

На правах рукописи

**ТИХОБАЕВА
ВИКТОРИЯ ЕВГЕНЬЕВНА**

**ДНК-МАРКЕРЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПОЛИМОРФИЗМА И
СЕЛЕКЦИОННО ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА
(*HELIANTHUS L.*)**

Специальность: 03.02.07 – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2013

Работа выполнена на кафедре генетики, в НИИ биологии Южного федерального университета, в Донской опытной станции им. Л.А. Жданова ВНИИМК Россельхозакадемии в 2009-2013 гг.

Научный руководитель:

доктор биологических наук
Усатов Александр Вячеславович
профессор кафедры генетики Южного
федерального университета

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
Анисимова Ирина Николаевна
ведущий научный сотрудник отдела
генетики Всероссийского научно-
исследовательского института
растениеводства им. Н.И. Вавилова

кандидат биологических наук
Бузовкина Ирина Сергеевна
доцент кафедры генетики и биотехнологии
Санкт-Петербургского государственного
университета

Ведущее учреждение:

ГНУ Научно-исследовательский институт
сельского хозяйства Юго-Востока
Россельхозакадемии, г. Саратов

Защита диссертации состоится «6» ноября 2013 года в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 006.041.01 при ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И.Вавилова Россельхозакадемии по адресу: 190000, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, д. 44, тел. 314-78-36, факс 571-87-28, e-mail: v.gavrilova@vir.nw.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова

Автореферат разослан и размещен на официальном сайте ВАК Минобрнауки РФ <http://vak.ed.gov.ru> и на сайте ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова <http://vir.nv.ru> «5» октября 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Вера Алексеевна Гаврилова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность исследования. Анализ организации и изменчивости генома высших растений – не только фундаментальная, но и прикладная проблема. Точная идентификация исходного материала, его конкретных признаков на всех этапах селекционного процесса актуальна в работе селекционеров.

Подсолнечник в Российской Федерации - наиболее рентабельная и возделываемая масличная культура. Согласно данным Минсельхоза РФ, в 2012 году масличные культуры были высеяны на площади 9,4 млн. га, из которых подсолнечник составил 6,2 млн. га (<http://www.zerno.avs.ru/news>). Около 80 % валового сбора семян и до 90 % производимого растительного масла приходится на эту культуру (Келигов, 2009; Повстаной, 2009).

Одним из перспективных подходов в селекции растений является молекулярно-генетическое маркирование конкретных признаков в генофонде как культурных, так и дикорастущих форм растений, изучение генетического разнообразия, определение родства на внутривидовом и внутривидовом уровнях (Гостимский и др., 2005, Dong et al, 2007). К настоящему времени у подсолнечника обнаружен ряд ДНК-маркеров для выявления в генотипе селекционно ценных генов. Так, например, специфические ДНК-маркеры разработаны для идентификации генов *Rf* у родительских форм подсолнечника, контролирующих ЦМС и восстановление фертильности пыльцы (Gentzbittel et al., 1995; Horn et al., 2003; Feng, Jan, 2008; Schnabel et al., 2008; Анисимова и др., 2009; Yue et al., 2010). Большой интерес для селекции представляют также гены устойчивости к наиболее распространенным заболеваниям подсолнечника, таким как ложная мучнистая роса и заразиха. За последние годы было обнаружено несколько генов, контролирующих эти признаки (Fernandez-Martinez et al., 2009; Qi et al., 2011a, 2011b; Bachlava et al., 2011). Так, например, было показано, что устойчивость к ложной мучнистой росе связана с наличием доминантных *Pl*-генов (Mulpuri, 2009; Bachlava et al., 2011; Антонова и др., 2011; Liu et al., 2012), а иммунитет подсолнечника к растению-паразиту заразихе определяется наличием генов *Or* (Солоденко и др., 2005, 2009). Поиск современных подходов для точного определения доноров устойчивости, каковым может стать ДНК-маркирование селекционно ценных признаков, актуален, в связи с постоянным возникновением новых, более вирулентных рас этих патогенов (Tang et al., 2003; Fernández-Martínez et al., 2009, 2010; Антонова и др., 2010, 2011).

Цель и задачи исследования. Целью работы является исследование и разработка маркеров ядерной и хлоропластной ДНК для изучения генетического разнообразия селекционных линий и образцов, внутри- и межвидового полиморфизма однолетних видов рода *Helianthus* L., а также селекционно ценных признаков подсолнечника.

Исходя из поставленной цели, были определены следующие задачи:

1. Исследовать полиморфизм по ДНК-маркерам геномной ДНК селекционных линий ДОС ВНИИМК и коллекционных образцов ВИР однолетних видов подсолнечника рода *Helianthus*.

2. Определить информативные SSR-маркеры внутри- и межвидового полиморфизма подсолнечника.

3. Исследовать полиморфизм хлоропластного генома по ДНК-маркерам с целью генотипирования селекционных линий ДОС ВНИИМК и коллекционных образцов ВИР однолетних видов подсолнечника рода *Helianthus*.

4. Определить наиболее информативные ДНК-маркеры ядерного гена *Rf1* – восстановителя фертильности пыльцы ЦМС РЕТ1 подсолнечника и на их основе создать мультиплексную маркерную систему.

5. Провести скрининг селекционного материала подсолнечника на устойчивость к ложной мучнистой росе и заразихе.

6. Определить информативные ДНК-маркеры устойчивости отцовских (*Rf*-линий) и материнских (ЦМС-линий) подсолнечника к ложной мучнистой росе и заразихе, соответственно.

Научная новизна исследования. Впервые на селекционном материале подсолнечника ДОС ВНИИМК экспериментально определены ДНК-маркеры, позволяющие дифференцировать линейный материал. Выявлены полиморфные участки хлДНК у коллекционных образцов подсолнечника ВИР и проведено полногеномное секвенирование пластома инбредных линий культурной и дикорастущей форм *H. annuus*. Определены информативные ДНК-маркеры устойчивости к ложной мучнистой росе и заразихе.

Практическая значимость работы. С помощью RAPD- и SSR-анализов генотипированы линии подсолнечника селекции ДОС ВНИИМК и коллекционные образцы ВИР однолетних видов рода *Helianthus* L. Создана и запатентована мультиплексная маркерная система, позволяющая идентифицировать растения подсолнечника с цитоплазматической мужской стерильностью (РЕТ1) и носителей гена *Rf1* – восстановителя фертильности пыльцы. В полевых и лабораторных условиях выделены генотипы подсолнечника, устойчивые к ложной мучнистой росе и заразихе.

Результаты исследований включены в состав учебных материалов для занятий студентов факультета биологических наук Южного федерального университета по специальным курсам кафедры генетики.

Апробация диссертации. Материалы диссертации были представлены на II Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз Россия» (Пермь, 2009); III, IV и V Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2009, 2011, 2013); 14-й Пушинской Международной школе-конференции «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2010); 8-ой Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодежь XXI века – будущее российской науки» (Ростов-на-Дону, 2010); 49- 51-й Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс»

(Новосибирск, 2011-2013); 6-й международной конференции молодых ученых и специалистов «Инновационные направления исследований в селекции и технологии возделывания масличных культур» (Краснодар, 2011); VII Съезде физиологов растений России «Физиология растений - фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» (Н. Новгород, 2011); Международной летней школе молодых ученых при РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева «Биотехнологии в сельском хозяйстве (AgroBioTech) 2012» (Москва, 2012); VI Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2012); Международной научной конференции X съезда Белорусского общества генетиков и селекционеров «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» (Минск, Республика Беларусь, 2012); III Вавиловской международной конференции «Идеи Н.И. Вавилова в современном мире» (Санкт-Петербург, 2012); Научной конференции «Молекулярно-генетические подходы в таксономии и экологии» (Ростов-на-Дону, 2013); 2nd International Scientific Conference «European Applied Sciences: modern approaches in scientific researches» (Stuttgart, Germany, 2013); Международной научно-практической конференции «Клеточная биология и биотехнология растений» (Минск, Республика Беларусь, 2013); Всероссийской научной конференции с международным участием «Инновационные направления современной физиологии растений» (Москва, 2013); International young scientists conference «Perspectives for development of molecular and cellular biology IV» (Yerevan, Armenia, 2013).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 28 научных работ, из них 5 статей в изданиях, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов исследований, заключения, выводов, списка литературы, приложения. Работа изложена на 148 страницах, содержит 13 таблиц и 44 рисунка. Список литературы включает 229 источников, из которых 71 на русском языке.

Исследование выполнено в рамках государственной темы Министерства образования и науки РФ (регистрационный № 4.5642.2011); при финансовой поддержке ФЦП Министерства образования и науки РФ (госконтракт № 16.740.11.0485); гранта «УМНИК» (проект № 14268).

Благодарности. Автор считает своим долгом выразить искреннюю благодарность и признательность с.н.с., зав. лабораторией молекулярной генетики НИИ биологии ЮФУ Н.В. Маркину, за помощь в проведении молекулярно-генетических исследований; директору ДОС ВНИИМК Ф.И. Горбаченко и зав. лабораторией селекции и иммунитета подсолнечника Т.В. Усатенко, за предоставленный материал для исследования, полевые данные и помощь в проведении полевых и лабораторных испытаний подсолнечника на устойчивость к ЛМР и болезням; д.б.н., зав. отделом генетических ресурсов технических и прядильных культур ВИР В.А. Гавриловой за предоставленные коллекционные образцы подсолнечника; к.б.н., в.н.с. лаборатории

эволюционной геномики факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова М.Д. Логачевой и д.б.н., в.н.с. НИИ биологии ЮФУ И.В. Корниенко за помощь в проведении анализа нуклеотидных последовательностей ДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследования служили сорта и родительские линии подсолнечника селекции ДЭС ВНИИМК, а также образцы дикорастущих видов подсолнечника из Мировой коллекции ВИР.

