

На правах рукописи

ЗЕМЦОВА Анна Яковлевна

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И БИОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СОРТООБРАЗЦОВ
ОБЛЕПИХИ РАЗЛИЧНОГО ЭКОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ В КОЛЛЕКЦИИ НИИ САДОВОДСТВА СИБИРИ
ИМЕНИ М.А. ЛИСАВЕНКО**

Специальность 06.01.05 – селекция и семеноводство сельскохозяйственных
растений

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Барнаул – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт садоводства Сибири имени М.А. Лисавенко» (ФГБНУ «НИИСС») в 2014-2016 гг.

Научный руководитель: кандидат сельскохозяйственных наук
Зубарев Юрий Анатольевич

Официальные оппоненты: **Сорокопудов Владимир Николаевич**, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, ведущий научный сотрудник отдела генетики и селекции плодовых и ягодных культур ФГБНУ «Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства»

Брыксин Дмитрий Михайлович, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник отдела ягодных культур ФГБНУ «Федеральный научный центр имени И.В. Мичурина»

Ведущая организация: ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Защита диссертации состоится 29 июня 2017 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета ДМ 220.002.03. на базе ФГБОУ ВО «Алтайский государственный аграрный университет», ФГБНУ «Научно-исследовательский институт садоводства Сибири имени М.А. Лисавенко», ФГБНУ «Алтайский научно-исследовательский институт сельского хозяйства» по адресу: 656049 г. Барнаул, пр. Красноармейский, 98, тел./факс 8 (3852) 62-83-96, E-mail: agau@asau.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Алтайский государственный аграрный университет», с материалами по защите диссертации на сайте: www.asau.ru

Автореферат разослан « » мая 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Н.Н. Чернышева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Признанным мировым центром по селекции облепихи (*Hippophae rhamnoides* L.) является НИИ садоводства Сибири имени М.А. Лисавенко (далее – НИИСС). В настоящее время селекционерами института создано 49 сортов этой культуры, а коллекция института является одной из наиболее многочисленных в мире и насчитывает порядка 50 тысяч гибридных семян и более 700 сортообразцов. В геноме сортообразцов, представленных в коллекции НИИСС, присутствуют источники из различных эколого-географических провинций, в том числе с берегов алтайских рек Катунь, Чулышман, Чуя, из регионов Бурятии и Красноярского края, Киргизии, а также ряда европейских стран. Имеются сортообразцы, полученные с использованием химических мутагенов.

В то же время достоверных данных по геномному составу коллекции, ее видовой принадлежности, четкой научно обоснованной классификационной структуры до настоящего времени не представлено. Следует при этом отметить, что в мировых научных кругах сегодня существуют значительные разногласия в классификационно-систематической характеристике облепихи, что связано, в первую очередь, с недостатком генетических исследований по культуре. Особенно большие вопросы возникают в отношении подвида *Hippophae rhamnoides* ssp. *mongolica*, на основе которого получены все сорта селекции НИИСС, и который является наиболее перспективным с точки зрения промышленного использования не только в Сибири, но и во многих регионах земного шара. Решение этих вопросов крайне важно не только с целью непосредственной идентификации видов, подвидов, экотипов, сортов, но и, в первую очередь, для успешной дальнейшей селекции.

Облепиха является одной из наиболее ценных садовых культур с точки зрения биохимического состава. Известно, что для определения видовой принадлежности в ряде случаев используют не только генетические и морфологические признаки, но и данные биохимических исследований. Вопрос поиска определенных биологически активных компонентов, являющихся стабильными и зависящими в большей степени от генотипа, а не от условий окружающей среды, в настоящее время не потерял своей актуальности. Более того, детальная биохимическая характеристика группы сортообразцов в коллекции НИИСС, сама по себе представляет несомненный интерес в связи с растущей популярностью культуры во всем мире.

Цель исследований. На основе генетического и биохимического анализа сортообразцов облепихи различного эколого-географического происхождения, произрастающих в схожих почвенно-климатических условиях, установить степень генетического сходства между экотипами внутри подвида *Hippophae rhamnoides* ssp. *mongolica* в связи с необходимостью уточнения классификационной структуры, а также раскрыть потенциал биохимических показателей изучаемых экотипов для более эффективного их использования в селекционном процессе.

Задачи исследований:

1. Отработать методику ISSR-анализа для сортообразцов облепихи,

произрастающих в условиях умеренно засушливой колочной степи Алтайского края.

2. Провести ISSR-анализ образцов облепихи различного эколого-географического происхождения, произрастающих в схожих почвенно-климатических условиях на участках сортоизучения НИИСС.

3. Осуществить кластерный анализ результатов генетических исследований в связи с уточнением классификационной структуры сортообразцов облепихи коллекции НИИСС.

4. Изучить биохимический состав плодов облепихи различного эколого-географического происхождения.

5. Оценить потенциальную возможность использования отдельных элементов биохимического состава плодов облепихи для идентификации генотипов.

Научная новизна. Впервые отработана методика ISSR-анализа для сортообразцов облепихи, произрастающих в условиях лесостепи Алтайского края. На основе ISSR-анализа показана степень генотипического разнообразия образцов облепихи различного эколого-географического происхождения в коллекции НИИСС. Проведена сравнительная оценка биохимического состава плодов облепихи различного эколого-географического происхождения, произрастающих в схожих почвенно-климатических условиях. Впервые показан биохимический потенциал изучаемых экотипов облепихи по содержанию таких веществ, как витамины группы В, жирные кислоты, β -ситостерин, α -, β -, γ -, δ -токоферол, α -, β -каротин, лютеин и ликопин.

Защищаемые положения:

1) ISSR-маркирование является перспективным методом изучения генотипического разнообразия облепихи, произрастающей на Алтае;

2) подвид облепихи *Hippophae rhamnoides* ssp. *mongolica* представлен более мелкими классификационными единицами – экотипами, с определенной, свойственной такому уровню классификации, степенью генетического сходства.

Теоретическая и практическая значимость. Предложенная методика генетического анализа сортообразцов облепихи позволяет с высоким уровнем достоверности определять степень генетического сходства между растениями одного сорта, экотипа, подвида. Полученные в результате работы данные о генетическом разнообразии рода *Hippophae* L. могут быть использованы при решении вопросов систематики и филогении видов и подвидов рода *Hippophae* L. Работа дополняет собой развивающееся направление в области изучения генетической variabilityности рода *Hippophae* L. Биохимические исследования плодов облепихи представляют собой значимость для селекционного использования, в связи с установлением генотипов с ценным биохимическим составом плодов.

