

Л.Ш. Шадманова¹ , Г.Т. Ситпаева², Н. Фризен^{3,4}

¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби,
Казахстан, г. Алматы, e-mail: laura_shadmanova@mail.ru

²Институт Ботаники и фитоинтродукции, Казахстан, г. Алматы

³Ботанический сад при Университете города Оснабрюк, Германия, г. Оснабрюк

⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова,
Россия, г. Москва

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ *MALUS SIEVERSII* ДЖУНГАРСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ *IN SITU* И *EX SITU* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ISSR-PCR МАРКЕРОВ

Плодовые леса Тянь-Шаня определены как географическая область распространения диких сородичей многих ценных сельскохозяйственных культур, в числе которых особый интерес ученых представляет *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem – яблоня Сиверса. Природные популяции *M. sieversii* Казахстана, обладающие широким диапазоном генетических и фенотипических вариаций признаков, все больше подвергаются антропогенному прессингу и переопылению с культурными сортами. Известно, что для эффективного сохранения и рационального использования генетических ресурсов, требуется тщательная оценка генетической изменчивости, которой они обладают. Генетическое разнообразие 13 сортов-клонов яблони Сиверса джунгарской популяции из интродукционной коллекции Главного ботанического сада г. Алматы (Казахстан) и 31 образец из трех популяций Джунгарского Алатау были изучены с использованием ISSR-PCR межмикросателлитных маркеров и программы iMEC. Для оценки генетических взаимоотношений между изученными образцами были вычислены показатели ожидаемой гетерозиготности и средняя гетерозиготность образцов. В качестве основных мер с помощью iMEC рассчитаны величина информационного полиморфизма (PIC); различающая способность (D), эффективное мультиплексное отношение (E), маркерный индекс MI и разрешающая способность (R). В ходе работы выявлено высокое генетическое разнообразие как сорт-клонов, так и образцов *M. sieversii*, отобранных из обследованных нами ущелий. В результате PCA анализа изученные сорт-клоны и образцы *M. sieversii* из природных популяций образовали одно облако, что указывает на генетический обмен между этими популяциями.

Ключевые слова: генетическое разнообразие, сорт-клоны яблони Сиверса, iMEC программа, ISSR-PCR, *Malus sieversii*, PCA анализ.

L.Sh. Shadmanova^{1,2}, G.T. Sitpayeva², G. Mukanova², N. Friesen^{3,4}

¹Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty, e-mail: laura_shadmanova@mail.ru

²Sitpayeva Gulnara, Institute of Botany and Phytointroduction, Kazakhstan, Almaty

³Nikolai Friesen, Botanical Garden, University of Osnabruck, Germany, Osnabruck

⁴I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Russia, Moscow

Evaluation genetic diversity of *Malus sieversii* of Dzungarian populations using ISSR-PCR markers

Fruit forests of Tien Shan are the centre of origin of several plant species. In this geographical region, many economically valuable species are distributed, such as *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem. – Sievers apple tree. The natural populations of *M. sieversii* of Kazakhstan with a wide range of genetic and phenotypic variations of characters are increasingly subjected to anthropogenic pressure and genetic erosion. It is known that for the effective conservation and rational use of genetic resources, a thorough assessment of the genetic variation that they possess is required. The genetic diversity of 13 clone varieties of *M. sieversii* of the Dzungarian population of The Main botanical garden's introduction collection in Almaty (Kazakhstan) and 31 samples from three populations was assessed using 8 polymorphic ISSR markers and iMEC program. To assess the genetic relationships between the studied samples, the expected heterozygosity and average heterozygosity of the samples were calculated. As basic measures, the polymorphism information content (PIC), distinguishing ability (D), effective multiplex ratio (E), marker index MI and resolution (R) were calculated using iMEC. The work revealed a high genetic diversity of

clone varieties and samples of the Dzungarian population. As a result of PCA analysis, the studied variety clones and *M. sieversii* samples from natural populations formed one cloud, which indicates a genetic exchange between these populations.

Key words: Clone-varieties of Sievers apple tree, iMEC program, ISSR-PCR, genetic diversity, *Malus sieversii*, PCA analysis.

А.Ш. Шадманова¹, Г.Т. Ситпаева², Н. Фризен^{3,4}

¹Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.,
e-mail: laura_shadmanova@mail.ru

²Ботаника және фитоинтродукция институты, Қазақстан, Алматы қ.

³Оснабрюк қаласы Университетінің Ботаникалық бағы, Германия, Оснабрюк қ.

⁴И.М. Сеченов атындағы бірінші Мәскеу мемлекеттік медицина Университеті, Ресей, Мәскеу қ.