Согласно общепринятым методикам, разработанным во ВНИИМК и на станции, анализировали следующие показатели: продолжительность вегетационного периода, высота растений и урожайность семян, диаметр корзинки, лужистость, масличность и масса 1000 семян. Масличность определяли методом ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) (Попов, Аспиотис, 1973). Устойчивость к ложной мучнистой росе и заразихе оценивали в полевых и лабораторных условиях (Антонова и др., 2000; Лукомец и др., 2010).

Геномную ДНК выделяли из высечки листовой ткани сорбентным методом (Boom et al., 1990) с нашими модификациями (Маркин и др., 2006) и модифицированным СТАБ методом (Saghai-Maroof et al., 1984, Анисимова и др. 2010). Выделение хлоропластов из листового материала проводили методом дифференциального центрифугирования (Зубо, Кузнецов, 2008). В работе использовали праймеры для RAPD-, SSR-, STS- и SCAR-анализов (Сиволап и др., 1998; Lu et al., 2000; Bouzidi et al., 2002; Tang et al., 2002; Попов и др., 2002; Horn et al., 2003; Radwan et al., 2004; Schnabel et al., 2008). Амплификацию проводили в термоциклере Palm Cycler (Corbett Research, Австралия). Термальный режим реакций подбирали для каждой пары праймеров с учетом их нуклеотидного состава. Продукты реакции амплификации разделяли методом электрофореза в агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием. Гели фотодокументировали с помощью видеосистемы GelDoc 2000 (Bio-Rad, США).

Экспериментальные данные статистически оценивали с помощью программы Excel пакета Microsoft Office 2007. Генетические расстояния рассчитывали с помощью программы WinBoot (Yap, Nelson, 1996). По матрице состояний с помощью компьютерной программы WinBoot проводили бутстреп-анализ в 1000 повторностях с использованием коэффициента Жаккарда. В программе Mega v.5 (<http://megasoftware.net>) методом не взвешенных парно-групповых средних (UPGMA) по матрицам расстояний, полученных с помощью программы WinDist, строили консенсусные дендрограммы (Tamura et al., 2011).

Визуализацию продуктов амплификации с хлоропластными SSR праймерами проводили в автоматизированном ДНК-секвенаторе Applied Biosystems 3130 x/Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием программы GeneMapper. Очистку фрагментов

амплифицированной ДНК специфического участка связанного с геном *Rfl* подсолнечника для последующего прямого секвенирования выполняли согласно методике И. Верль с соавт. (Werle et al., 1994). Амплификацию для секвенирования проводили в термоциклере GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, США). Секвенирование проводили на генетическом анализаторе 3100 xl Genetic Analyser (Applied Biosystems, США) с использованием набора реагентов Big Dye Terminator v.3.1 Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) и флуоресцентно меченых дидезоксинуклеотидов с одним из праймеров. Продукты амплификации очищали на колонках Centri-Sep (PE Applied Biosystems, США). Хроматограммы анализировали с помощью пакета программ DNASTar. Полногеномное секвенирование хлДНК проводили на секвенаторе HiSeq2000 (Illumina, США) с длиной чтения 100 + 100. Полученные чтения картировали на референсный геном (последовательность хлДНК американской линии подсолнечника HA383 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/nucscore/94502469>)). Консенсусные последовательности, полученные в результате картирования исходных чтений, выравнивали с помощью программы BioEdit 7.0.9.0.

Олигонуклеотиды, сконструированные на основе последовательности *orfH522* и секвенированной маркерной последовательности SCAR-маркера HRG01, синтезировали на ДНК-синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Россия) в направлении от 3'- к 5'-концу методом твёрдофазного синтеза в соответствии со стандартными протоколами фирмы-производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОМНОЙ ДНК ПОДСОЛНЕЧНИКА

С помощью RAPD-анализа был исследован внутри- и межвидовой полиморфизм генома 41 образца 5 однолетних видов подсолнечника (*H. annuus* (10), *H. argophyllus* (8), *H. debilis* (9), *H. petiolaris* (10) и *H. praecox* (4)).

Для всех видов определены индивидуальные RAPD-спектры, различающиеся числом ампликонов, их размерами и степенью выраженности на электрофореграммах. Их количество зависит от использованного праймера и составляет от 9 до 16, а размеры варьируют в пределах 200 – 1200 пн. Результаты фингерпринтинга позволили рассчитать уровень как внутри-, так и межвидового полиморфизма. В среднем межвидовой полиморфизм коллекционных образцов составил 43,4 %, а внутривидовой – 11,9 %, в том числе *H. annuus* – 11,4 %, *H. argophyllus* – 6,1 %, *H. debilis* – 15,4 %, *H. petiolaris* – 16,4 % и *H. praecox* - 10,2 %.

Результаты амплификации микросателлитных последовательностей ДНК у тех же образцов однолетних видов подсолнечника показали, что из отобранных 11 SSR-маркеров (табл. 1), только 8 (*Ha* 432, *Ha* 1442, *Ha* 1608, *IUB* 4, *ORS* 509, *Ha* 1287, *HNCA* 2 и *OSU* 1) проявили себя как полиаллельные, хорошо воспроизводимые и информативно значимые. При изучении данной

группы генотипов был выявлен 51 аллель. Число аллелей на локус варьировало от 2 до 11, а уровень полиморфного информационного содержания (PIC) - от 0,60 по локусу *HNCA 2* до 0,87 по локусу *OSU 1*. В среднем, он составил 0,74.

Таблица 1. Праймеры, использованные в SSR-анализе геномной ДНК подсолнечника

Название локуса	Повтор	Кол-во аллелей	PIC*		Размер амплифицированных фрагментов, п.н.
			Образцы дикорастущих видов коллекции ВИР	Селекционные линии ДОС ВНИИМК	
<i>Ha 432</i>	GT	6-5	0,78	0,73	180-850
<i>Ha 1442</i>	ATT	6-9	0,76	0,86	170-240
<i>Ha 1608</i>	ATT	6-7	0,79	0,75	220-1100
<i>IUB 4</i>	AT	4	0,68	0,60	130-190
<i>ORS 509</i>	AT GT	4-2	0,61	0,48	190-200
<i>Ha 514</i>	GA	3	-	0,67	180-200
<i>IUB 6</i>	GT	2	-	0,12	350-370
<i>ORS 6</i>	AGG	3	-	0,50	190-260
<i>Ha 1287</i>	GA	9-6	0,82	0,81	130-230
<i>HNCA 2</i>	GT	3-2	0,60	0,40	210-340
<i>OSU 1</i>	GGG	11-4	0,87	0,69	150-750
Среднее			0,74	0,60	

С помощью 11 SSR-маркеров был исследован полиморфизм геномной ДНК у 3 сортов и 28 линий: 16 ЦМС-линий селекции ДОС ВНИИМК (ВД 22, ВД 151, ВД 255, ЭД 236, ЭД 169, ВД 1448, ЭД 931, ВД 149, ВД 356, ВД 350, ВД 354, ЭД 869, ВД 344, ЭД 95, ЭД 77, ЭД 73) и 12 Rf-линий подсолнечника (ВД 541, ВД 110, ВД 62, J-⁸/0306, J-⁸/33509, J-⁸/0211, J-⁹/361, J-⁶/7307, J-⁷/515, J-⁷/545, ЭД 114, J-⁸/1671). В результате было показано, что за исключением 2-х линий ВД 350 и ВД 356, данная система праймеров позволила дифференцировать все изученные генотипы.

Для каждого генотипа определены специфические, хорошо воспроизводимые индивидуальные SSR-спектры, различающиеся числом ампликонов и их подвижностью на электрофореграммах. Всего было выявлено 45 аллелей. Число аллелей варьировало от 2 до 9 на локус. Размер детектируемых ДНК-фрагментов составил от 130 до 1100 п.н. Индекс полиморфного информационного содержания (PIC), отражающий информативность маркеров, варьировал от 0,12 для праймера *IUB 6* до 0,86 для праймера *Ha 1442* (табл. 1). Среднее значение PIC для SSR локусов геномной ДНК линий подсолнечника составило 0,60.

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК ПОДСОЛНЕЧНИКА

Полиморфизм хлДНК определяли у селекционного материала ДОС ВНИИМК, представленного 46 линиями (17 ЦМС-линий и 29 Rf-линий) подсолнечника, а также у 34 коллекционных образцов 6 видов рода *Helianthus* L. ВИР.

В анализ были отобраны 8 SSR-маркеров хлДНК, выявляющих, по данным литературы (Wills et al 2005), высокий уровень полиморфизма в семействе *Compositae*.

Показано, что у всех изученных 46 селекционных линий присутствует только один гаплотип (137 п.н. с праймером ссmp 1, 126 п.н. - ссmp 4, 95 п.н. - ссmp 5, 192 п.н. - NTCP 7, 257 п.н. - NTCP 9, 185 п.н. - NTCP 18, 157 п.н. - NTCP 30, 254 п.н. - NTCP 40).