Апробация работы. Результаты исследований были доложены на Международной конференции «Ломоносовские чтения на Алтае: фундаментальные проблемы науки и образования» (Барнаул, 2015); в виде доклада для слушателей сельскохозяйственного факультета Университета Ганьсу (Ланьчжоу, Китай, 2016); на научно-практической конференции «Селекция плодовых и ягодных культур на современном этапе», посвященной 90-летию со

дня рождения академика РАН И.П. Калининой (Барнаул, 2016), заседаниях ученого совета ФГБНУ «НИИСС».

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе 2 в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК РФ.

Личный вклад соискателя. Работа выполнена автором самостоятельно при научном сотрудничестве по биохимическим исследованиям с коллективом лаборатории UBF GmbH (Германия). Генетические исследования осуществлены при научном сотрудничестве с коллективом лаборатории биоинженерии АлтГУ совместно с Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Все лабораторные исследования, анализ, интерпретация и представление информации проведены лично автором.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложений. Работа изложена на 171 странице машинописного текста, содержит 19 таблиц, 11 рисунков. Список литературы включает 184 источника, в том числе 86 на иностранных языках.

Автор выражает искреннюю благодарность и глубокую признательность своему научному руководителю канд. с.-х. наук Юрию Анатольевичу Зубареву за помощь и поддержку, оказанные при подготовке и написании диссертационной работы. Отдельная благодарность сотрудникам лаборатории UBF GmbH (Германия) и биоинженерии АлтГУ совместно с Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН за помощь в проведении биохимических и генетических исследований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Состояние изученности проблемы

В настоящем разделе диссертации представлен обзор литературы по описанию культуры и систематическом положении облепихи. Изложены молекулярные методы анализа и современное состояние молекулярно-генетических исследований рода *Hippophae* L. Рассмотрен биохимический состав плодов облепихи.

Глава 2. Условия, объекты и методы проведения исследований

2.1. Почвенно-климатические условия места проведения исследования

Почва опытного участка – чернозем выщелоченный среднесуглинистый среднегумусный среднесуглинистый. Климат резко континентальный с длинной суровой зимой и коротким жарким летом.

2.2. Погодные условия в период проведения исследований

Вегетационный период 2014 года был теплый и достаточно увлажненный (ГТК 1,3). ГТК вегетационного периода 2015 года составил 1,15, т.е. период был недостаточно увлажненный и жаркий. Обобщая метеоданные двух лет исследований, можно отметить, что за исключением осадков в летний период оба сезона были со схожими условиями.

2.3. Объекты и методы проведения исследований

Биохимические исследования проведены в 2014-2016 гг. в лаборатории технологии переработки плодов и ягод ФГБНУ «НИИСС», а также лаборатории UBF GmbH, Германия. В лаборатории UBF GmbH анализ проводили на материале, хранившемся 6 месяцев при температуре -25°C . Генетические исследования осуществлены в лаборатории биоинженерии АлтГУ совместно с Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН в 2014-2015 гг. на растительном материале, собранном в 2014 году.

Сбор материала для генетических и биохимических исследований осуществляли на территории экспериментально-производственного отделения НИИ садоводства Сибири имени М.А. Лисавенко в лесостепной зоне Алтайского края.

Объектом исследований служили 17 сортообразцов облепихи различного эколого-географического происхождения, в том числе и гибридного.

В пределах подвида *H. rhamnoides* ssp. *mongolica*:

- Дар Катуня, Новость Алтая – сорта, полученные среди сеянцев катунского экотипа (далее – катунский экотип);

- Чуйская, 35-61-2244 – сортообразцы, полученные среди сеянцев чуйского экотипа (далее – чуйский экотип) (сортообразец 35-61-2244 является мужским, в этой связи использовался только в генетическом блоке исследовательской работы);

- Иня, Елизавета – сорта, полученные в результате использования химического мутагенеза путем обработки семян сорта Пантелеевская (далее – мутанты);

- Великан, Янтарная – сорта, полученные от скрещивания сорта Щербинки-1 с сеянцами катунского экотипа (далее – саянско-катунский экотип);

- Живко, 42-68-2 – сортообразцы, полученные от скрещивания сортообразца Красноярская-22 с сеянцами саянского экотипа (далее – красноярско-саянский экотип);

- Любимая, Чулышманка – сорта, полученные от скрещивания сорта Щербинки-1 с сеянцами чулышманского экотипа (далее – саянско-чулышманский экотип);

- Заря Дабат – сорт бурятской селекции (далее – бурятский экотип);

Сортообразцы, не принадлежащие подвиду *H. rhamnoides* ssp. *mongolica*:

- КП-686 – сортообразец, полученный из Киргизии (ssp. *turkestanica*) (далее – киргизский экотип);

- Pollmix-1 – сортообразец немецкой селекции (ssp. *rhamnoides*) (далее – немецкий экотип) (является мужским сортом, в этой связи использовали только в генетическом блоке исследовательской работы);

- Гибрид-1 – сортообразец европейского происхождения, с условным названием «Ютландская» (ssp. *fluviatilis*) (далее – ютландский экотип);

- Гибрид-2 – сортообразец европейского происхождения с условным названием «Дунайская» (ssp. *carpatica*) (далее – дунайский экотип).

Генетическую вариабельность сортов выявляли с помощью ISSR-PCR метода (Inter-Simple Sequence Repeats PCR).

Выделение ДНК производили из 20-30 мг растительной ткани листа с помощью набора Diamond DNA (ООО «НПФ «Алтайбиотех») и Nucleospin Plant II на колонках в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Наличие ДНК в полученном растворе проверяли при помощи электрофореза. Для проведения ПЦР-анализа использовали реакционную смесь объемом 25 мкл, содержащую 15,5 мкл H₂O; 2,5 мкл 10X-буфера с 2,5 мкл 25 мМ MgCl₂; 2 мкл 10 мМ раствора праймера; 1 мкл 10 мМ dNTPs; 2 мкл Taq-полимеразы; 2 мкл ДНК. В качестве отрицательного (К-) контроля в реакционную смесь для проверки чистоты реактивов добавляли вместо ДНК 2 мкл деионизированной воды. Амплификацию проводили в термоциклере MyCycler BioRad с использованием реактивов производства ООО «Медиген» по следующей программе: предварительная денатурация 94°C – 3 мин.; в последующих 35 циклах 95°C – 10 сек.; 50°C – 45 сек.; 72°C – 1 мин. 30 сек.; завершающая стадия: 70°C – 7 мин., охлаждение при 4°C. Разделение продуктов амплификации производилось в 3%-ном агарозном геле и 0,5 М TAE-буфере в присутствии бромистого этидия при 50 В в течение 5 часов в горизонтальной электрофорезной камере Sub Cell GTSystem («Bio-Rad», USA). После электрофореза гели сфотографированы в системе гель-документации «Gel-Doc XR» («Bio-Rad», USA). Для компьютерной обработки полученные результаты представлены в виде матрицы бинарных данных. ISSR профили анализировали по наличию (1) или отсутствию (0) полос на геле. Компьютерный анализ молекулярно-генетического полиморфизма ДНК проведен с помощью компьютерных программ NTSYSpc 2.1, TFGA 1.3., Network 4.6. Для построения филогенетических деревьев на основе данных фрагментного анализа использовали UPGMA метод.