ISSR-PCR маркерлерін қолдана *Malus sieversii* Жоңғар популяциясының генетикалық алуантүрлілігін бағалау

Тянь-Шань тауларының жемісті ормандары көптеген құнды дақылдардың жабайы туыстарының географиялық таралу аймағы ретінде анықталған, ал олардың арасында ерекше қызығушылық тудыратын *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem – Сиверс алмасы. Генетикалық және фенотиптік белгілердің кең өзгергіштігіне ие *M. sieversii* түрінің табиғи популяциялары шамадан тыс антропогендік әсерге және мәдени сорттармен тозандануға соңғы кездері жиі ұшырауда. Генетикалық ресурстарды тиімді сақтау және дұрыс пайдалану үшін биологиялық алуантүрлілікті мұқият бақылау қажет екендігі белгілі. Жоңғар Алатауы Сиверс алма популяциясынан Алматының Бас ботаникалық бағына жерсіндірілген коллекциясының 13 сорт-клонының генетикалық алуантүрлілігі және Жоңғар Алатауының үш табиғи популяциясынан жиналған 31 нысаны ISSR-PCR микросаттелит аралық маркерлері мен iMEC бағдарламасы арқылы зерттелді. Зерттелген үлгілердің генетикалық байланысын бағалау үшін күтілетін гетерозиготалығы мен нысандардың орташа гетерозиготалығы есептелді. Негізгі өлшемдер ретінде ақпараттық полиморфизм мәні (PIC), маркердің айыру қабілеті (D), мультиплексті тиімді коэффициенті (E), MI маркер индексі және ажыратымдылық (R) iMEC көмегімен есептелді. Жұмыс барысында біз қарастырған шатқалдардан іріктелген *M. sieversii* нысаналары мен жерсіндірілген коллекция нысаналарының генетикалық әртүрлілігі анықталды. PCA талдауының нәтижесінде зерттелген сорт-клондар мен *M. sieversii* табиғи популяция нысандары бірегей бұлтты құрады, бұл осы популяциялар арасында генетикалық алмасу орын алатындығын көрсетеді.

Түйін сөздер: генетикалық алуантүрлілік, Сиверс алмасының сорт-клондары, iMEC бағдарламасы, ISSR-PCR, *Malus sieversii*, PCA талдау.

Введение

В связи с растущими требованиями к защите окружающей среды и безопасности пищевых продуктов при производстве высококачественных яблок, на сегодняшний день современная селекция яблонь становится все чаще зависимым от устойчивых генных ресурсов дикорастущих видов рода *Malus* Mill. [1]. Плодовые леса Тянь-Шаня определены как географическая область распространения диких сородичей многих ценных сельскохозяйственных культур, в числе которых особый интерес ученых представляет *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem – яблоня Сиверса [2, 3]. Яблоня Сиверса считается эндемиком Центральной Азии [4, 5] и идентифицирован как главный прародитель культурной яблони – *Malus x Domestica* [6 –10] на основании значительного сходства морфологических признаков плодов и форм деревьев, а также генетических данных.

Согласно флоре Казахстана и международной ботанической номенклатуре дикорастущий вид *M. sieversii* относится к роду *Malus* Mill. к семейству *Rosaceae* отряда *Rosales* класса *Magnoliopsida* [11, 12]. Ареалом распространения *M. sieversii* являются горные районы Казахстана, Кыргызстана, Узбекистана, Западного Китая [4, 13, 14, 15]. В Казахстане природные популяции вида встречаются в Заилийском, Джунгарском, Киргизском Алатау, в Каратау, в Таласском Алатау, самая северная точка ареала – Тарбагатай. Сплошные лесные массивы дикой яблони встречаются в казахстанской части Джунгарского Алатау, где оптимальные условия для их роста и плодоношения наблюдаются по северным склонам на высотах 900-1500м, а по южным склонам 1200-1600м над уровнем моря. Все представители вида – деревья до 12-14 м в высоту, с серо-коричневым или темно-серым стволом, имеют весьма разнообразные плоды по форме, окраске, вкусу и биохимическому составу.

Природные популяции *M. sieversii* Казахстана, обладающие широким диапазоном генетических и фенотипических вариаций признаков, все больше подвергаются антропогенному прессингу и переопылению с культурными сортами. За последние десятилетия площадь распространения яблони Сиверса сократилась в Джунгарском Алатау – на 30 %, а в Заилийском Алатау на 70%.

В настоящее время выделены генетические резерваты *M. sieversii* в естественных местах обитания, а также создан уникальный коллекционный фонд дикой яблони Сиверса на территории Главного ботанического сада г. Алматы (ГБС). Для создания интродукционной коллекции в качестве привоя по фенотипу были отобраны формы яблони Сиверса, ценные с практической точки зрения из естественных популяций горных лесов Республики еще в прошлом столетии и доведены до сортов-клонов методом окулировки на подвой яблони Сиверса. По мнению А. Д. Джангалиева [16], в условиях риска сокращения генетического разнообразия популяций *M. sieversii* важнейшими мерами их охраны является восстановление естественной генетической структуры популяций, что предполагает определенность формовой принадлежности каждого саженца, используемого в лесовосстановлении. Известно, что для эффективного сохранения и рационального использования генетических ресурсов, требуется тщательная оценка генетической изменчивости, которой они обладают [16].

Изучение генетического разнообразия основывается на морфологических, биохимических и молекулярных маркерах [17]. Молекулярные маркеры имеют значительные преимущества по сравнению с другими методами исследования, так как они более надежны, информативны и достоверны, к тому же факторы окружающей среды не влияют на полученный результат по молекулярным методам анализа [18]. В настоящее время особую актуальность приобретают исследования *M. sieversii* как в природных популяциях [13, 19-22], так и в искусственных ценозах [23, 24] с применением методов фрагментного анализа ДНК, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для выявления полиморфизма ДНК широко используются межмикросателлитные маркеры (ISSR, Inter-Simple Sequence Repeat). Маркеры ISSR представляют собой универсальную систему генетических маркеров для анализа наследуемых изменений на уровне ядерной ДНК и широко используются в исследованиях генетического полиморфизма популяций человека, растений и животных [17]. Метод до-

статочно хорошо воспроизводим и может быть применен для выявления внутривидовой и межвидовой изменчивости, идентификации видов, популяций, сортов, линий и иногда индивидов [25, 26].