В отличие от культурного подсолнечника, у образцов дикорастущих видов коллекции ВИР, по исследованным SSR локусам, полиморфные варианты обнаружены при использовании только четырех из восьми маркеров (NTCP9, NTCP7, NTCP18 и NTCP30) (табл. 2). Всего выявлено 17 аллельных вариантов. Их число на локус варьировало от 3 до 6, а размеры амплифицированных фрагментов находились в пределах от 156 до 270 п.н.

Таблица 2. Аллельные различия хлоропластной ДНК подсолнечника

Вид	Кол-во образцов	Размер локуса, п.н.				Гаплотип
		NTCP 7	NTCP 9	NTCP 18	NTCP 30	
<i>H. annuus</i>	7	192 (75%) 193	253 257 (23%) 258	185 (67%)	157 (83%) 158	1, 6, 7, 8
<i>H. petiolaris</i>	7	192	255 (17%) 256 (40%)	185	157 158	3, 9, 10, 11
<i>H. rigidus</i>	9	191 (23%) 192	256 257 260	185 186	156 157	2, 4, 12, 13,14, 15
<i>H. debilis</i>	6	192	255 256	186	157 158	2, 5, 16
<i>H. argophyllus</i>	4	192	256	186	157	2, 5
<i>H. praecox</i>	1	191	270	189	157	17
ЦМС- и Rf-линии	46	192	257	185	157	1
Всего аллелей локуса		3	7	3	3	

Для исследования полиморфизма хлДНК в лаборатории эволюционной геномики (ФББ МГУ им. М.В. Ломоносова) было проведено полногеномное секвенирование хлДНК инбредных линий культурной (№ 3629; ЮФУ) и дикорастущей (№ 398941; ВИР) форм *H. annuus*. В качестве референсной последовательности использовали последовательность нуклеотидов хлДНК американской линии НА 383 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/94502469>). В результате сравнительного анализа трех хлоропластных геномов были обнаружены точковые однонуклеотидные замены (SNP). Всего было выявлено 28 SNP и 18 SSR полиморфизмов. Соотношение SSR и SNP полиморфизмов составило 39,1 % и 60,9 %, соответственно (рис. 1). SNP характеризуются пятью вариантами нуклеотидных замен: A/G (32,1 %), A/C (17,9 %), A/T (17,9 %), T/C (21,4 %), T/G (10,7 %), а SSR – (A)10-16 (22,2 %), (T)9-13 (33,3 %), (C)6-11 (27,8 %) , (G)7-8 (16,7 %). Из 28 обнаруженных SNP 10 - локализируются в кодирующих участках генов - *rpoC2*, *rps2*, *atpA*, *psaA*, *trnF-GAA*, *rpl16*, *ycf1* (2 SNP), *ndhG*, *ndhF*, причём некоторые из этих замен являются несинонимичными, а все исследованные микросателлиты, представлены мононуклеотидными повторами и расположены в не кодирующих областях хлДНК.

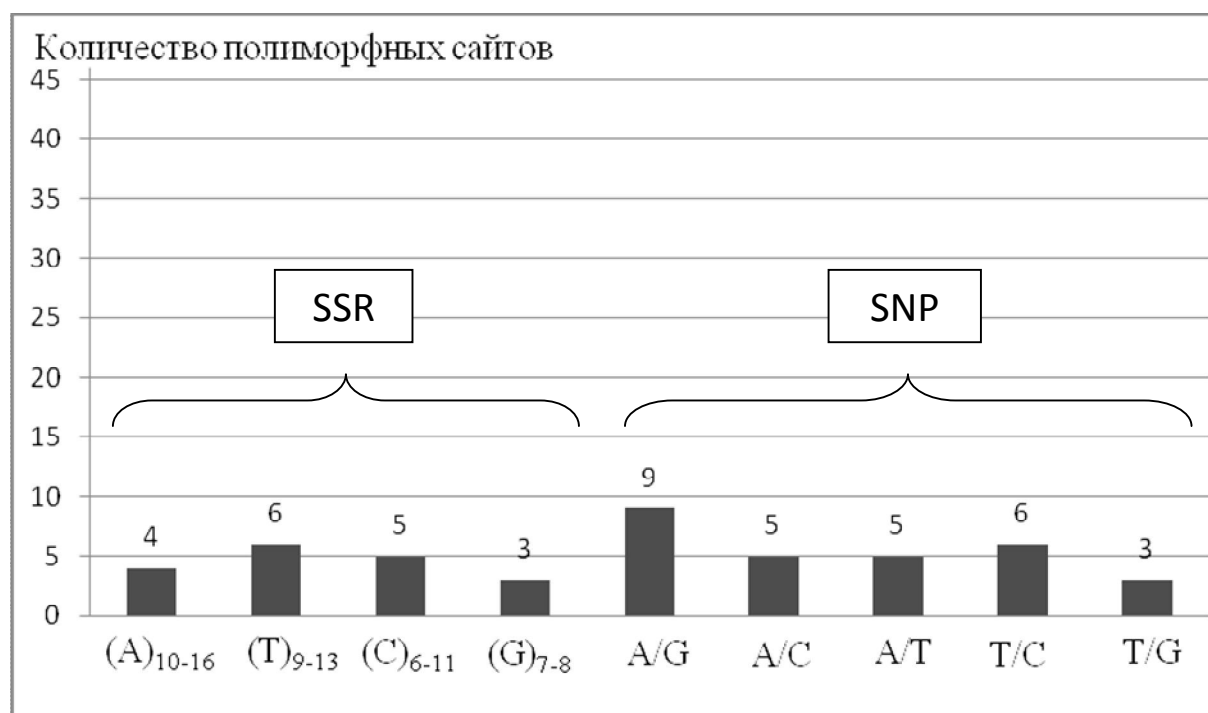


Рисунок 1. Характеристика полиморфных SSR локусов и SNP хлДНК инбредных линий культурной (№ 3629; ЮФУ), дикорастущей (№ 398941; ВИР) форм *H. annuus* и линии НА 383.

Обнаруженные SNP могут служить дополнительным пулом для исследования изменчивости хлоропластного генома культурных форм подсолнечника, а также в качестве новых информативных ДНК-маркеров.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНФОРМАТИВНЫХ ДНК-МАРКЕРОВ ГЕНА *Rf1* – ВОССТАНОВИТЕЛЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ ПЫЛЬЦЫ ЦМС РЕТ1

В данной серии экспериментов использован селекционный материал ДОС ВНИИМК и коллекционный материал ВИР. По данным литературы (Tang et al., 2002; Yu et al., 2002) были отобраны 9 ДНК-маркеров, которые локализованы вблизи локуса *Rf1*: SSR-маркеры ORS 799, ORS 511, ORS 1030, ORS 224, ORS 317, ORS 630, STS-маркер STS 115 и SCAR-маркеры HRG01, HRG02.

Результаты SSR-анализа свидетельствуют, что SSR-маркеры ORS 1030, ORS 317, ORS 630 и ORS 799 оказались не пригодны для идентификации носителей гена *Rf1*, поскольку они присутствуют как у гомозиготных (*Rf1Rf1*) линий-восстановителей фертильности пыльцы, так и растений материнских ЦМС-линий (*rf1rf1*).

Результаты амплификации SSR-маркеров ORS 511 и ORS 224 у тех же образцов подсолнечника, свидетельствуют, что эти праймеры недостаточно информативны для определения наличия гена *Rf1* и также не могут служить в качестве идентификаторов восстановителей фертильности пыльцы ЦМС РЕТ1. Однако данные маркеры могут быть использованы для генотипирования материнских ЦМС-линий. Так, в реакции амплификации с их участием синтезировались различающиеся по подвижности в агарозном геле фрагменты, среди которых один - соответствовал фрагменту, представленному также у *Rf*-линий, а второй - оказался уникальным, не встречающимся у некоторых материнских ЦМС-линий (ORS 511 – 8 линий, ORS 224 – 7 линий).

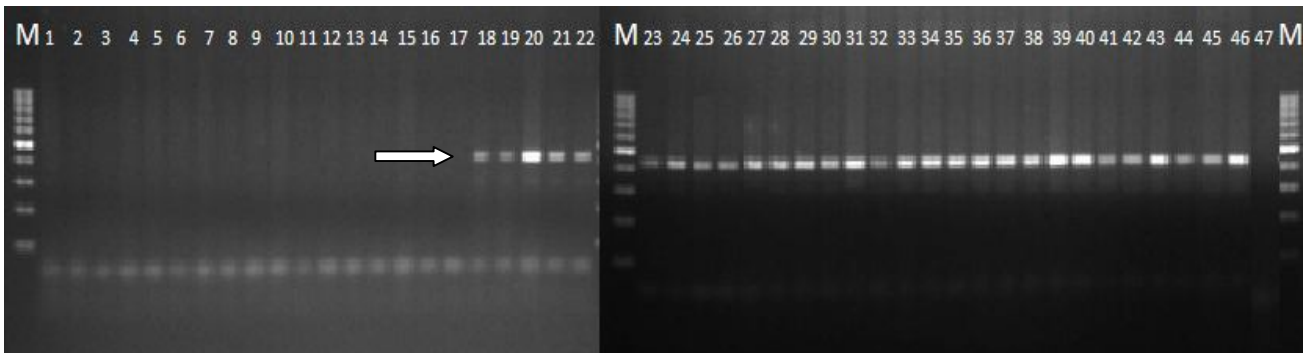


Рисунок 2. Электрофоретические спектры продуктов амплификации ДНК ЦМС-линий и *Rf*-линий со SCAR-маркером HRG01.