Для определения биохимических показателей в лаборатории технологии переработки плодов и ягод ФГБНУ «НИИСС» использованы следующие методы: содержание сахаров – методом прямого титрования из водной вытяжки (ГОСТ 13192–73); определение общей кислотности – титрованием децинормальной щелочью (ГОСТ 25555.0–82); растворимые сухие вещества – рефрактометрическим методом (ГОСТ 28262–90); аскорбиновая кислота – методом потенциометрического титрования (ГОСТ 24556–89); сумма каротиноидов – колориметрическим методом (ГОСТ 8756.22–80); определение масла с применением аппарата Сокслета (Ермаков, 1952).

Проведение биохимических анализов в лаборатории UBF GmbH Germany осуществляли в 2015 и 2016 гг. по методикам, используемых в странах Евросоюза.

Результаты обработаны методами математической статистики с использованием пакета прикладных программ Microsoft Office Excel 2007. Оценку коэффициента вариации признака проводили по шкале Зайцева (1973).

Глава 3. Молекулярно-генетический анализ сортообразцов облепихи коллекции НИИСС

Выделение ДНК является важным этапом выполнения генетического анализа, так как от качества и количества выделенной ДНК зависит успешность дальнейших этапов анализа. Качественный анализ выделенной ДНК проводился путем электрофореза в агарозном геле, который позволяет выявить степень

деградации. Исследования показали, что выделение ДНК с помощью набора Diamond DNA не дало ожидаемых результатов. Как видно из рисунка 1а, для всех изучаемых образцов наблюдался слабый уровень амплификации, выраженный в отсутствии четких фрагментов на электрофореграмме.

Выделение ДНК на колонках набором Nucleospin Plant II было наиболее качественным. При проведении электрофореза на электрофореграмме были видны четкие фрагменты (рисунок 1б).

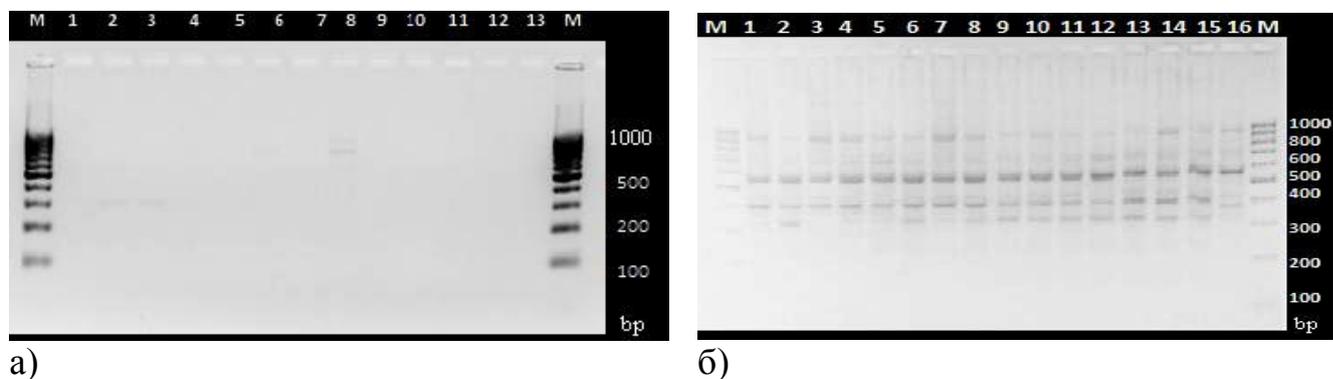


Рисунок 1 – Электрофореграмма PCR-ISSR: а) ДНК, выделенная с помощью набора Diamond DNA; б) ДНК, выделенная с помощью набора Nucleospin Plant II (цифрами обозначены номера проб, М – маркер молекулярной массы ДНК)

Протестировано 32 ISSR-маркера, из которых 6 дали воспроизводимый результат со всеми изученными образцами облепихи. Для проведения молекулярно-генетического анализа полиморфизма ДНК облепихи были отобраны следующие праймеры: UBC873, НВ12, НВ14, 814, 17899А, 17899В. Для улучшения качества получаемых электрофореграмм проводили подбор оптимальной температуры отжига праймеров. При этом для каждого праймера температуру отжига устанавливали в пределах от 45 до 55°C. Оптимальные температуры отжига для каждого праймера и количество амплифицированных фрагментов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Праймеры, использованные для изучения ДНК-полиморфизма образцов

Название праймера	Последовательность	T _m , °C	Размер фрагментов ДНК, п.н.	Количество амплифицированных фрагментов	Число полиморфных фрагментов	Уровень полиморфизма, %
UBC873	5'GACAGACAGACAGACA3'	53,3	200-1000	11	9	81,8
НВ12	5'CAACCACCGC3'	55,0	300-1000	10	6	60,0
НВ14	5'CTCCTCCTCGC3'	51,0	200-1000	8	6	75,0
814	5'CTCTCTCTCTCTCTTG3'	48,9	200-1000	6	2	33,3
17899А	5'CACACACACAAG3'	51,3	200-1000	11	4	36,4
17899В	5'CACACACACAGG3'	54,4	200-1000	10	8	80,0

В изученных образцах выявлено 56 амплифицированных ISSR-фрагментов ДНК, из которых 36 были полиморфными. Число амплифицированных фрагментов ДНК в общей выборке растений варьировало в зависимости от праймера от 6 (814) до 11 (UBC873, 17899А). В среднем при ISSR-анализе один праймер инициировал синтез 9 фрагментов ДНК.

Анализ полиморфизма фрагментов ДНК при использовании данных ISSR-маркеров оказался достаточно информативным методом, который позволил различить образцы облепихи. На основе полученных результатов была построена дендрограмма генетического сходства исследуемого материала.

