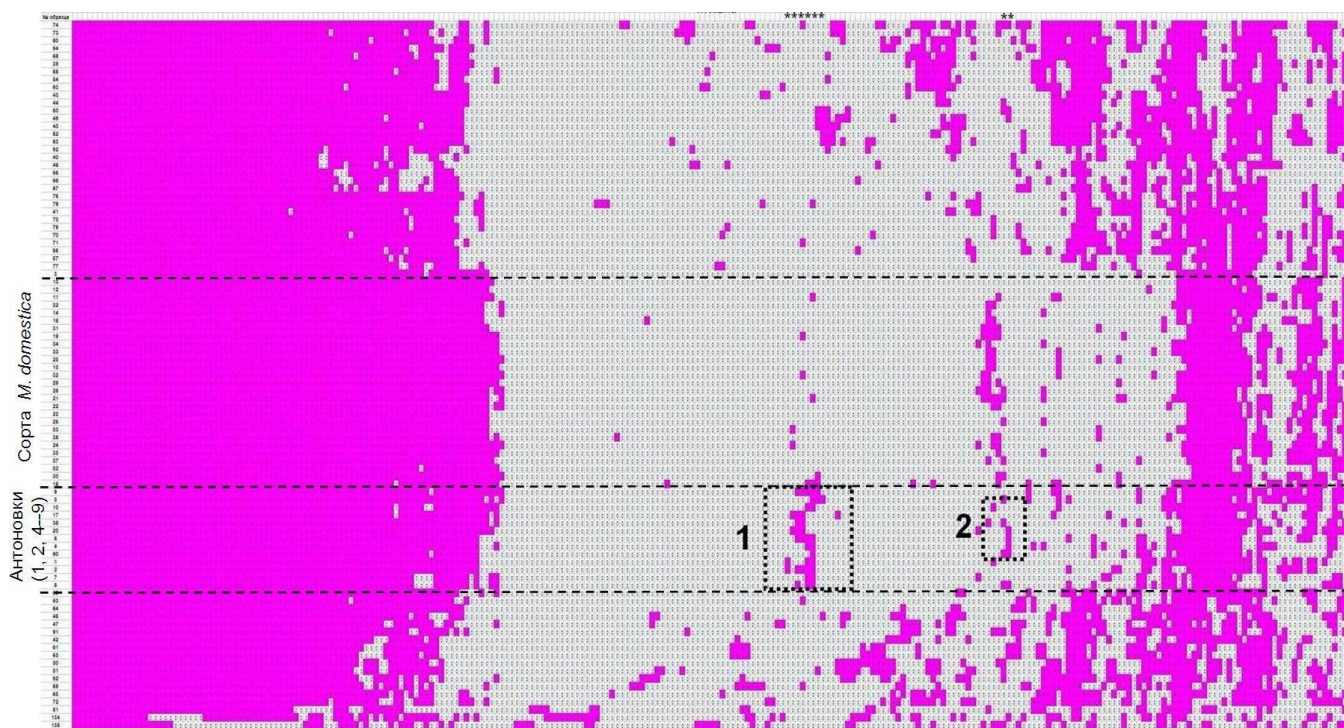


Рис. 7. Матрица, полученная методом двумерного кластерного анализа по данным NBS-профайлинга образцов рода *Malus*. Пунктиром выделены уникальные фрагменты сортов народной селекции Антоновок

Дальнейшее исследование этих уникальных фрагментов, вероятно, позволит выявить новые гены устойчивости к заболеваниям яблони, что послужит логическим продолжением данной работы. Таким образом, Антоновки могут быть рекомендованы

для использования в маркер-опосредованной селекции (MAS) при создании новых более устойчивых к заболеваниям сортов яблони.

Данные, полученные в результате NBS-профайлинга, во многом подтверждают и дополняют данные, полученные нами ранее в результате исследований образцов рода *Malus*. Метод NBS-профайлинга может успешно применяться для анализа полиморфизма последовательностей семейства NBS-LRR генов устойчивости у видов рода *Malus* и, в целом, для изучения генетического разнообразия рода *Malus*.

Обсуждение полученных материалов

Нами было проведено изучение генетического разнообразия рода *Malus* при помощи различных видов молекулярного анализа. Полученные результаты были обработаны, проанализированы, проведено сравнение с ранее выполненными исследованиями по генетической вариабельности рода, уточнены некоторые вопросы филогении и систематики рода.

Для исследования было использовано несколько различных маркерных систем (AFLP, S-SAP, NBS-профайлинг), а также был использован метод анализа секвенированных последовательностей района транскрибируемого спейсера ITS1 и гена 5.8S. Мы были заинтересованы не только в получении определенных результатов по филогении и систематике яблони, но и в сравнении самих молекулярных методов анализа для выявления наиболее информативного и надежного. Также в задачи исследования входило создание рекомендаций по использованию диких видов и сортов яблони в маркер-опосредованной селекции для выведения новых, более устойчивых сортов яблони домашней. Каждый метод давал достоверные, информативные, воспроизводимые результаты.

Наиболее полиморфными оказались S-SAP-маркеры (95,9%), AFLP-маркеры (90,2%). NBS-маркеры, основанные на последовательностях NBS-LRR генов устойчивости, показали также высокий уровень межвидового полиморфизма (79%). Невысокий уровень полиморфизма (14%) был обнаружен для секвенированных последовательностей района транскрибируемого спейсера ITS1 и гена 5.8S, данный район оказался недостаточно вариабельным у изученных образцов рода *Malus*.