1-17 – ЦМС-линии (*rf1rf1*): 1 - ВД 1448; 2 - ЭД 169; 3 - ВД 344; 4 - ВД 22; 5 - ЭД 869; 6 - ВД 151; 7 - ЭД 236; 8 - ЭД 77; 9 - ЭД 95; 10 - ВД 354; 11 - ВД 255; 12 - ВД 350; 13 - ВД 356; 14 - ВД 149; 15 - ЭД 73; 16 - ЭД 931; 17 - J-⁸/1544; **18-46 - линии-восстановители фертильности пыльцы (*Rf1Rf1*):** 18 - J-⁸/0306; 19 - J-⁹/361; 20 - J-⁶/7307; 21 - J-⁷/515; 22 - J-⁷/545; 23 - J-⁹/1228; 24 - J-⁸/1671; 25 - ВД 541; 26 - ВД 62; 27 - ВД 110; 28 - J-⁸/991; 29 - ЭД 788; 30 - ЭД 195; 31 - ЭД 114; 32 - ЭД 538; 33 - J-⁹/941152; 34 - J-⁸/0123; 35 - J-⁸/843; 36 - J-⁸/2288; 37 - J-⁷/698; 38 - J-⁶/1854; 39 - J-⁷/90592; 40 - J-⁶/3867; 41 - J-⁶/70165; 42 - J-⁶/507; 43 - J-⁸/0211; 44 - J-⁷/698; 45 - J-⁸/4917; 46 - J-⁸/99017. М – маркер молекулярной массы, 47- отрицательный контроль, стрелкой показан фрагмент 454 п.н.

Четкие различия между ЦМС линиями и Rf-линиями подсолнечника продемонстрировали праймер STS 115 (115 и 370 п.н.) и SCAR-праймеры ОРК13 (454 п.н.) и ОРУ10 (740 п.н.). В качестве примера, на рисунке 2 приведены электрофоретические спектры продуктов амплификации геномной ДНК ЦМС- и Rf-линий со SCAR-маркером HRG01. Видно, что у Rf-линий подсолнечника присутствует фрагмента размером 454 п.н., что не характерно для ЦМС-линий.

Известно, что однонуклеотидные перестройки (SNP) – лежат в основе возникновения новых аллелей. Высокая плотность и эволюционная стабильность SNP делают их одним из наиболее удобных генетических маркеров (Gupta et al., 2001). С целью локализации полиморфных сайтов методом прямого секвенирования продуктов ПЦР были исследованы нуклеотидные последовательности фрагментов геномной ДНК амплифицированных с праймерами ORS 511, ОРУ10, ОРК13 у гомозиготных по гену *Rf1* линий.

Результаты анализа нуклеотидных последовательностей амплифицированных с праймером ORS 511 свидетельствуют, что уникальный для ЦМС-линий фрагмент отличается по распределению полиморфных сайтов от продукта амплификации, который характерен для Rf-линий и части ЦМС-линий. В анализ были взяты последовательности двух ЦМС-линий (*rf1rf1*), одна из которых у линии ЭД 95 – соответствовала продукту амплификации линий-восстановителей фертильности, вторая – у ВД 151 – уникальному фрагменту, детектируемому только у части ЦМС-линий и одна последовательность – Rf-линии J-⁸/0306. Также обнаружены гомологичные и полиморфные позиции сравниваемых последовательностей. Прямое секвенирование фрагментов амплификации с праймером ORS 511 у гомозиготных по гену *Rf1* образцов позволило определить последовательности нуклеотидов размером 94-95 п.н. и 104 п.н. Сравнительный анализ трех выровненных по длине нуклеотидных последовательностей показал, что степень сходства между маркерами одного аллельного варианта составляет 100 %, а между различными – 10 %.

В результате исследования нуклеотидных последовательностей фрагментов геномной ДНК гомозиготных по гену *Rf1* (*Rf1 Rf1*) линий (J-⁸/4917, J-⁸/99017 и ЭД 114) амплифицированных с праймером ОРУ10 были определены последовательности нуклеотидов участка размером от 667 п.н. до 670 п.н., соответственно. Выравнивание шести последовательностей нуклеотидов не выявило полиморфных позиций.

Прямое секвенирование фрагментов амплификации локуса HRG01/ОРК13 трех доминантных и трех рецессивных гомозиготных по гену *Rf1* линий (рис. 3) позволило определить последовательности нуклеотидов размером 354 п.н. и 246 п.н., соответственно. Сравнительный анализ выровненных по длине шести нуклеотидных последовательностей показал, что степень сходства между маркерами одного аллельного варианта составляет 99,6-100,0 %, а между различными – 90,7-91,1 %. Выравнивание на участке размером 246 п.н. (с 108 по 354 сайт) выявило 223 гомологичные и 24

полиморфные позиции. В основном нуклеотидные замены были выявлены при сравнении последовательностей доминантных и рецессивных гомозиготных по гену *Rf1* образцов. Исключением является позиция 209 доминантного аллельного варианта, в которой определена трансверсия пиримидинового основания на пуриновое (С → G). В остальных случаях различия обусловлены следующими заменами: А/Г (Т/С) – 14 (61 %), А/С (Т/Г) – 4 (17 %), А/Т – 4 (17 %) и одна (4 %) – делеция (рис. 3).

Таким образом, исследование последовательности нуклеотидов с праймером ОРК13, позволило определить полиморфные сайты сравниваемых участков, которые могут служить основой для разработки аллель-специфичной ПЦР тест-системы, позволяющей идентифицировать аллельные варианты гена-восстановителя фертильности пыльцы *Rf1*.

Рассмотренный выше однонуклеотидный полиморфизм представляет практический интерес для разработки простых и эффективных тест-систем на основе ПЦР, позволяющих выявлять гомозиготные и гетерозиготные точковые мутации, ассоциированные с изучаемым признаком. На основе последовательностей нуклеотидов митохондриальной *orfH522* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X55963.1>) и ядерного маркера гена *Rf1* HRG01/ОРК13 были синтезированы специфические праймеры для одновременной идентификации этих генов в генотипе подсолнечника с помощью мультиплексной ПЦР в одной реакционной пробирке.

Все праймеры имеют специально разработанный дизайн нуклеотидной последовательности (табл. 3). Олигонуклеотиды сконструированы таким образом, что маркерные последовательности амплифицируются с равной эффективностью и позволяют проводить мультиплексную ПЦР на образцах культурного подсолнечника с целью идентификации цитоплазматической мужской стерильности и гена *Rf1* – восстановителя фертильности пыльцы.

Таблица 3. Список олигонуклеотидов, используемых в качестве праймеров для мультиплексной ПЦР

Название олигонуклеотида	Последовательность оснований (5'-3')	Т отжига °С
Rf f	ggcatgatcaagtacataagcacagtc	58
Rf r	tatgtacgggaatgagctccggtt	58
<i>orfH522</i> f	agtagcccgttccgtgtttatgga	58
<i>orfH522</i> r	ctttctatttgggtcatcgccgga	58

Примечание: в обозначениях праймеров индекс «f» означает «прямой», «r» - «обратный».