В данной работе представлены результаты изучения внутривидового разнообразия и генетических характеристик форм *M. Sieversii* из природных ценопопуляций и интродуцированных в Главном ботаническом саду г. Алматы сортов-клонов с использованием ISSR-маркеров.

Материалы и методы

Объектом для молекулярных исследований являлись 44 образца *M. Sieversii*. Листья для проведенного анализа были собраны из интродукционной коллекции яблони Сиверса и трех ущелий Джунгарского Алатау (ущ. Пихтовая, ущ. Мушабай, ущ. Крутое). С помощью GPS навигатора отмечены координаты местоположения каждого дерева для последующих исследований. Собранный материал был высушен в силикагеле.

Для выделения и очистки ДНК из растительного материала были использованы наборы реагентов innuPREP Plant DNA kit (Analytikjena, Германия), следуя инструкции производителя. Рабочую ДНК хранили при +4... +8 °С, часть хранили в морозильной камере.

Концентрацию и качество полученной ДНК определяли с помощью прибора MaxLife personal gene analyzer H100 (Barnaul, Russia), согласно протоколу производителя. Для идентификации аллелей и генетической дифференциации были использованы межсателлитные ISSR-PCR маркеры. Амплификация проводилась на термоциклере Termocycler (Professional Biometra, Германия) по стандартной для ISSR-PCR методу программе: денатурация 94,0 °С в течении 01:30 мин., 35 циклов в следующей повторности: 94,0 °С на 40 сек., 45,0 °С на 45 сек., 72,0 °С на 1 мин.; затем финальный цикл элонгации при 72,0 °С в течение 6 мин. Конечный объем смеси образца для ПЦР составлял 30 мкл реакционной смеси, содержащей по 1 мкл ДНК, 1 ед. Taq-полимеразы, 3 мкл стандартного 10x буфера [27], 2 мкл dNTPs, 1 мкл 10 пМ праймера, 22 мкл двойной $disH_2O$.

Амплифицированные фрагменты ДНК проверяли с помощью электрофореза на 1,5 % агарозном, окрашенном бромистым этидием геле, визуализировали под UV лучами на аппарате Gel i X20 Imager (INTAS science imaging, Germany) и документировали с помощью принтера Mitsubishi P93D (Mitsubishi Elec. Corp., Japan).

Таблица 1 – ISSR праймеры и их статистические параметры

Праймер	Последовательность 5' – 3'	ОКФ*	КПФ*	Полиморфизм	H_E	PIС	EMR	H_{AVP}	MI	R
GR ₂₁₅	(CA) ₆ GT	22	21	95,5 %	0.45	0.39	7.61	0.00046	2.96	8.22
ISSR-1	(AC) ₈ T	14	13	95,5 %	0.48	0.37	5.79	0.00078	2.14	6.5
GR ₂₁₂	(CT) ₈ TG	12	10	83,3 %	0.47	0.38	4.72	0.0009	1.79	5.45
HB ₁₀	(GA) ₆ GG	19	15	78,9 %	0.42	0.4	13.1	0.00051	5.23	7.54
HB ₁₂	(CAC) ₃ GC	17	17	100 %	0.49	0.37	8.86	0.00066	3.28	8.91
UBC ₈₂₈	(TG) ₇ TA	15	14	95,5 %	0.44	0.39	5.06	0.00067	1.97	7.41
MAO	(CTC) ₄ RC	25	23	92 %	0.48	0.38	8.86	0.00049	3.36	9.72
UBC ₈₀₉	(AG) ₈ G	10	6	60 %	0.49	0.37	4.86	0.00114	1.76	3.73
Всего		134	119							
Средний уровень полиморфизма				87,6 %						

ОКФ* – общее количество фрагментов, КПФ* – количество полиморфных фрагментов

В ходе анализа составляли матрицу для обработки полученных электрофоретических спектров в программе Microsoft Excel на основе присутствия (1) или отсутствия (0) ампликонов одинаковой длины путем прикладывания линейки для каждого образца на фотографии электрофорезного геля. Были рассмотрены только четкие ISSR фрагменты с хорошей повторяемостью от 500 до 3500 б. п. длиной.

Матрицу проанализировали с помощью программы R ver. 3.2.2 (R Development Core Team 2008) на основе которого был проведен PCA-анализ (PCA- Principal component analysis).

На основании частот фрагментов ДНК также были вычислены основные показатели уровня генетического разнообразия образцов дикой яблони из Джунгарского Алатау с использованием программы iMEC (Online Marker Efficiency Calculator) (A. Amiryousefi et al., 2018). В качестве основных мер iMEC рассчитывает индекс гетерозиготности (H_E); величину информационного полиморфизма (PIС); различающую способность (D), эффективное мультиплексное отношение (E), маркерный индекс MI, среднее арифметическое значение гетерозиготности ($H_{авр}$) и разрешающую способность (R).

Результаты и обсуждение

Для подбора праймеров проводили экспериментальную амплификацию с использованием пяти образцов яблони Сиверса. Из 15 проте-

стированных маркеров 8 продемонстрировали высокий полиморфизм. В нашем исследовании ряд таких праймеров как 818, X10, M27, AGC6G, CA8R почти не амплифицировали полиморфных фрагментов (рис.1).