На рисунке 2 представлена полученная UPGMA-филограмма, построенная с помощью программы NTSYSpc 2.1 (Rohlf, 1992).

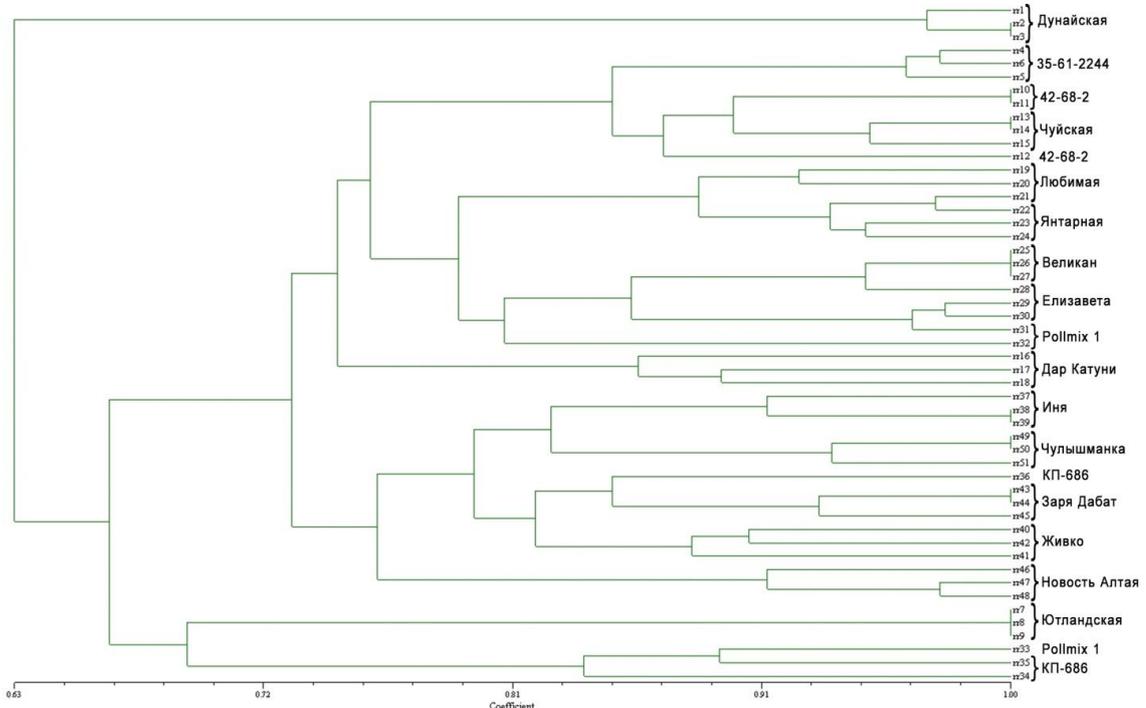


Рисунок 2 – UPGMA-филограмма, построенная на основе ISSR-данных для разных сортообразцов облепихи (NTSYSpc 2.1)

В результате проведенного анализа образцы, взятые с разных экземпляров растений одного и того же сорта, объединились в кластеры первого порядка. Именно этот факт, в первую очередь, определяет применимость используемого метода для определения генотипического сходства. Дальнейшая интерпретация результатов показывает, что в основном данные, представленные на анализируемой филограмме, лишь частично согласуются с нашей гипотезой, согласно которой вид разделяется на подвиды, а подвид *mongolica* – на разные экотипы. Действительно, первая часть гипотезы о разделении вида на подвиды полностью себя оправдывает. Так, дунайский экотип, относящийся к подвиду *H. rhamnoides* ssp. *carpatica* на полученном нами «дереве», выделился в отдельный кластер. Оставшиеся два кластера хорошо выделяются и легко интерпретируются. В пределах одного кластера оказались образцы ютландского (ssp. *fluviatilis*), киргизского экотипа (ssp. *turkestanica*) и сорт немецкой селекции Rollmix-1. В пределы второго крупного кластера вошли образцы, относящиеся к подвиду *mongolica*.

Вторая часть гипотезы, предполагающая разделение подвида *mongolica* на определенные экотипы, по данной филограмме доказывается не в полной мере. С одной стороны, это может быть связано с определенной гибридной составляющей объектов исследований, с другой, – с принципиальным отсутствием генетического различия. Единственной группой сортов в пределах экотипа,

вошедших в один близкий кластер внутри подвида *mongolica*, явились сорта чуйского экотипа. Примечательно при этом, что эта группа сортов является, условно говоря, «чистыми» представителями экотипа, отобранными напрямую из популяции и не подвергшиеся гибридизации. В то же время группа сортов Дар Катуня и Новость Алтая, также являющаяся «чистыми» представителями катунского экотипа, не вошли в близкие кластеры.

С целью альтернативного рассмотрения результатов полученная нами ранее бинарная матрица признаков была преобразована (наличие полосы представляется в виде «1», отсутствие – в виде «2») и проанализирована в программе TFPGA 1.3.

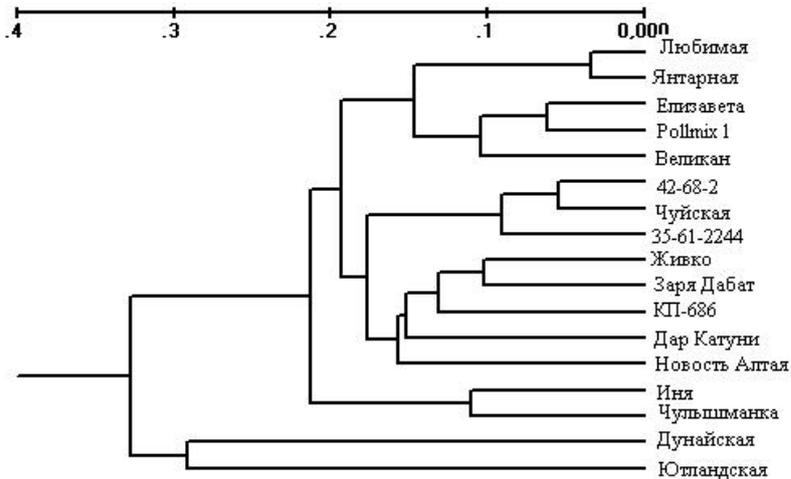


Рисунок 3 – UPGMA-филограмма, построенная на основе ISSR-данных для разных сортообразцов облепихи (TFPGA 1.3)

Полученная филогрaмма (рисунок 3) имеет сходство с филогрaммой, построенной в программе NTSYSpc 2.1, но в то же время имеет и определенные принципиальные отличия. Как и в первом случае, произошло разделение всех образцов на два больших кластера. Однако в данном случае в один кластер закономерно вошли сортообразцы дунайского и ютландского экотипов, принадлежащие к *ssp. carpatica* и *ssp. fluviatilis*, а во второй кластер – все остальные сортообразцы, в том числе и сортообразцы немецкого и киргизского экотипов. Этот факт является весьма интересным в связи с имеющимся морфологическим сходством между *H. rhamnoides ssp. mongolica* (русские сортообразцы), *H. rhamnoides ssp. rhamnoides* (немецкие сортообразцы) и *H. rhamnoides ssp. turkestanica* (киргизские сортообразцы). Возможно, эти подвиды более близки по происхождению, чем предполагалось ранее.