Majority	TCATTTTATTACCACCATTATATCCTACTATCATCTTAGTGAAGTGTTCATGAACAGAGCATCCCATTTAGTCATCAT	
	10 20 30 40 50 60 70 80	
1.seq	-----	0
2.seq	-----	0
3.seq	TCATTTTATTACCACCATTATATCCTACTATCATCTTAGTGAAGTGTTCATGAACAGAGCATCCCATTTAGTCATCAT	80
4.seq	TCATTTTATTACCACCATTATATCCTACTATCATCTTAGTGAAGTGTTCATGAACAGAGCATCCCATTTAGTCATCAT	80
5.seq	TCATTTTATTACCACCATTATATCCTACTATCATCTTAGTGAAGTGTTCATGAACAGAGCATCCCATTTAGTCATCAT	80
6.seq	-----	0
Majority	AATTCATTATTTTGAACAACATTCAACTTCTTTTATTACTACAAGCATGATCATTATTATCAAGCATATAGGTATGATCA	
	90 100 110 120 130 140 150 160	
1.seq	-----TCATTTTATTACTACAAGCATGATCATTATTATCAAGCATATAGGTATGATCA	53
2.seq	-----TCATTTTATTACTACAAGCATGATCATTATTATCAAGCATATAGGTATGATCA	53
3.seq	AATTCATTATTTTGAACAACATTCAACATCTTTTATTACTACAAGCAGGATCATTATTATCAAGCATATAGGCATGATCA	160
4.seq	AATTCATTATTTTGAACAACATTCAACATCTTTTATTACTACAAGCAGGATCATTATTATCAAGCATATAGGCATGATCA	160
5.seq	AATTCATTATTTTGAACAACATTCAACATCTTTTATTACTACAAGCAGGATCATTATTATCAAGCATATAGGCATGATCA	160
6.seq	-----TCATTTTATTACTACAAGCATGATCATTATTATCAAGCATATAGGTATGATCA	53
Majority	AGTACATATGCATAGTCGAACATAATCACCTTCATGATGTCACGCATGCAAGTACTCCCCTTATGCGCAGTAAATTATG	
	170 180 190 200 210 220 230 240	
1.seq	AGTACAAAATACATAGTCGAACAAAATCACCTTCATGATGTCACGCATGCAAGTACTCCCCTTATGCGGAAGTAAATTATG	133
2.seq	AGTACAAAATACATAGTCGAACAAAATCACCTTCATGATGTCACGCATGCAAGTACTCCCCTTATGCGGAAGTAAATTATG	133
3.seq	AGTACATAAGCACAGTCAAAACATAATCACCTTCATAATGTCACGCATGCAAGTACTCCCCTTATGCACAGTAAATTATG	240
4.seq	AGTACATAAGCACAGTCAAAACATAATCACCTTCATAATGTCACGCATGCAAGTACTCCCCTTATGCACAGTAAATTATG	240
5.seq	AGTACATAAGCACAGTCAAAACATAATCACCTTCATAATGTCACGCATGCAAGTACTCCCCTTATGCACAGTAAATTATG	240
6.seq	AGTACAAAATACATAGTCGAACAAAATCACCTTCATGATGTCACGCATGCAAGTACTCCCCTTATGCGGAAGTAAATTATG	133
Majority	ATGCTTATGTACGGTTATGTGTTCTTTATGTTTTCTGTTGGTTATATATACTCTTTATGAGGATTATGATACTGAAGTCG	
	250 260 270 280 290 300 310 320	
1.seq	AGGCTTATGTACGGTTATGTGTTCTTTATGTTTTCTGTTGGTTATATATACTCTTTATGAGGATTATGATACTGAAGTCG	212
2.seq	AGGCTTATGTACGGTTATGTGTTCTTTATGTTTTCTGTTGGTTATATATACTCTTTATGAGGATTATGATACTGAAGTCG	212
3.seq	ATGCTTATGTACGGTTATGTGTTCTTTATGTTTTCTATTGGTTATATATACTCTTTATGAGGATTATGATACTGAAGTCG	320
4.seq	ATGCTTATGTACGGTTATGTGTTCTTTATGTTTTCTATTGGTTATATATACTCTTTATGAGGATTATGATACTGAAGTCG	320
5.seq	ATGCTTATGTACGGTTATGTGTTCTTTATGTTTTCTATTGGTTATATATACTCTTTATGAGGATTATGATACTGAAGTCG	320
6.seq	AGGCTTATGTACGGTTATGTGTTCTTTATGTTTTCTGTTGGTTATATATACTCTTTATGAGGATTATGATACTGAAGTCG	212
Majority	AACCGGAGCTCGTCCCGTACATAATCCTTATGT	
	330 340 350	
1.seq	AACCGAAGCTCGTCCCGTACATAATCCTTATGT	246
2.seq	AACCGAAGCTCGTCCCGTACATAATCCTTATGT	246
3.seq	AACCGGAGCTCATCCCGTACATAATCCTTATGT	354
4.seq	AACCGGAGCTCATCCCGTACATAATCCTTATGT	354
5.seq	AACCGGAGCTCATCCCGTACATAATCCTTATGT	354
6.seq	AACCGAAGCTCGTCCCGTACATAATCCTTATGT	246

Рисунок 3. Выровненные последовательности нуклеотидов фрагментов амплификации локуса HRG01/OPK13 трех доминантных (*Rf1Rf1*) – seq 3 - J-⁸/991, 4 - J-⁸/4917, 5 – ЭД 114 и трех рецессивных (*rf1rf1*) – seq 1 - J-⁸/981, 2 - J-⁸/026, 6 - J-⁸/1544 образцов.

На рисунке 4 представлены результаты мультиплексной ПЦР с разработанными праймерами. Они свидетельствуют о наличии маркера *orfH522* у линий ВД 1448, ЭД 169, ВД 344, ВД 22, ЭД 869, ВД 151, ЭД 236, ЭД 77 и ЭД 95 с ЦМС РЕТ1, а также у линий-восстановителей фертильности пыльцы, у которых выявлялся фрагмент размером около 127 п.н. Для сравнения были взяты 2 линии селекции ВИР - ВИР 109 Б и ВИР 109 RIG0, у которых подобный фрагмент не обнаружен.

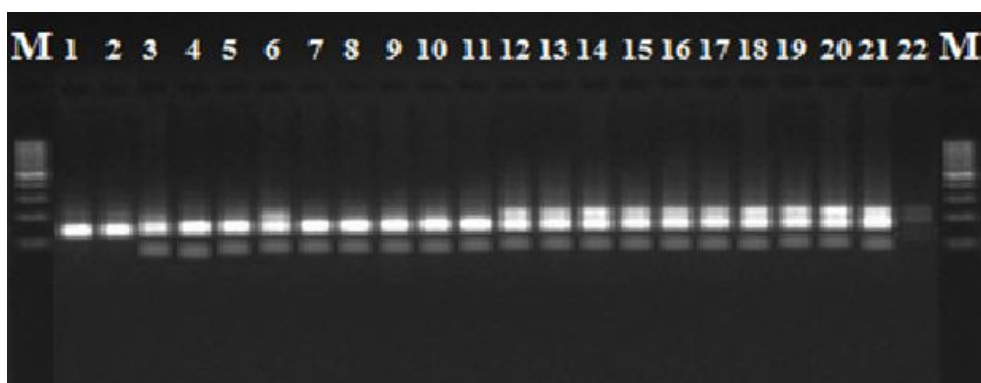


Рисунок 4. Электрофоретические спектры продуктов мультиплексной амплификации (праймеры: Rf f, Rf r и *orfH522* f, *orfH522* r) геномной ДНК линий ЦМС РЕТ1, ЦМС RIG0 и Rf-линий.

1 - ВИР 109 Б; 2 - ВИР 109 RIG0; 3-11 – ЦМС-линии (*rf1rf1*): 3 - ВД 1448; 4 - ЭД 169; 5 - ВД 344; 6 - ВД 22; 7 - ЭД 869; 8 - ВД 151; 9 - ЭД 236; 10 – ЭД 77, 11 - ЭД 95; 12-21 – Rf-линии (*Rf1Rf1*): 12 – J-⁸/0306; 13 - J-⁹/361; 14 - J-⁶/7307; 15 - J-⁷/515; 16 - J-⁷/545; 17 – J-⁹/1228; 18 - J-⁸/1671; 19 - ВД 541; 20 - ВД 62; 21 – J-⁸/2288. М – 100 п.н. DNALadder, 22- отрицательный контроль.

Следует заметить, что исследованные линии селекции ДОС ВНИИМК получены на основе ЦМС типа РЕТ1, следовательно, митохондриальная мутация присутствует как у ЦМС-, так и у Rf-линий. Поддержание мужской фертильности линий, имеющих стерильную цитоплазму, возможно лишь при наличии в их генотипах гена-восстановителя. Следовательно, косвенным свидетельством присутствия гена *Rf1* в генотипе автофертильной линии, не имеющей маркеров на этот ген, может служить наличие митохондриального маркера *orfH522*. Подобная ситуация возможна лишь для линий со стерильной цитоплазмой типа РЕТ1, поскольку формы с ЦМС RIG0, разработанные в ВИРе (от многолетнего гексаплоидного вида *H. rigidus* (Cass.) Desf. и источника восстановления фертильности пыльцы для этого типа цитоплазмы, выделенного из межвидового гибрида *H. petiolaris* × *H. annuus*) (Гаврилова, Рожкова, 2005), по-видимому, имеют иной тип организации мтДНК (Анисимова и др. 2011). Таким образом, линии с ЦМС RIG0 не имеют в митохондриальном геноме данной мутации, следовательно данный маркер не должен обнаруживаться у линий ВИР 109 Б и ВИР 109 RIG0, что и подтвердили результаты молекулярно-генетического анализа (рис. 4).

У всех изученных линий, включая линии с ЦМС RIG0, был выявлен фрагмент размером около 183 п.н. Этот фрагмент мы использовали в качестве внутреннего контроля реакции амплификации геномной ДНК подсолнечника (ложноотрицательный контроль). У всех Rf-линий с ЦМС РЕТ1 инициирован синтез специфичного маркерного фрагмента гена *Rf1* размером около 198 п.н. (рис. 4).

Дополнительно были сконструированы специфичные зонды для проведения ПЦР в реальном времени (Real Time PCR): Rf FAM ((FAM)-tgctacgcatgcaagtactccactt-(RTQ1)) и *orf522* R6G ((R6G)-ttgcgtgagggttgcacaassaa-(BHQ1)). Результаты мультиплексной ПЦР в реальном времени представлены на рисунке 5.