В результате использования наиболее эффективных 8 ISSR-PCR маркеров (табл. 1) на 44 образцах было идентифицировано 124 полиморфных ISSR фрагментов из 134 проанализированных ампликонов. В зависимости от праймера выявлено от 10 до 25 амплифицированных фрагментов ДНК (бэндов), размеры фрагментов варьировали от 500 до 3500 п.н. Праймер MAO оказался наиболее полиморфным. Минимальное количество фрагментов отмечено с использованием праймера UBC809, как и наименьшее число полиморфных локусов (60%). Наибольшее число полиморфных локусов у анализированных образцов выявлено с праймерами UBC828, HB12, GR215, составивших 95,5-100 % полиморфизма. В среднем уровень полиморфизма ISSR локусов, выявленный с помощью 8 праймеров, составил 87,6%. (табл. 3). ISSR-маркирование сортов-клонов выявило 115 фрагментов, их которых 91 были полиморфными ($P = 0,791$). Анализ электрофореграммы природной популяции яблони Сиверса показало 131 выявленных фрагментов ДНК, из которых 121 были полиморфными ($P = 0,923$).

Одним из основных параметров, определяющих меру информативности маркеров, является величина информационного полиморфизма (PIС). Значение PIС определяется способностью марке-

ра устанавливать полиморфизм в популяции в зависимости от количества обнаруженных аллелей и частоты их распределения [28]. Из чего следует, что значение PIC выявляет дискриминационную

способность маркера, которая равнозначна разнообразию гена. Для доминантных маркеров, таких как межмикросателлитные ISSR маркеры, значение PIC изменяется от 0 до 0,5.

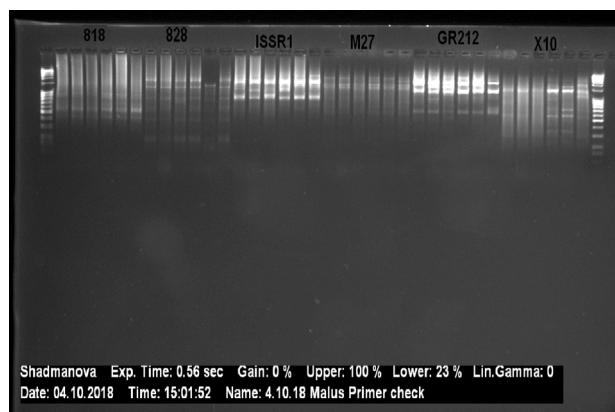


Рисунок 1 – Детекция амплифицированных фрагментов при тестировании ISSR маркеров (818, 828, ISSR1, M27, GR212, X10)

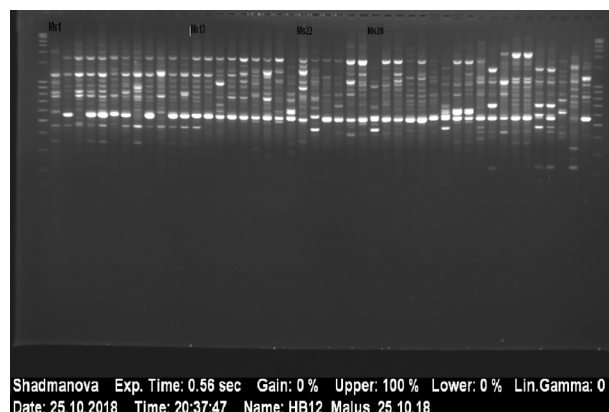


Рисунок 2 – Детекция амплифицированных фрагментов с помощью маркера HB12

В нашем исследовании значение PIC варьировало от 0.37 до 0.4 и в среднем составило 0.38. Наибольшее значение индекса выявлено для маркера HB10.

Также для 8 протестированных ISSR-PCR маркеров с помощью программы iMEC были подсчитаны значения эффективного мультиплексного отношения E (Effective multiplex ratio), маркерный индекс MI (Marker index). Параметры EMR и MI широко используются в многочисленных исследованиях с целью выявления информативного потенциала молекулярных маркеров [29]. Получены данные среднего арифметического значения гетерозиготности H_{AVR} (Mean heterozygosity), разрешающая способность R (Resolving power), а также индекс гетерозиготности H_E (Expected heterozygosity), где ожидаемая гетерозиготность определялась согласно формуле $H = 1 - \sum p_i^2$ (P_i – частота встречаемости аллелей). Ожидаемую гетерозиготность обычно определяют, когда описывают генетическое разнообразие, поскольку она менее чувствительна к размеру выборки, чем наблюдаемая гетерозиготность [30].

Для оценки генетических взаимоотношений между изученными образцами были вычислены показатели ожидаемой гетерозиготности и средняя гетерозиготность образцов. В данном исследовании максимальные значения H_E и H_{AVR} составили 0.49 и 0.00113 соответственно, выяв-

ленные праймером UBC 809. В соответствии с данными можно заключить, что изученные популяции инбредные и между выбранными образцами идет переопыление.

Показатели MI (Marker index) и E (Effective multiplex ratio) результатов нашего исследования варьировали от 1.76 до 5.23 и от 4.72 до 13.1, в среднем составили 2.81 и 7.35 соответственно. Максимальные значения индекса MI и EMR выявлены праймером HB 10, что показывает его информативность; минимальные значения – праймерами UBC 809 и GR 212 соответственно.