Другой примечательной особенностью данной филогрaммы является то, что внутри большого кластера, куда вошли все сорта, принадлежащие подвиду *mongolica*, обозначились три более мелких кластера. Первый из них объединяет ряд сортообразцов, в том числе Янтарная и Великан, относящиеся к саяно-катунскому подвиду. Во втором кластере, как и в первой филогрaмме, очень близко оказались сортообразцы из группы чуйского экотипа (Чуйская и 35-61-2244), а также катунского (Дар Катуня и Новость Алтая) и красноярско-саянского (42-68-2 и Живко) экотипов.

В третий кластер объединились сорта из разных экотипов – Чулышманка (саяно-чулышманский экотип) и Иня (сорт, полученный в результате использования химического мутагенеза путем обработки семян сорта Пантелеевская).

Таким образом, UPGMA-филограмма, построенная в программе TFPGA 1.3. оказалась гораздо ближе к доказательству нашей гипотезы о разделении подвида *mongolica* на отдельные экотипы.

Подводя итог проделанной работе в части генетического анализа сортообразцов облепихи различного эколого-географического происхождения, следует отметить, что в первую очередь нами показана принципиальная применимость метода ISSR-анализа при изучении генетического разнообразия облепихи, произрастающей на Алтае. При разных подходах к интерпретации полученных данных прослеживаются очевидные различия между такими подвидами облепихи, как *mongolica*, *carpatica* и *fluviatilis*. Внутри подвида *mongolica* нам не удалось установить достоверных различий между экотипами. Вместе с тем чуйский и катунский экотипы показали высокий уровень генетического сходства, выделившись в отдельные кластеры. Полагаем, что определенные расхождения на филограммах вызваны, прежде всего, гибридным происхождением целого ряда сортообразцов.

Безусловно, полученные данные носят предварительный характер и могут служить лишь основой для исследований, связанных с генетической идентификацией сортообразцов облепихи в коллекции НИИСС.

Глава 4. Биохимическая оценка плодов облепихи

4.1. Растворимые сухие вещества

В анализируемые периоды 2014-2015 годов содержание растворимых сухих веществ (РСВ) в плодах облепихи изменялось незначительно (коэффициент вариации 7,58 %). В среднем содержание РСВ варьировало от $8,21 \pm 0,25$ (Дар Катуня) до $10,54 \pm 0,36$ % (Гибрид-2).

Однако следует отметить, что внутри подвида *mongolica* сортообразцы саянско-чулышманского, чуйского экотипов, а также формы, полученные с помощью химического мутагенеза, отличались более высоким содержанием РСВ (>10,00 %), на что, безусловно, следует обратить внимание в дальнейшей селекционной работе.

Исследования динамики накопления растворимых сухих веществ показали, что с созреванием плодов идет их увеличение.

4.2. Общий сахар

За два года исследований содержание сахаров в среднем изменялось от $2,36 \pm 0,05$ (Гибрид-1) до $6,43 \pm 0,39$ % (Елизавета), со средним значением по этому признаку $4,87 \pm 0,37$ % и коэффициентом вариации 29,10 %.

Сравнительный анализ накопления сахаров у групп сортов различного эколого-географического происхождения за два года наблюдений выявил низкое содержание сахаров у ютландского ($2,36 \pm 0,05$ %), а внутри подвида *mongolica* у бурятского ($3,25 \pm 0,14$ %) и катунского ($3,86 \pm 0,70$ %) экотипов.

За два года исследований от начала созревания до стадии полной зрелости плодов содержание сахаров увеличивалось.

4.3. Органические кислоты

Содержание органических кислот в плодах изучаемых сортообразцов облепихи в среднем изменялось в большом диапазоне с коэффициентом вариации 35,09 %, причем такая вариация проявилась в основном за счет экотипов, не входящих в подвид *mongolica*. Содержание кислот варьировало от $1,19 \pm 0,00$ (Живко) до $3,34 \pm 0,07$ % (КП-686), со средним значением $1,89 \pm 0,17$ %.

Высокая кислотность отмечена у ютландского, бурятского, киргизского и дунайского экотипов (от 2,35 до 3,44 %). Значительное варьирование признака общей кислотности между подвидом *mongolica* и другими исследуемыми подвидами позволяет рекомендовать данный критерий при предварительной идентификации крупных систематических единиц – подвидов. В то же время, бурятский и отчасти катунский экотипы продемонстрировали значительные отличия от остальной группы сортообразцов в границах подвида *mongolica*.

Изучение динамики накопления органических кислот в плодах большинства изучаемых сортообразцов показывает общее их снижение в процессе созревания.

4.4. Сахарокислотный индекс

Значение сахарокислотного индекса варьировало от $0,84 \pm 0,12$ (Гибрид-1) до $5,91 \pm 0,72$ (Елизавета), со средним значением $3,35 \pm 0,44$. От начала созревания до стадии полной зрелости плодов среднее значение СКИ значительно увеличивается.

4.5. Витамин С

Содержание витамина С в плодах изучаемых сортообразцов облепихи варьировало в очень большом диапазоне. Среднее содержание витамина С за два года исследований находилось в пределах от $46,42 \pm 2,23$ (42-68-2) до $242,50 \pm 8,09$ мг/100 г (Заря Дабат), со средним значением $125,62 \pm 13,10$ мг/100 г.

Анализируя С-витаминность в среднем по экотипам, следует отметить, что высоким содержанием аскорбиновой кислоты отличались, помимо бурятского экотипа, формы саянско-чулышманского ($162,25 \pm 9,72$ мг/100 г) и ютландского ($186,11 \pm 10,45$ мг/100 г) экотипов. Низкую величину этого показателя отмечали у катунского ($74,83 \pm 4,94$ мг/100 г), чуйского ($85,17 \pm 4,96$ мг/100 г) и красноярско-саянского ($87,45 \pm 2,79$ мг/100 г) экотипов.