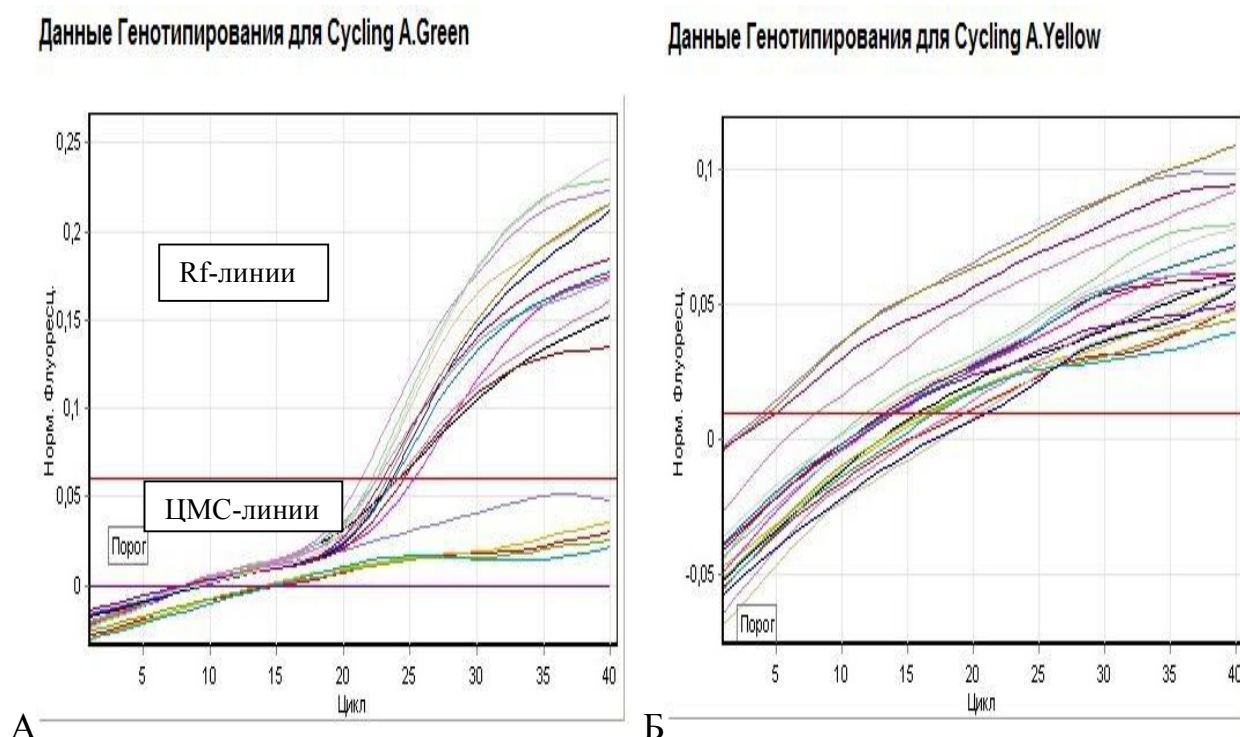


Рисунок 5. Результаты мультиплексной ПЦР в реальном времени. А – с праймером маркера гена *Rf1*, Б – с праймером маркера *orfH522*.

Видно, что кривые накопления флуоресцентного сигнала в режиме реального времени для линий культурного подсолнечника, несущих ген *Rf1*, пересекают линию порога, а кривые не достигшие его, характерны для ЦМС-линий (рис. 5А). На правом рисунке (рис. 5Б) все кривые пересекают линию порога, что свидетельствует о том, что в исследованных генотипах присутствует *orfH522*. В данном случае визуализация результатов происходит уже на стадии амплификации, что позволяет сократить время на определение гена *Rf1* и *orfH522*.

Таким образом, можно заключить, что разработанная мультиплексная ПЦР тест-система является информативной для определения ядерного гена *Rf1* и митохондриальной *orfH522* и может быть применена в маркерной селекции подсолнечника.

СКРИНИНГ И ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА УСТОЙЧИВЫХ К ЛОЖНОЙ МУЧНИСТОЙ РОСЕ И ЗАРАЗИХЕ

В Южном федеральном регионе широко распространенными патогенами на посевах подсолнечника в последние годы стали ложная мучнистая роса и зарази́ха. Гибриды F_1 , устойчивые к этим заболеваниям селекционеры получают путем скрещивания генотипов Rf-линий устойчивых к ЛМР и ЦМС-линий - к зарази́хе. В течение 2010-2012 гг., в лабораторных и полевых условиях ДОС ВНИИМК была проведена оценка селекционного материала (несколько тысяч образцов) к наиболее распространенным на юге РФ расам ЛМР (330, 710 и 730) и зарази́хи (инфекционный фон которой, включал смесь семян различных рас, в т.ч. Е, G и H). В результате отобраны 23 Rf-линии устойчивые к ЛМР и 20 растений (полностью отнести какую-либо линию или сорт к устойчивым не удалось) к зарази́хе.

Для определения информативности ДНК-маркеров отобраны 25 Rf-линий с различной степенью устойчивости к ЛМР (расы 330, 710 и 730) и 10 образцов чувствительных (1-5) и резистентных (6-10) к зарази́хе. В качестве контроля использовали 13 линий-дифференциаторов к различным расам ЛМР (ВНИИМК, ВИР)

По данным литературы (Bouzidi et al., 2002, Radwan et al., 2004) отобраны девять пар STS-праймеров к трем *Pl*-локусам – *Pl5*, *Pl6* и *Pl8*, ассоциированных с устойчивостью подсолнечника к ЛМР. В результате, только две пары праймеров - НаР2 и НаР3 оказались информативными для дифференциации чувствительных и устойчивых линий. Результат амплификации с праймером НаР2 представлен на рисунке 6.

Для всех устойчивых к трем расам ЛМР линий характерен фрагмент размером около 1200 п.н. (рис. 6). Он соответствует размеру фрагмента, характерному для резистентных линий (Bouzidi et al., 2002). У 11 образца соответствующий фрагмент отсутствует, хотя данная линия в лабораторных испытаниях проявляла устойчивость. В ходе повторных лабораторных исследований была выявлена поражаемость некоторых растений этой линии, что подтвердило ее гетерогенность по устойчивости. У линий-дифференциаторов, обладающих устойчивостью к трем изученным расам ЛМР, данный фрагмент присутствует (рис. 7).

Аналогично НаР2, пара праймеров НаР3 инициировала синтез фрагмента размером около 1800 п.н., представленный только у устойчивых линий, что также согласуется с данными литературы (Bouzidi et al., 2002).

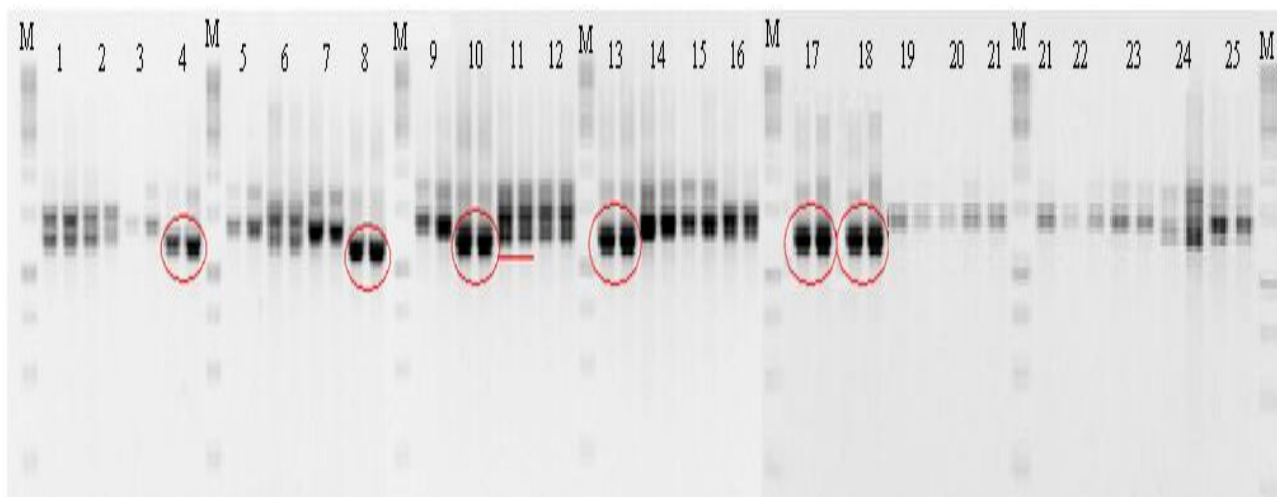


Рисунок 6. Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК селекционных линий подсолнечника с праймерами *HaP2*.

Цифрами обозначены номера образцов в двух повторностях. Обведены фрагменты уникальные для устойчивых к ЛМР (расы 330, 710 и 730) линий. Чертой отмечен образец, проявивший устойчивость к ЛМР в лабораторных испытаниях, однако, при этом специфический ПЦР-фрагмент не был определен. М – маркер молекулярной массы (1 Kb).