Для всех проанализированных ампликонов разрешающая способность R составляла 3.7–9.7, в среднем – 7.17. Наименьшее значение R установлено праймером UBC 809, наибольшее – MAO. Маркерные системы являются молекулярно-генетическим инструментом, способным устанавливать различия между множеством генотипов. R применяется для оценки дискриминационной способности молекулярных систем для большинства видов растений. В настоящей работе установлена корреляционная связь R с числом амплифицированных и полиморфных фрагментов.

На основе параметров, определяющих меру информативности маркеров, полученные результаты указывают на высокий молекулярно-генетический полиморфизм изученных образцов и подтверждают перспективность использова-

ния ISSR-PCR маркеров для установления генетических различий внутри вида. Использование ISSR-PCR маркеров отечественных исследователей [31] для изучения генетического разноо-

бразия образцов листьев яблони Сиверса также показали хороший результат и подтвердили эффективность применения межмикросателлитных маркеров.

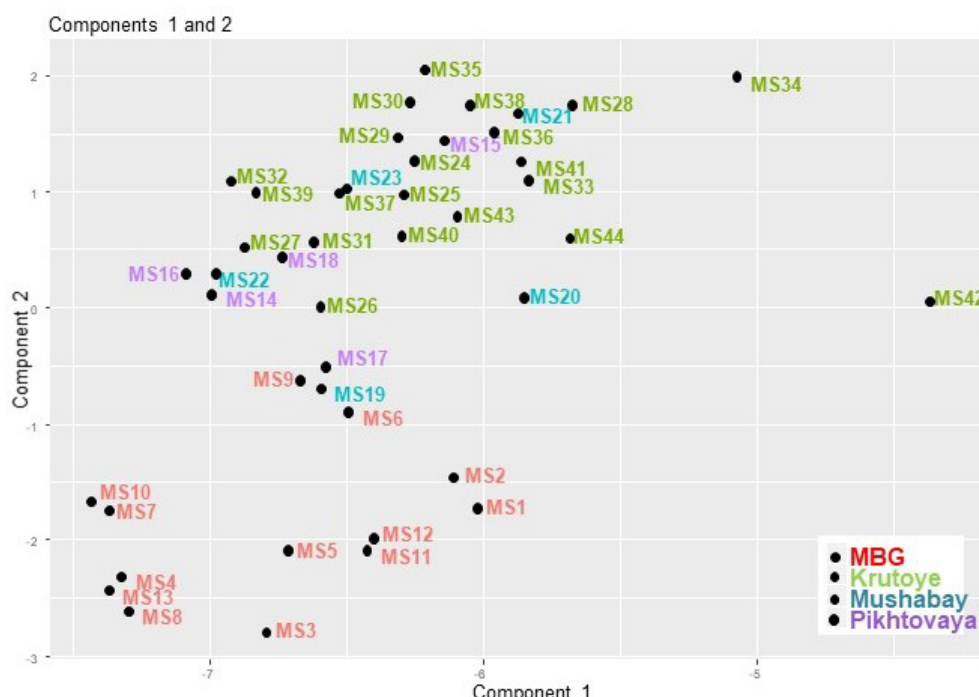


Рисунок 3 – Распределение изученных образцов с помощью анализа главных координат (PCA)

Анализ главных координат (PCA – Principal component analysis) для 44 образцов яблони Сиверса на основе ISSR матрицы показал, что 2 образца, произрастающие близко к проезжей части в популяции «Крутое» Джунгарского Алатау отделились от общего облака (Ms34 и Ms42), все остальные изученные образцы образуют более-менее неразорванное облако, в котором все сорто-клоны группируются вместе. Согласно PCA анализу образцы из природных популяций частично перемешаны, что указывает на генетический обмен между этими популяциями (Рис. 3). Аналогичные результаты были получены Омашевой и др. при использовании SSR маркеров [32], что подтверждает вероятную гибридизацию в природных популяциях дикой яблони с культурными сортами в зависимости от высоты расположения данной популяции.

Заключение

В результате изучения генетического разнообразия интродуцированных сортов-клонов

и природных форм яблони Сиверса Джунгарской популяции с использованием молекулярных маркеров выявлено, что изученные образцы отличаются широким диапазоном вариабельности как *in situ*, так и *ex situ*, что объясняется их биолого-экологическими особенностями. В результате использования 8 ISSR-PCR маркеров выявлен высокий уровень молекулярно-генетического полиморфизма внутри вида *M. sieversii*, констатирующий об информативности использованных маркеров в данном исследовании. Значение PIC, идентифицирующее дискриминационную способность маркера и эквивалентное разнообразию гена варьировало от 0.37 до 0.4 и в среднем составило 0.38. Наибольшее значение индекса выявлено для маркера HB10. Установлена корреляционная связь разрешающей способности маркера (R – resolving power) с числом амплифицированных и полиморфных фрагментов.

Дендрограмма, построенная с помощью PCA анализа показала, что все изученные сорто-клоны *M. sieversii* имеют генотип, аналогичный

формам из природных популяций Джунгарского Алатау, свидетельствующий об общем их географическом происхождении, но также выявляе-
но неравномерное генетическое распределение изученных образцов, указывающее на искусственную конструкцию генотипа сорто-клонов.