Изучение динамики накопления витамина С показало, что в стадии начала созревания плодов среднее содержание аскорбиновой кислоты было больше, чем на стадии полной зрелости.

4.6. Сумма полифенолов

Содержание полифенолов в плодах изучаемых сортообразцов облепихи отличается большой вариабельностью, находящейся на уровне 42,18 %. Однако в отличие от витамина С коэффициент вариации внутри подвида *mongolica* ниже по сравнению с общей вариацией. Сортообразцы, не входящие в подвид *mongolica*, превосходили по данному показателю остальные формы. Максимальное содержание полифенолов за два года исследований наблюдалось в мякоти плодов

облепихи дунайского экотипа ($150,25 \pm 37,08$ мг/100 г), в то время как минимальное отмечено у сорта Дар Катуни ($34,51 \pm 6,38$ мг/100 г).

Анализ динамики накопления фенольных веществ во время созревания плодов показал, что по ряду сортообразцов отсутствует прямолинейный характер, переходящий от понижения во второй срок наблюдений к повышению в третий и наоборот.

Подводя итог анализу содержания фенольных соединений в плодах различных подвидов облепихи, можно сделать вывод о том, что этот показатель может быть отчасти использован при предварительной идентификации генотипов в связи с достоверным превышением данного показателя у форм, не принадлежащих подвиду *mongolica*.

4.7. Витамины группы В

Анализ содержания водорастворимых витаминов в отношении экотипов показал, что значительные отличия наблюдаются для дунайского экотипа и сортов полученных с помощью химического мутагенеза, которые выражались в низком содержании витаминов В₁ ($0,19 \pm 0,19$ и $0,19 \pm 0,04$ мг/100 г). Максимальное количество витамина В₁ наблюдалось в плодах чуйского экотипа ($0,77 \pm 0,52$ мг/100 г). Минимальное содержание витамина В₂ наблюдалось в плодах киргизского, чуйского, саянско-чулышманского, ютландского экотипов.

По содержанию витамина В₂ и В₆ дунайский экотип превосходил другие экотипы в среднем в три и два раза соответственно. Ютландский экотип отличался отсутствием витамина В₂ и низким содержанием витамина В₃ ($0,17 \pm 0,17$ мг/100 г) и В₆ ($9,21 \pm 1,46$ мг/100 г). Низкое содержание витамина В₆ также отмечено в плодах чуйского экотипа. Содержание витамина В₉ у киргизского экотипа было максимальным ($1,32 \pm 0,90$ мг/100 г).

Таким образом, сочетание отдельных витаминов группы В в ряде случаев может служить достоверным критерием принадлежности сортообразцов к определенному подвиду, а также экотипу внутри подвида *mongolica*.

Изучение биосинтеза этой группы веществ в динамике показало, что накопление витамина В₁ у большинства сортообразцов наблюдалось во второй срок отбора проб. По мере созревания плодов происходило заметное снижение содержания витамина В₂. Содержание витамина В₃ в среднем по сортам и гибридам незначительно увеличивалось. Количество витамина В₆ в среднем по сортообразцам снижалось. Содержание витамина В₉ в процессе созревания плодов в среднем увеличивалось.

4.8. Масло

Среднее содержание масла на сырой вес за два года исследования варьировало от $2,19 \pm 0,10$ (Гибрид-2) до $6,24 \pm 0,31$ % (Дар Катуни), со средним значением $4,64 \pm 0,25$ %.

С высоким значением содержания масла в плодах на сырой вес выделены группы бурятского (5,63 %), ютландского (5,56 %) и катунского (5,34 %) экотипов. Минимальное количество масла на сырой вес за два года исследования накоплено в группе дунайского экотипа (2,19 %).

Анализ накопления масла в процессе созревания не выявил определенных закономерностей. У части сортообразцов незначительно повышался уровень масла в процессе созревания, у части – понижался, в оставшихся происходило временное повышение либо понижение во второй срок взятия проб.

4.9. Жирные кислоты

Основными жирными кислотами в масле плодовой мякоти облепихи подвида *tungolica* являются пальмитиновая и пальмитолеиновая. Так, в частности, содержание пальмитиновой кислоты в мякоти плодов облепихи изменялось по сортам и гибридам от $29,33 \pm 10,59$ (Иня) до $42,58 \pm 0,50$ % (Чуйская), со средним значением $35,70 \pm 1,01$ %. Содержание пальмитолеиновой кислоты варьировало у подвида *tungolica* в пределах от $35,77 \pm 0,44$ (Чуйская) до $51,50 \pm 10,92$ % (Иня), со средним значением $41,10 \pm 1,68$ %. Таким образом, более 75 % всех жирных кислот в масле плодовой мякоти приходится на две кислоты. Остальные 25 % приходятся на содержание стеариновой, олеиновой, линолевой и линоленовой кислот.

В анализе жирнокислотного состава в отношении экотипов, можно отметить значительные отличия в липидах мякоти облепихи дунайского экотипа, которые выражались в низком содержании пальмитолеиновой, стеариновой, линолевой и линоленовой кислот, повышенном содержании олеиновой кислоты, а в 2014 году – отсутствием стеариновой и линоленовой кислот. Отличия липидов мякоти плодов облепихи сортов, полученных с помощью химического мутагенеза, выражались в повышенном содержании пальмитолеиновой кислоты и пониженном содержании пальмитиновой и олеиновой кислот в сравнении с другими образцами. Ютландский экотип характеризуется сравнительно высоким, относительно других экотипов, содержанием олеиновой кислоты и пониженным содержанием стеариновой, линолевой кислоты в липидах мякоти плодов облепихи. Низким содержанием пальмитиновой кислоты отличается киргизский экотип.

Отличительной особенностью семян облепихи является высокое содержание линолевой и линоленовой кислот и наличие цис-вакценовой кислоты. В исследованных нами сортообразцах более 70 % всех кислот приходилось на две полиненасыщенные жирные кислоты – линолевую и линоленовую. Содержание линолевой и линоленовой кислот в семени за два года исследования изменялось незначительно – от $37,36 \pm 3,16$ (Чулышманка) до $44,22 \pm 1,79$ % (Дар Катуни) и от $25,12 \pm 0,41$ (Гибрид-2) до $33,69 \pm 0,53$ % (Великан) соответственно.