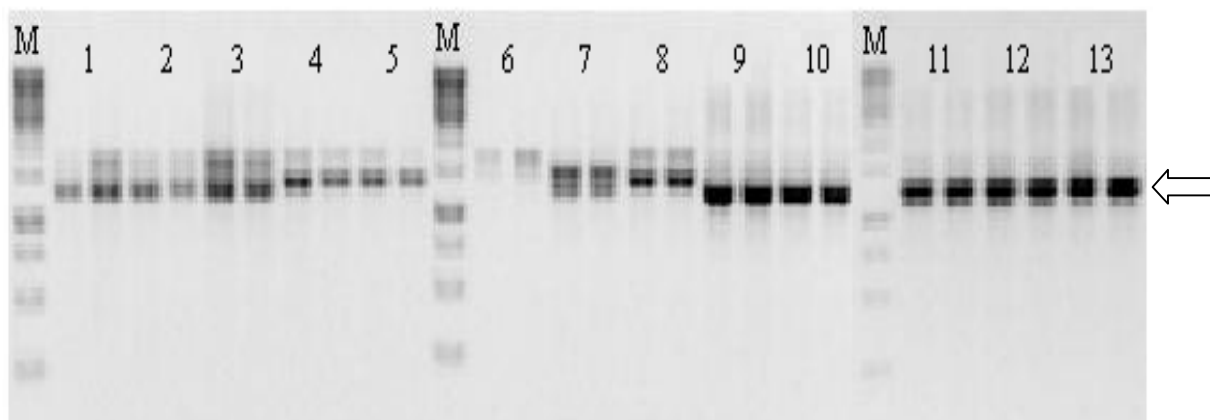


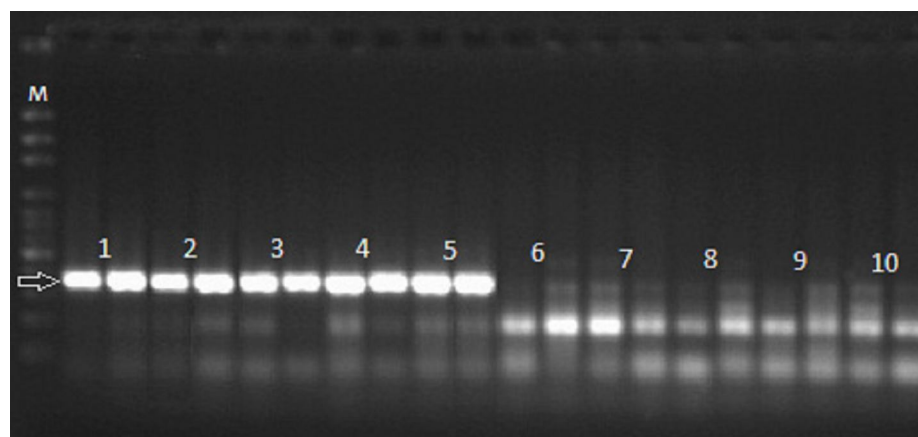
Рисунок 7. Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК линий-дифференциаторов подсолнечника с праймерами *HaP2*.

Контроль с линиями-дифференциаторами, 1-8 – линии чувствительные к одной или всем трем (330, 710, 730) расам; 9-13 – линии устойчивые к 330, 710 и 730 расам ЛМР. М – маркер молекулярной массы (1 Kb).

Для анализа образцов, устойчивых/чувствительных к заражению использовали 9 пар SCAR-праймеров, маркирующих локус *Or5*, связанный с устойчивостью к расам А – Е (Lu et al, 2000). В результате было выявлено два информативных маркера - RTS 40 и RTS 40_1, позволяющих дифференцировать устойчивые и чувствительные образцы (рис. 8). В генотипе устойчивых образцов (№№ 6 - 10) не выявлено специфических ПЦР-

фрагментов размером около 360 п. н. (RTS 40) и 300 п. н. (RTS 40_1), наличие которых характерно в генотипах чувствительных образцов (№№ 1 - 5), что согласуется с данными литературы (Lu et al., 2000). Можно заключить, что образцы с геном *Or₅* не способны противостоять новым расам заразики, распространенным на юге России.

А



Б

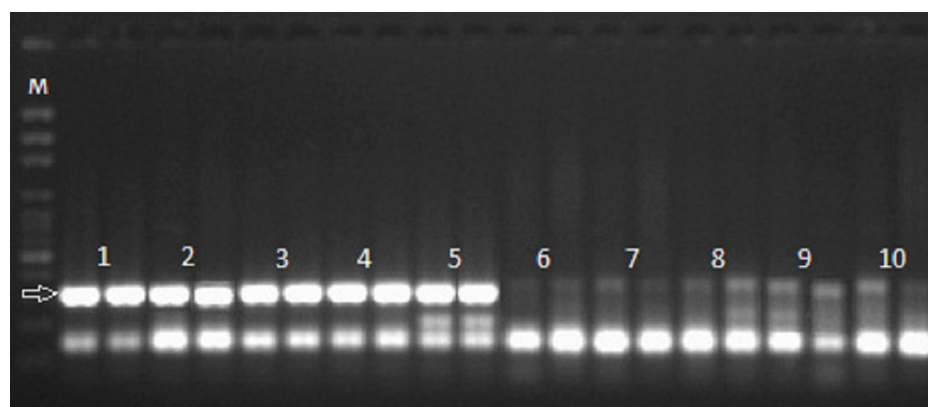


Рисунок 8. Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК образцов подсолнечника: А) с праймером RTS 40; В) с праймером RTS 40_1. №№ 1 - 5 - образцы, чувствительные к заразики; №№ 6 - 10 - образцы, устойчивые к заразики. М — маркер молекулярной массы. Стрелкой показаны уникальные ПЦР-фрагменты размером около 360 п. н. и 300 п.н.

Таким образом изученные маркеры могут быть использованы в маркер-вспомогательной селекции подсолнечника на устойчивость к ЛМР (расы 330, 710, 730) и заразики (расы А – Н).

ВЫВОДЫ

1. Для определения полиморфизма геномной ДНК 46 линий подсолнечника селекции ДОС ВНИИМК и 31 образца 5 однолетних видов (*H. annuus* L., *H. praecox* Englem. & Gray, *H. debilis* Nutt., *H. petiolaris* Nutt., *H. argophyllus* T. & G.) из коллекции ВИР отобраны RAPD- и SSR-праймеры с высокими значениями дискриминационного потенциала. Уровень межвидового полиморфизма в среднем составил 43,4 %, внутривидового – 11,9 % (*H. annuus* – 11,4 %, *H. argophyllus* – 6,1 %, *H. debilis* – 15,4 %, *H. petiolaris* – 16,4 % и *H. praecox* – 10,2 %). Среднее значение PIC для SSR локусов геномной ДНК селекционных линий и однолетних видов составило 0,60 и 0,74, соответственно.

2. Изучен полиморфизм по 8 SSR-локусам хлДНК у 17 ЦМС-линий, 29 Rf-линий подсолнечника и 34 коллекционных образцов 6 видов рода *Helianthus* L. У всех селекционных линий ДОС ВНИИМК был выявлен только один гаплотип, а у коллекционных образцов ВИР – 17, из которых 12 оказались уникальными.

3. Сравнение полногеномных последовательностей хлДНК инбредных линий культурной (линия 3629; ЮФУ) и дикорастущей (№ 398941, ВИР) форм *H. annuus* и линии НА 383 (используемой в качестве референсной последовательности), позволило локализовать точковые однонуклеотидные замены (SNP). Всего было выявлено 28 SNP и 18 SSR полиморфизмов. Соотношение SSR и SNP полиморфизмов составило 39,1 % и 60,9 %, соответственно.

4. Определены информативные праймеры для определения доноров гена *Rf1* подсолнечника (ORS 511, ОРУ10 и ОРК13). Проведен анализ нуклеотидных последовательностей продуктов амплификации с праймерами ORS 511, ОРУ10 и ОРК13. Выявлены полиморфные сайты для маркеров ORS 511 и HRG01.

5. Разработана и апробирована мультиплексная ПЦР тест-система на основе последовательностей митохондриальной *orfH522* и ядерного маркера гена *Rf1* HRG01/ОРК13, позволяющая идентифицировать ЦМС РЕТ1 и Rf-линии подсолнечника.

6. Проведен скрининг селекционного материала подсолнечника ДОС ВНИИМК на устойчивость к ЛМР и заразихе. Отобраны 23 Rf-линии, устойчивые к наиболее распространенным на юге РФ трем расам ЛМР (330, 710 и 730) и 20 образцов, устойчивых к заразихе (включая расы Е, G и Н). Определены два информативных STS (HaP2 и HaP3) и два SCAR (RTS 40 и RTS 40_1) -маркера устойчивости подсолнечника к ЛМР и заразихе соответственно.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

I. В журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. Тихобаева, В.Е. Полиморфизм геномной ДНК однолетних видов подсолнечника / Н.В. Маркин, В.Е. Тихобаева, М.А. Тихонова, В.А. Гаврилова, Т.Т. Трифонова, А.В. Усатов // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень ВНИИМК. – 2010. – Вып. 2 (144-145). – С. 3-7.

2. Тихобаева, В.Е. SSR-анализ геномной ДНК ЦМС-линий подсолнечника / А.В. Усатов, Н.В. Маркин, Ф.И. Горбаченко, М.А. Федорова, В.Е. Тихобаева, О.Ф. Горбаченко, К.В. Азарин // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень ВНИИМК. – 2011. – Вып. 1 (146-147). – С. 15-20.

3. Тихобаева, В. Е. Генотипирование линий подсолнечника с различной устойчивостью к ложной мучнистой росе с помощью STS-маркеров / Н.В. Маркин, В.Е. Тихобаева, Т.В. Усатенко, О.Ф. Горбаченко, А.В. Усатов // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень ВНИИМК. – 2012. – Вып. 2 (151-152). – С. 35-39.

4. Тихобаева, В.Е. Определение информативных ДНК-маркеров гена *Rf1* – восстановителя фертильности пыльцы ЦМС РЕТ1 подсолнечника [Электронный ресурс] / Н.В. Маркин, Т.В. Усатенко, А.В. Усатов, В.Е. Тихобаева, О.Ф. Горбаченко, Г.А. Кулишова, К.В. Азарин // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 4. - Режим доступа: <http://science-education.ru/110-9822> (дата обращения: 09.08.2013).

5. Тихобаева, В.Е. ДНК-маркеры устойчивости к ложной мучнистой росе (*Plasmopara halstedii*) у дикорастущих форм подсолнечника [Электронный ресурс] / А.В. Усатов, К.В. Азарин, В.Е. Тихобаева, М.И. Воличенко, В.А. Гаврилова, Н.В. Маркин // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 4. - Режим доступа: <http://science-education.ru/110-9757> (дата обращения: 23.08.2013).