Литература

- 1 Crosby JA, Janick J, Pecknold PC, Korban SS, O'Connor PA, Ries SM, Goffreda S, Voordeckers A (1992) Breeding apple for scab resistance. *Acta Hort* 317: 43-70
- 2 Вавилов Н.И. (1931a) Дикие родичи плодовых деревьев азиатской части СССР и Кавказа и проблема происхождения плодовых деревьев // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. Т. 26. вып. 3. С. 132-134.
- 3 Dzhangaliev, A.D. (2003) The wild apple tree of Kazakhstan. *Hort. Rev.* 29: 65–304.
- 4 Luby, J.; Forsline, P.; Aldwinckle, H.; Bus, V.; Geibel, M. (2001) Silk road apples—Collection, evaluation, and utilization of *Malus sieversii* from Central Asia. *HortScience*. 36: 225–231.
- 5 Harris S. A., Robinson J. P., Juniper D. E. (2002) Genetic clues to the origin of the apple//Trend in genetic, Vol.18, №8. P. 426-430
- 6 Джангалиев А.Д. (1977) Дикая яблоня Казахстана. – Алма-Ата: Наука. 280 с.
- 7 Zhou Z. Q., Y.N. Li. (2000) The RAPD evidence for the phylogenetic relationship of the closely related species of cultivated apple. *Genet Res Crop Evol.* 47:353–357. DOI: 10.1023/A:1008740819941
- 8 Robinson J. P., Harris S. A., Juniper B.E. (2001) Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple, *Malus domestica* Borkh. *Plant Systematics and Evolution*. 226: 35-58. DOI:10.1007/s006060170072
- 9 Forsline P. L., Aldwinckle H. S., Dickson E. E., Hokanson S. C. (2003) Collection, maintenance, characterization, and utilization of wild apples from central Asia. *Hort. Rev.* 29:1–61.
- 10 Juniper B. and D. J. Maberley. (2006) The story of the apple. Portland, (OR): Timber Press, Portland – 511P.
- 11 Флора Казахстана / под ред. Н.В. Павлова: в 9 т. (1956, 1958, 1960, 1961, 1961, 1963, 1964, 1965, 1966). – Алма-Ата: Наука.
- 12 ICN. (2018) Терланд, Нью-Джерси, Wiersema, JH, Барри, FR, Greuter, W., Хоксворт, DL, Herendeen, PS, Knapp, S., Kusber, W.-H., Li, D.-Z., Marhold, K., Май, TW, McNeill, J., Монро, AM, Prado, J., Price, MJ & Smith, GF (eds.) Международный кодекс номенклатуры для водорослей, грибов и растений (Шэньчжэнь кодекс), принятый Девятнадцатый Международный ботанический конгресс Шэньчжэнь, Китай, июль 2017 года . *Regnum Vegetabile* 159. Glashütten: Koeltz Botanical Books. <https://doi.org/10.12705/>.
- 13 Yan G., H. Long, W. Song, and R. Chen. (2008) Genetic polymorphism of *Malus sieversii* populations in Xinjiang, China. *Genet. Resources Crop Evol.* 55:171–181. DOI: 10.1007/s10722-007-9226-5
- 14 Cornille A., Gladieux P., Smulders M. J. M., Roldan-Ruiz I., Laurens F., Le Cam B., Nersesyan A., Clavel J., Olonova M., Feugey L., Gabrielyan I., Zhang X.-G., Tenaillon M. I., Giraud T. (2012) New insight into the history of domesticated apple: Secondary contribution of the European wild apple to the genome of cultivated varieties. *PLoS Genet.* 8: e1002703. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002703
- 15 Zhang H., M. Zhang, L. Wang. (2015) Genetic structure and historical demography of *Malus sieversii* in the Yili Valley and the western mountains of the Junggar Basin, Xinjiang, China. *J Arid Land.* 7(2): 264–271. DOI: 10.1007/s40333-014-0044-2
- 16 Джангалиев А.Д., Салова Т.Н. (2007) Уникальное и глобальное значение генофонда яблоневых лесов Казахстана // Доклады НАН РК. –№5. – С.41-47.
- 17 Куцев М. Г. 2009. Фрагментный анализ ДНК растений: RAPD, DAF, ISSR. – Барнаул: Арктика, 2009. -164 с.
- 18 Binneck E., Nedel J.L., Dellagostin O. A. (2002) RAPD analysis on cultivar identification: a useful methodology? *Rev. Bras. Sem.* 24: 183-196
- 19 Zhang C, Chen X, He T, et al. (2007) Genetic structure of *Malus sieversii* population from Xinjiang, China, revealed by SSR markers. *Journal of Genetics and Genomics*, 34: 947–955. DOI: 10.1016/S1673-8527(07) 60106-4
- 20 Volk G. M., Richards C.M., Henk A.D., Reilley A. A., Miller D. D., Forsline P. L. (2009) Novel diversity identified in a wild apple population from the Kyrgyz Republic. *Hort. Science* 44:516-518. DOI: 10.21273/HORTSCI.44.2.516
- 21 Ситпаева Г.Т., Веселова П.В., Гемеджиева Н.Г., Грудзинская Л.М. и др. (2014) Комплексные исследования диких сородичей культурных растений Западного Тянь-Шаня // Тр. Инст. Ботаники и фитоинтродукции. – Алматы-194 с.
- 22 Omasheva M., Flachowsky H., Ryabushkina N., Pozharskiy A., Galiakparov N., Hanke M. (2017) To what extent do wild apples in Kazakhstan retain their genetic integrity? *Tree Genetics & Genomes*.13: 52. DOI: 10.1007/s11295-017-1134-z
- 23 Volk G. M., Richards C. M., Reilley A. A., Henk A.D., Forsline P.L., Aldwinckle H.S. (2005) Ex situ conservation of vegetatively propagated species: Development of a seedbased core collection for *Malus sieversii*.
a. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130: 203–210. DOI: 10.21273/JASHS.130.2.203
- 24 Richards C.M., Volk G.M., A.A. Reilley, A.D. Henk, D. Lockwood, P.A. Reeves, and P.L. Forsline. (2009b) Genetic diversity and population structure in *Malus sieversii*, a wild progenitor species of domesticated apple. *Tree Genet. Genomes* 5: 339–347. DOI: 10.1007/s11295-008-0190-9
- 25 Gupta M., Y-S. Chyi, J. Romero-Severson & J. L. Owen. (1994) Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* 89: 998–1006. DOI: 10.1007/BF00224530.