Наибольшие отличия по накоплению жирных кислот в семени облепихи также проявились для дунайского экотипа, что выражалось в повышенном накоплении пальмитиновой и олеиновой кислот, низком уровне линоленовой, стеариновой кислот и отсутствием цис-вакценовой кислоты. По остальным экотипам нами не установлено значительных отличий, что не позволяет рассматривать показатель как универсальный и достоверный при идентификации экотипов.

Динамика накопления основных жирных кислот во время созревания плодов рассмотрена в три срока отбора проб. Содержание пальмитиновой и линолевой кислот в мякоти было выше в третий срок отбора плодов. Содержание

стеариновой и олеиновой кислот было максимальным во второй срок отбора плодов. Содержание остальных жирных кислот незначительно снижалось в зависимости от сроков отбора проб. В липидах семени по мере созревания плодов выросло содержание линолевой и линоленовой кислот. Содержание остальных основных жирных кислот в семени облепихи в первые сроки сбора плодов было больше, чем в последующие.

4.10. Фитостерины

Результаты изучения накопления β -ситостерина в мякоти облепихи в разрезе экотипов показывает, что высоким содержанием этого вещества отличаются сортообразцы полученные с помощью химического мутагенеза ($37,66 \pm 7,66$ мг/100 г), дунайского ($33,56 \pm 0,22$ мг/100 г), катунского ($32,56 \pm 3,80$ мг/100 г) и бурятского экотипов ($30,92 \pm 12,30$ мг/100 г). По содержанию β -ситостерина в липидах плодовой мякоти облепихи не установлено достоверных различий ни по сортообразцам внутри подвида *mongolica* ни в пределах всей совокупности изучаемых сортообразцов.

За два года исследования анализ β -ситостерина в липидах семени облепихи в разных экотипах показал высокое его содержание в бурятском ($41,18 \pm 0,47$ мг/100 г), ютландском ($34,33 \pm 0,86$ мг/100 г), катунском ($32,49 \pm 3,11$ мг/100 г), чуйском ($31,65 \pm 3,32$ мг/100 г) экотипах. Для дунайского экотипа содержание β -ситостерина было минимальным – $15,04 \pm 4,50$ мг/100 г.

За период созревания плодов максимальное содержание β -ситостерина в липидах мякоти наблюдалось во второй срок сбора плодов. В семени плодов облепихи не установлено прямолинейных и устойчивых закономерностей в динамике накопления β -ситостерина.

4.11. Токоферолы

Рассматривая накопление токоферолов в липидах мякоти плодов облепихи, низкое содержание α -токоферола отмечено в сортообразцах дунайского экотипа ($2,14 \pm 0,18$ мг/100 г), не принадлежащих к подвиду *mongolica*. С высоким содержанием α -токоферола ($\geq 3,95$ мг/100 г) выделены экотипы из подвида *mongolica*: красноярско-саянский, саянско-катунский и саянско-чулышманский экотипы. Значительные отличия по высокому содержанию β -токоферола наблюдается для образцов красноярско-саянского экотипа ($1,08 \pm 0,05$ мг/100 г). Минимальное в плодах ютландского экотипа ($0,13 \pm 0,03$ мг/100 г), который не относится к подвиду *mongolica*. В то же время, по содержанию γ -токоферола максимум зафиксирован в мякоти сортообразцов ютландского экотипа ($0,71 \pm 0,40$ мг/100 г). В сортах, полученных с помощью химического мутагенеза, катунского, чуйского и саянско-чулышманского экотипов содержание δ -токоферолов в мякоти плодов – низкое ($\leq 0,08$ мг/100 г), по сравнению с другими экотипами. Высокое содержание δ -токоферола отмечено в мякоти плодов дунайского и киргизского экотипов ($0,35 \pm 0,02$ и $0,30 \pm 0,12$ мг/100 г соответственно).

Содержание α -токоферола в семени сортов разных экотипов варьировало от $0,92 \pm 0,46$ (дунайский экотип) до $4,24 \pm 1,51$ мг/100 г (ютландский экотип). Высокое содержание α -токоферола отмечено в семени сортообразцов ютландского, бурятского и красноярско-саянского экотипов. Содержание β -токоферола

изменялось от $0,16 \pm 0,09$ (киргизский) до $0,91 \pm 0,46$ мг/100 г (чуйский экотип). Максимальное значение γ -токоферола зафиксировано в семени сортов бурятского экотипа ($1,69 \pm 1,32$ мг/100 г), минимальное у дунайского экотипа ($0,41 \pm 0,04$ мг/100 г). В сортах, полученных с помощью химического мутагенеза содержание δ -токоферола – максимальное ($2,48 \pm 2,25$ мг/100 г). С низким содержанием β - и δ -токоферолов выделен киргизский экотип ($0,16 \pm 0,09$ и $0,09 \pm 0,02$ мг/100 г соответственно).

В семени по мере созревания плодов вырастает содержание α - и γ -токоферолов. Содержание β - и δ -токоферолов в семени облепихи в первый срок сбора плодов выше, чем в последующие сроки.

4.12. Каротиноиды

Среднее содержание суммы каротиноидов за два года исследования изменялось от $1,95 \pm 0,76$ (Гибрид-2) до $30,55 \pm 2,54$ мг/100 мл (42-68-2). Коэффициент вариации по этому показателю внутри подвида *mongolica* ниже, чем в группе сортообразцов других подвидов. Большую часть от содержания суммы каротиноидов составляет сумма ликопина и лютеина. Содержание этих веществ за два года варьировало от $0,79 \pm 0,49$ (Гибрид-2) до $7,91 \pm 0,18$ мг/100 мл (42-68-2), со средним значением $3,49 \pm 0,48$ мг/100 мл. Среднее содержание β -каротина изменялось от $0,05 \pm 0,01$ (Гибрид-2) до $4,44 \pm 0,88$ мг/100 мл (Гибрид-1). По данному показателю наблюдаются существенные различия по сортообразцам в оба года исследований. За два года исследования содержание α -каротина изменялось от $0,17 \pm 0,14$ (Гибрид-2) до $3,48 \pm 1,67$ мг/100 мл (42-68-2). Со значением выше среднего ($>1,09 \pm 0,22$ мг/100 мл) отмечены такие сорта как: Елизавета, Живко, Иня, Любимая, Новость Алтая, Чульшманка.

В разрезе экотипов значительные отличия в каротиноидном составе мякоти плодов установлены у ютландского и красноярско-саянского экотипов, которые выражены высоким содержанием суммы каротиноидов, лютеина и ликопина, β -каротина. Для красноярско-саянского экотипа отмечено также высокое значение α -каротина. У дунайского и киргизского экотипов сумма каротиноидов, лютеин, ликопин, β -каротин и α -каротин на низком уровне.