II. База данных и патент

6. Тихобаева, В.Е. База данных молекулярно-генетических маркеров многолетних дикорастущих видов подсолнечника (*Helianthus L.*) из Мировой коллекции Всероссийского института растениеводства им. Н.И. Вавилова / Н.В. Маркин, А.В. Усатов, В.А. Гаврилова, К.В. Азарин, В.Е. Тихобаева, Ю.В. Денисенко // Свидетельство № 2013620106. Зарегистрировано в Реестре баз данных 9.01.2013.

7. Тихобаева, В.Е. Способ идентификации стерильности/фертильности подсолнечника. / Н.В. Маркин, В.Е. Тихобаева, О.Ф. Горбаченко, А.В. Усатов // Заявка № 2012120815/10 (031463) от 21.05.2012. Дата приоритета 07.06.2013.

III. Другие издания

8. Тихобаева, В.Е. Получение и анализ гибридов подсолнечника на основе нового типа цитоплазматической мужской стерильности – RIG0 / М.А. Тихонова, В.Т. Рожкова, В.Е. Тихобаева // Симбиоз Россия 2009. Материалы II Всероссийского с междунар. участием конгресса студентов и аспирантов-биологов. – Пермь, 2009. – С. 249-250.

9. Тихобаева, В.Е. Определение SCAR-маркера гена *Rf1*, контролирующего восстановление фертильности пыльцы, в генотипах различных линий подсолнечника / Н.В. Маркин, Т.В. Усатенко, В.Е. Тихобаева, О.Ф. Горбаченко, А.В. Усатов // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины. Материалы III Международной научно-практической конференции. – Ростов-на-Дону, 2009. – С. 20-21.

10. Тихобаева, В.Е. Определение гена *Rf1* у однолетних дикорастущих видов подсолнечника / М.А. Тихонова, В.Е. Тихобаева, Т.Т. Толстая // Биология – наука XXI века. Материалы 14-ой Пущинской Международной школы-конференции молодых ученых. – Пущино, 2010. – С. 187-188.

11. Тихобаева, В.Е. SSR-анализ геномной ДНК культурного подсолнечника / В.Е. Тихобаева // Инновационные направления исследований в селекции и технологии возделывания масличных культур. Сборник материалов 6-й Международной конференции молодых ученых и специалистов. – Краснодар, 2011. – С. 303-306.

12. Тихобаева, В.Е. Микросателлитные маркеры культурного подсолнечника / В.Е. Тихобаева, М.А. Федорова // Студент и научно-технический прогресс. Материалы XLIX международной научной студенческой конференции. – Новосибирск. – 2011. – С. 258.

13. Тихобаева, В.Е. Полиморфизм ЦМС-линий подсолнечника / В.Е. Тихобаева, М.А. Федорова // Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий. VII Съезд Общества физиологов растений России. Инновации в биологии для развития сельскохозяйственной продукции. Международная летняя школа. Материалы докладов в двух частях. – Нижний-Новгород, 2011. – Ч. II. – С. 808.

14. Тихобаева, В.Е. Оценка устойчивости линий подсолнечника к ложной мучнистой росе (*Plasmopara halstedii*) / Т.В. Усатенко, В.Е. Тихобаева // актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины. Материалы IV Международной научно-практической конференции. – Ростов-на-Дону, 2011. – С. 200-201.

15. Тихобаева, В.Е. Анализ полиморфизма хлоропластной ДНК дикорастущего подсолнечника *Helianthus petiolaris* / В.Е. Тихобаева, М.А. Федорова, К.В. Азарин // Студент и научно-технический прогресс. Материалы 50-й Юбилейной Международной научной студенческой конференции. – Новосибирск, 2012.

16. Тихобаева, В.Е. Определение полиморфизма линий подсолнечника, обладающих различной устойчивостью к ложной мучнистой росе (*Plasmopara*

halstedii) / В.Е. Тихобаева, В.С. Лотник // Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой. Материалы VI Всероссийской конференции молодых ученых. – Саратов, 2012. – С. 43.

17. Тихобаева, В.Е. Генетические дистанции между родительскими генотипами и эффект гетерозиса у гибридов подсолнечника / А.В. Усатов, О.Ф. Горбаченко, К.В. Азарин, В.Е. Тихобаева // Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы. Материалы Международной научной конференции X съезда Белорусского общества генетиков и селекционеров. – Минск, Республика Беларусь, 2012. – С. 109.

18. Тихобаева, В.Е. Полиморфизм микросателлитных локусов хлоропластного генома дикорастущего подсолнечника (*Helianthus L.*) / Н.В. Маркин, В.Е. Тихобаева, В.А. Гаврилова, А.В. Усатов // Идеи Н.И. Вавилова в современном мире. Тезисы докладов III Вавиловской Международной конференции. – Санкт-Петербург, 2012. – С. 31.

19. Тихобаева, В.Е. RAPD- и SSR-маркеры геномной ДНК однолетних видов подсолнечника / Н.В. Маркин, В.А. Гаврилова, А.В. Усатов, В.Е. Тихобаева // Молекулярно-генетические подходы в таксономии и экологии. Тезисы докладов научной конференции. – Ростов-на-Дону, 2013. – С. 57.

20. Тихобаева, В.Е. STS-маркеры в селекции подсолнечника на устойчивость к ложной мучнистой росе / В.Е. Тихобаева, М.А. Федорова, М.Р. Токаренко // Студент и научно-технический прогресс. Материалы 51-й Международной научной студенческой конференции. - Новосибирск, 2013. – С. 208.

21. Тихобаева, В.Е. Генотипирование образцов подсолнечника с различной устойчивостью к заразице с помощью SCAR-маркеров / М.Р. Токаренко, В.Е. Тихобаева // European Applied Sciences: modern approaches in scientific researches. Conference papers to the 2nd International Scientific Conference. - Stuttgart, Germany, 2013. - Vol. 1. - P. 28-30.

22. Тихобаева, В.Е. Анализ физиолого-биохимических показателей у родительских линий и гибридов подсолнечника после действия окислительного стресса / К.В. Азарин, А.В. Усатов, М.А. Федорова, В.Е. Тихобаева, Н.В. Маркин // Клеточная биология и биотехнология растений. Материалы Международной научно-практической конференции. – Минск, Республика Беларусь, 2013. – С. 90.

23. Тихобаева, В.Е. Сравнительный анализ структуры и ультраструктуры клеток листьев у проростков родительских линий и гибридов подсолнечника / А.В. Усатов, А.М. Федоренко, В.Е. Тихобаева, М.Р. Токаренко // Инновационные направления современной физиологии растений. Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием. – Москва, 2013. – С. 94-95.

24. Тихобаева, В.Е. Определение устойчивости линий подсолнечника к ложной мучнистой росе / Н.В. Маркин, В.Е. Тихобаева, Т.В. Усатенко, М.И. Воличенко // Инновационные направления современной физиологии растений.

Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием. – Москва, 2013. – С. 301.

25. Тихобаева, В.Е. ДНК-маркеры устойчивости к ложной мучнистой росе у однолетних и многолетних видов подсолнечника / К.В. Азарин, В.Е. Тихобаева, М.И. Воличенко, В.А. Гаврилова, Н.В. Маркин // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины. Материалы V Международной научно-практической конференции. – Ростов-на-Дону, 2013. – С. 97-98.

26. Тихобаева, В.Е. Полиморфизм хлоропластной ДНК культурной и дикорастущей форм подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) / Маркин Н.В., Логачева М.Д., Усатов А.В., Тихобаева В.Е., Литючий А.В. // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины. Материалы V Международной научно-практической конференции. – Ростов-на-Дону, 2013. – С. 135-136.

27. Tikhobaeva, V.E. DNA markers for resistance to Downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in wild sunflower / V.E. Tikhobaeva, K.V. Azarin, M.I. Volichenko, V.A. Gavrilova, N.V. Markin // Perspectives for development of molecular and cellular biology. Contributions to the IV International young scientists conference. - Yerevan, Armenia, 2013. – С. 24-25.

IV. Учебное издание

28. Тихобаева, В.Е. Ложная мучнистая роса сельскохозяйственных культур: учебное пособие / К.В. Азарин, В.Е. Тихобаева, Н.В. Маркин, А.В. Усатов // - Ростов-на-Дону: Изд-во Южного федерального университета, 2012. – 120 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВНИИМК – Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур им. В.С. Пустовойта Российской академии сельскохозяйственных наук,

ВИР – ГНУ Всероссийский Научно-Исследовательский Институт Растениеводства имени Н.И. Вавилова Российской академии сельскохозяйственных наук,

ДОС ВНИИМК - ГНУ Донская опытная станция имени Л.А. Жданова Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур Российской академии сельскохозяйственных наук,

ЛМР – ложная мучнистая роса,

мтДНК – митохондриальная ДНК,

ПЦР – полимеразная цепная реакция,

хлДНК – хлоропластная ДНК

ЦМС – цитоплазматическая мужская стерильность,

AFLP – amplified fragment length polymorphism,

RAPD – random amplified polymorphic DNA,
SCAR – sequence characterized amplified region,
SNP – single nucleotide polymorphism,
SSR – simple sequence repeats,
STS – sequence tagged site.