- 26 Фризен Н. (2007) Молекулярные методы, используемые в систематике растений. – Барнаул: АзБука, 2007. – С.33-34).
- 27 White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315–322. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00224530>
- 28 Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 32(3): 314–331.
- 29 Amirousetfi A, Hyyvönen J, Poczaí P. (2018) iMEC: Online Marker Efficiency Calculator. *Applications in Plant Sciences.* 6(6): e1159. DOI:10.1002/aps3.1159.
- 30 Чесноков Ю.В. Артемьева А.М. (2015) Оценка меры информационного полиморфизма генетического разнообразия. *Сельскохозяйственная биология. Том 50, №5, с. 571-578.* doi:10.15389/agrobiol. 2015.5.571rus
- 31 Бахтаулова А.С., Бекманов Б., Канагатов Ж.Ж. (2017) Молекулярно-генетический анализ разнообразия дикой яблони (*Malus sieversii* Ledeb. M. Roem.) с помощью ДНК-маркеров. *Вестник Карагандинского университета. Серия «Биология. Медицина. География».* №4(88). – С. 21-28.
- 32 Omasheva M., Pozharsky A. S., Smailov B. B., Ryabushkina N. A., Galiakparov N. N. (2018) Genetic Diversity of Apple Cultivars Growing in Kazakhstan. *Russian Journal of Genetics, Vol. 54, No. 2, pp.176–187.*

References

- 1 Crosby JA, Janick J, Pecknold PC, Korban SS, O'Connor PA, Ries SM, Goffreda S, Voordeckers A (1992) Breeding apple for scab resistance. *Acta Hort* 317: 43-70
- 2 Vavilov N. I. (1931b) *Dikie rodichi plodovoyh derevev // Tr. po prikl. botan., genet. i selektsii.* [The wild relatives of fruit trees of the Asian part of the USSR and Caucasus and the problem of the origin of fruit trees]. *Trans. Apple Bot. Gene Breed* 26(3):132–134.
- 3 Dzhangaliev, A.D. (2003) The wild apple tree of Kazakhstan. *Hort. Rev.* 29: 65–304.
- 4 Luby, J.; Forsline, P.; Aldwinckle, H.; Bus, V.; Geibel, M. (2001) Silk road apples—Collection, evaluation, and utilization of *Malus sieversii* from Central Asia. *HortScience.* 36: 225–231.
- 5 Harris S. A., Robinson J. P., Juniper D. E. (2002) Genetic clues to the origin of the apple//*Trend in genetic, Vol.18, №8. P. 426-430*
- 6 Dzhangaliev A. D. (1977) *Dikaja jablonja Kazahstana* [The wild apple of Kazakstan]. Nauka. Alma-Ata, 280 pp.
- 7 Zhou Z. Q., Y.N. Li. (2000) The RAPD evidence for the phylogenetic relationship of the closely related species of cultivated apple. *Genet Res Crop Evol.* 47:353–357. DOI: 10.1023/A:1008740819941
- 8 Robinson J. P., Harris S. A., Juniper B.E. (2001) Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple, *Malus domestica* Borkh. *Plant Systematics and Evolution.* 226: 35-58. DOI:10.1007/s006060170072
- 9 Forsline P. L., Aldwinckle H. S., Dickson E. E., Hokanson S. C. (2003) Collection, maintenance, haracterization, and utilization of wild apples from central Asia. *Hort. Rev.* 29:1–61.
- 10 Juniper B. and D. J. Mabberley. (2006) *The story of the apple.* Timber Press, Portland, (OR).
- 11 *Flora Kazakhstana / pod red. Pavlov N.V. (1956-1966)* [The Flora of Kazakhstan]. Alma-Ata, Nauka, T. 1-9. Alma-Ata, Science.
- 12 ICN. (2018) Turland, N. J., Wiersema, J. H., Barrie, F. R., Greuter, W., Hawksworth, D. L., Herendeen, P. S., Knapp, S., Kusber, W.-H., Li, D.-Z., Marhold, K., May, T. W., McNeill, J., Monro, A. M., Prado, J., Price, M. J. & Smith, G. F. (eds.) *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Shenzhen Code) adopted by the Nineteenth International Botanical Congress Shenzhen, China, July 2017.* *Regnum Vegetabile* 159. Glashütten: Koeltz Botanical Books. DOI <https://doi.org/10.12705/Code.2018>
- 13 Yan G., H. Long, W. Song, and R. Chen. (2008) Genetic polymorphism of *Malus sieversii* populations in Xinjiang, China. *Genet. Resources Crop Evol.* 55:171–181. DOI: 10.1007/s10722-007-9226-5
- 14 Cornille A., Gladieux P., Smulders M. J. M., Roldan-Ruiz I., Laurens F., Le Cam B., Nersesyan A., Clavel J., Olonova M., Feugey L., Gabrielyan I., Zhang X.-G., Tenaillon M. I., Giraud T. (2012) New insight into the history of domesticated apple: Secondary contribution of the European wild apple to the genome of cultivated varieties. *PLoS Genet.* 8: e1002703. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002703
- 15 Zhang H., M. Zhang, L. Wang. (2015) Genetic structure and historical demography of *Malus sieversii* in the Yili Valley and the western mountains of the Junggar Basin, Xinjiang, China. *J Arid Land.* 7(2): 264–271. DOI: 10.1007/s40333-014-0044-2
- 16 Dzhangaliev A. D., Salova T. N. (2007) *Unikalnoe i globalnoe znachenie genofonda yablonevyh lesov Kazakhstana // Doklady NAN RK.* [Unique and global knowledge of the apple forest genefund of Kazakhstan // Reports of RK NAS]. 5: 41-47.
- 17 Kutsev M. G. (2009) *Fragmentnyi analiz DNK rastenii: RAPD, DAF, ISSR.* [Fragment analysis of plant DNA: RAPD, DAF, ISSR]. *Arctika, Barnaul,* 164 pp.
- 18 Binneck E., Nedel J.L., Dellagostin O. A. (2002) RAPD analysis on cultivar identification: a useful methodology? *Rev. Bras. Sem.* 24: 183-196
- 19 Zhang C, Chen X, He T, et al. (2007) Genetic structure of *Malus sieversii* population from Xinjiang, China, revealed by SSR markers. *Journal of Genetics and Genomics,* 34: 947–955. DOI: 10.1016/S1673-8527(07)60106-4
- 20 Volk G. M., Richards C.M., Henk A.D., Reilley A. A., Miller D. D., Forsline P. L. (2009) Novel diversity identified in a wild apple population from the Kyrgyz Republic. *Hort. Science* 44:516-518. DOI: 10.21273/HORTSCI.44.2.516