В процессе созревания плодов происходит накопление ликопина и лютеина, а также повышается показатель суммы каротиноидов, однако отмечается снижение содержания α - и β -каротина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Проведено комплексное генетико-биохимическое исследование форм облепихи различного эколого-географического происхождения в коллекции НИИСС, направленное на установление степени генетического сходства между различными экотипами, а также на раскрытие биохимического потенциала изучаемых сортообразцов.

2. Отработана методика ISSR-анализа для облепихи, произрастающей в условиях умеренно засушливой и колочной степи Алтайского края. Выделены 6 эффективных ISSR-маркеров (UBC 873, НВ 12, НВ14, 814, 17899А, 17899В) для анализа полиморфизма ДНК облепихи. Предложена оптимальная концентрация праймеров в количестве 2 мкл 10 мМ раствора. Установлена оптимальная

температура отжига для каждого праймера. Рекомендовано для выделения ДНК из свежей растительной ткани листа облепихи использовать наборы Nucleospin Plant II.

3. На основе отработанной методики проведен ISSR-анализ 17 сортообразцов облепихи, относящихся к 10 различным экотипам. Показана принципиальная применимость метода ISSR-анализа при изучении генетического разнообразия облепихи, произрастающей на Алтае.

4. Использование различных подходов к интерпретации данных ISSR-анализа устойчиво подтверждает генетические различия между такими подвидами облепихи, как *mongolica*, *carpatica* и *fluviatilis*. Внутри подвида *mongolica* нами не установлено исключительно достоверных различий между экотипами. Вместе с тем чуйский экотип показал устойчивую генетическую схожесть во всех трех вариантах интерпретации, а катунский – в двух вариантах из трех. Полагая, что определенные расхождения на филограммах вызваны, прежде всего, гибридным происхождением исходного материала, мы склоняемся к принятию гипотезы о том, что подвид облепихи *Hippophae rhamnoides* ssp. *mongolica* представлен более мелкими классификационными единицами – экотипами, с определенной, свойственной такому уровню классификации, степенью генетического сходства.

5. На основе биохимического анализа изучаемых сортообразцов облепихи показан уровень варьирования питательных и биологически активных веществ у различных экотипов и выделены формы с максимальным и минимальным содержанием растворимых сухих веществ, суммы сахаров, органических кислот, витамина С, суммы полифенолов, витаминов группы В, масла, жирных кислот, β -ситостерина, α -, β -, γ -, δ -токоферолов, суммы каротиноидов, α -, β -каротина, лютеина и ликопина. Полученные результаты могут быть использованы селекционерами в работах, направленных на улучшение биохимического состава плодов облепихи.

6. Достоверно установлено, что некоторые биохимические показатели могут характеризовать принадлежность сортообразцов к определенному экотипу. Существенные различия по содержанию жирных кислот липидной фракции плодовой мякоти и семени отмечены для дунайского экотипа, принадлежащего к подвиду *carpatica*. Для остальных эколого-географических групп использование этого критерия не дало достоверных различий. Дополнительным показателем для идентификации может служить содержание органических кислот и полифенолов, количество которых у подвида *mongolica* в большинстве случаев значительно ниже по сравнению с другими изучаемыми подвидами. Сочетание отдельных витаминов группы В также может служить достоверным критерием принадлежности сортообразцов к определенному подвиду, и даже экотипу внутри подвида *mongolica*. Содержание токоферолов также может применяться при выявлении схожести или различия между сортообразцами разных подвидов, в частности, содержание δ -токоферола в липидах мякоти у сортообразцов, не принадлежащих к подвиду *mongolica*, значительно выше, чем у представителей этого подвида. Для оценки принадлежности сортообразцов к определенному подвиду и экотипу внутри подвида *mongolica* можно использовать содержание β -ситостерина в липидах семени облепихи. Анализ данных по содержанию

каротиноидов свидетельствует о варьировании этого показателя в плодах облепихи различных эколого-географических форм и может также являться критерием при идентификации сортообразцов.

7. Внутри подвида *tungurica* статистически достоверные отличия по содержанию питательных и биологически активных соединений установлены для бурятского экотипа, который существенно выделялся по ряду биохимических показателей, в связи с чем рекомендуем его для более детального изучения в селекционных программах по улучшению биохимического состава плодов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, включенных в перечень ВАК РФ

1. Земцова, А.Я. Оценка сортообразцов облепихи разного эколого-географического происхождения по биохимическому составу плодов / А.Я. Земцова, Ю.А. Зубарев, А.В. Гунин // Достижения науки и техники АПК. – 2016. – Т. 30, № 9. – С. 48-52.
2. Земцова, А.Я. Содержание фитостерина в плодовой мякоти и семени сортообразцов облепихи различного эколого-географического происхождения / А.Я. Земцова, Ю.А. Зубарев, А.В. Гунин, С. Кюнь // Достижения науки и техники АПК. – 2017. – Т. 31, № 2. – С. 35-38.

Публикации в других изданиях

1. Крысова, А.Я. Оценка сортов облепихи по биохимическому составу плодов в процессе созревания / А.Я. Крысова // Пища. Экология. Качество: труды XII Междунар. науч.-практ. конф. – Новосибирск, 2015. – С. 478-481.
2. Зубарев, Ю.А. Состав основных жирных кислот плодовой мякоти и семян сортообразцов облепихи различного экологического происхождения / Ю.А. Зубарев, А.В. Гунин, Дж. Томас Морсель, А.Я. Земцова // Сборник научных статей Международной конференции «Ломоносовские чтения на Алтае: фундаментальные проблемы науки и образования», Барнаул, 20-24 октября, 2015. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2015. – С. 1588-1594.
3. Земцова, А.Я. Влияние замораживания на содержание суммы каротиноидов в сортообразцах плодов облепихи различного эколого-географического происхождения / А.Я. Земцова, Ю.А. Зубарев, А.В. Гунин, Дж. Томас Морсель // Пища. Экология. Качество: труды XIII Междунар. науч.-практ. конф. (18-19 мая 2016 г., Красноярск). – Новосибирск, 2016. – С. 429-433.
4. Земцова, А.Я. Общее содержание фенольных веществ в плодах сортообразцов облепихи (*Hippophae rhamnoides* L.) различного эколого-географического происхождения / А.Я. Земцова, Ю.А. Зубарев, А.В. Гунин, Й.-Т. Мёрзель // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: сборник научных статей по материалам XV Международной научно-практической конференции (23-26 мая 2016 г., Барнаул). – Барнаул: Концепт, 2016. – С. 477-479.