PCO-анализ по данным AFLP, S-SAP и NBS-профайлингу также дал сходные результаты, отражающие эволюционные и таксономические взаимоотношения в роде *Malus*. На полученных диаграммах можно выделить несколько облаков концентрации образцов, обозначенные в работе как группы, включающие представителей пяти различных секций рода *Malus* (*Malus*, *Sorbomalus*, *Cloromeles*, *Gymnomeles*, *Docyniopsis*). Однако в целом все исследованные образцы слабо генетически дифференцированы.

Таким образом, была подтверждена правомерность использования традиционной классификации рода *Malus*, основанной на морфологических и эколого-географических критериях. Положение гибридных видов на каждой диаграмме подтверждает их происхождение.

Положение сортов народной селекции Антоновок на диаграммах различается. Так, в результате РСО-анализа по данным NBS-профайлинга некоторые Антоновки занимают обособленную позицию в группе А, в то время как на диаграммах по AFLP- и S-SAP-маркерам Антоновки расположены вместе с сортами яблони домашней *M. domestica*. NBS-маркеры достоверно показали, что сорта народной селекции Антоновки обладают уникальным набором генов устойчивости к заболеваниям, отличающимся от яблони домашней. Этот результат особенно важен для главного метода молекулярной селекции – маркер-опосредованной селекции (Marker assisted selection – MAS). Разработка NBS-маркеров особенно важна для поиска генов, контролируемых хозяйственно-ценные признаки, главным из которых в настоящее время является устойчивость к различным заболеваниям яблони.

В целом, полученные нами результаты показали, что только комплексное использование различных методов молекулярно-генетического анализа для изучения генетического разнообразия рода *Malus* дает достоверные практические результаты, которые также могут найти применение в селекционном процессе выведения новых сортов яблони.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе настоящей работы был проведен анализ внутривидового и межвидового генетического разнообразия образцов рода *Malus* из отечественных коллекций при помощи высокоинформативных AFLP-, S-SAP- и NBS-маркеров с последующей оценкой родственных связей и уточнением вопросов филогении и систематики внутри рода. Также в ходе работы впервые были секвенированы и проанализированы последовательности района транскрибируемого спейсера ITS1 и гена 5.8S рРНК у образцов рода *Malus* отечественных коллекций.

Сравнительный анализ полученных результатов показал, что в целом традиционная классификация рода *Malus*, основанная на морфологических и эколого-географических критериях, может быть использована в дальнейшем для систематики яблони.

Сделаны уточнения по филогенетическим отношениям внутри рода *Malus*. Были даны рекомендации по рациональному использованию генетического разнообразия рода в селекционных программах при выведении новых более устойчивых к заболеваниям сортов яблони. Так, особое внимание было также уделено генетическому разнообразию и филогенетическому статусу отечественных сортов народной селекции Антоновок, которые могут послужить новыми источниками хозяйственно-ценных признаков в селекции яблони.

ВЫВОДЫ

1. Используемые в работе ДНК-маркеры оказались эффективными для анализа внутривидового и межвидового генетического разнообразия в роде *Malus*. Наиболее

полиморфными оказались S-SAP- (95,9%) и AFLP-маркеры (90,2%). NBS-маркеры показали также высокий уровень межвидового полиморфизма (79%). Секвенированные последовательности района ITS1 – 5.8S. показали невысокий уровень полиморфизма (14%).

2. Анализ генетического разнообразия рода *Malus* с использованием ДНК-маркеров показал, что род в целом распадается на четыре группы истинных видов. При этом распределение по группам по генетическим признакам соответствует традиционной ботанической систематике, основанной на морфологических и эколого-географических критериях.
3. Подтверждено гибридное происхождение ряда видов, образовавшихся на границах ареалов произрастания истинных видов.
4. Сорта народной селекции Антоновки достоверно относятся к виду яблоня домашняя *M. domestica*, секция *Malus*. Антоновки могут служить ценным генетическим материалом при создании новых более устойчивых сортов яблони, так как они, вероятно, обладают уникальным набором генов устойчивости, отличающим их от селекционных сортов яблони домашней.
5. Форма яблони Якутская достоверно относится к виду *M. baccata*, секция *Gymnomeles*.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи из перечня рецензируемых научных журналов:

1. Савельева, Е. Н. AFLP-анализ генетического разнообразия в роде *Malus* Mill. (Яблоня) / Е. Н. Савельева, А. М. Кудрявцев // Генетика. – 2015. – Т. 51. – № 10. – С. 1126–1133.
2. Савельева, Е. Н. Сравнительный анализ последовательностей внутреннего транскрибируемого спейсера ITS1 и рибосомного гена 5.8S у видов рода *Malus* / Е. Н. Савельева, Е. З. Кочиева, А. М. Кудрявцев // Генетика. – 2013. – Т. 49. – № 11. – С. 1345–1352.

Тезисы докладов:

1. Savelyeva, E. Analysis of structure ribosomal DNA spacer region (ITS1-5.8S gene) of the genus *Malus* / E. Savelyeva, K. Boris, E. Kocheiva, A. Kudryavtsev. – Plant Genetics and Breeding Technologies, Vienna International Plant Conference Association (VIPCA). Вена. – 2013. – С. 43.
2. Савельева Е. Н. Генетическое разнообразие рода *Malus* по сайтам интеграции LTR-ретротранспозонов AJ291492 и AY603367 / Е. Н. Савельева, А. В. Калегина, А. М. Кудрявцев. – VI Съезд ВОГиС и ассоциированные генетические симпозиумы. Ростов-на-Дону. – 2014. – С. 17-18.
3. Savelyeva E. N. Phylogenetic study of genus *Malus*. SSAP profiling / E. N. Savelyeva, A. M. Kudryavtsev. – XIV International Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics. Болонья. – 2015. – С. 147.