- 21 Sitpaeva G.T., Veselova P.V., Gemedjjeva N.G., Grudzinskaya L.M. et al. (2014) Kompleksnyye issledovaniya dikih sorodichei kulturnyh rastenii Zapadnogo Tyan-Shanya // Tr. inst. Botaniki i phitointroduksii. [Comprehensive studies of wild relatives of cultivated plants of the Western Tien Shan // Works of the Institute of Botany and Phytointroduction, Almaty, pp. 194]. Almaty, 194pp.
- 22 Omasheva M., Flachowsky H., Ryabushkina N., Pozharskiy A., Galiakparov N., Hanke M. (2017) To what extent do wild apples in Kazakhstan retain their genetic integrity? *Tree Genetics & Genomes*. 13: 52. DOI: 10.1007/s11295-017-1134-z
- 23 Volk G. M., Richards C. M., Reilley A. A., Henk A.D., Forsline P.L., Aldwinckle H.S. (2005) Ex situ conservation of vegetatively propagated species: Development of a seedbased core collection for *Malus sieversii*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130: 203–210. DOI: 10.21273/JASHS.130.2.203
- 24 Richards C.M., Volk G.M., A.A. Reilley, A.D. Henk, D. Lockwood, P.A. Reeves, and P.L. Forsline. (2009b) Genetic diversity and population structure in *Malus sieversii*, a wild progenitor species of domesticated apple. *Tree Genet. Genomes* 5: 339–347. DOI: 10.1007/s11295-008-0190-9
- 25 Gupta M., Y-S. Chyi, J. Romero-Severson & J. L. Owen. (1994) Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* 89: 998–1006. DOI: 10.1007/BF00224530
- 26 Friesen N. (2007) Molekuljarnye metody ispolzuemye v sistematike rastenii. [Molecular methods using in Plant taxonomy]. *Azbuka, Barnaul*, 33-34 pp.
- 27 White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315–322. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00224530>
- 28 Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 32(3): 314–331.
- 29 Amiryousefi A, Hyvönen J, Poczai P. (2018) iMEC: Online Marker Efficiency Calculator. *Applications in Plant Sciences*. 6(6): e1159. DOI:10.1002/aps3.1159
- 30 Chesnokov Yu.B., Artemyeva A.M. (2015) Otsenka mery informatsionnogo polimorfizma geneticheskogo raznoobrazia [Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity]. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]* 50(5): 571-578. doi:10.15389/agrobiolgy.
- 31 Bahtaulova A.S., Bekmanov B., Kanagatov Zh. Zh. (2017) Molekuljarno-geneticheskii analiz raznoobrazia dikoi jabloni (*Malus sieversii* Ledeb. M. Roem.) s pomoshh'u DNK-markerov. *Vestnik Karagandinskogo universiteta. Seriya "Biologiya. Meditsina. Geografija"* [Molecular-genetic analysis of the wild apple tree (*Malus sieversii* Ledeb. M. Roem.) diversity based on DNA-markers] *Vestnik of KarGU.* 4(88): 21-28.
- 32 Omasheva M., Pozharskiy A. S., Smailov B. B., Ryabushkina N. A., Galiakparov N. N. (2018) Genetic Diversity of Apple Cultivars Growing in Kazakhstan. *Russian Journal of Genetics*, Vol. 54, No. 2, pp.176–187.