

ков согласно методике (Маркин, 2006). Концентрацию ДНК определяли на флуориметре Quanti Fluor (Promega, США). Полимеразную цепную реакцию проводили в 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 67 мМ трис – HCl, pH 8.8; 16 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.5 мМ MgSO_4 , 0.1 мМ меркаптоэтанол, 0.25 мМ каждого ДНТФ (ДАТФ, ДЦТФ, ДТТФ, ДГТФ), по 20 пМ праймеров; 2.5 ед. Taq-полимеразы, 15 нг выделенной ДНК. Амплификацию проводили в термоциклере PalmCycler (Corbett Research, Австралия). Температурный режим реакций подбирали для каждой пары праймеров с учетом их нуклеотидного состава. Продукты амплификации разделяли в 1,2 % агарозном геле. Гели фотодокументировали с помощью системы GelDoc 2000 (BioRad, США). В качестве маркера массы, использовали 100 bp Ladder DNA marker (Axugen biosciences, США).

Результаты амплификации свидетельствуют, что из 9 изученных SCAR-маркеров, два – *Pr8* и *Pr9*, маркирующие локус Or5 оказались информативными, позволяющие дифференцировать генотипы подсолнечника по признаку устойчивости/чувствительности. При этом в генотипе устойчивых образцов не выявлено специфических ПЦР-фрагментов размером около 360 п.н. (*Pr8*) и 300 п.н. (*Pr9*), наличие которых характерно в генотипах чувствительных образцов, что согласуется с данными литературы (Lu Y.H. et al., 2000).

Полную нуклеотидную последовательность продуктов амплификации с SCAR-маркерами определяли на автоматизированном ДНК секвенаторе Genetic analyzer 3130xl (Applied Biosystems, США) с коммерческим набором BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Последовательности нуклеотидов были проанализированы с помощью программы Blast в GenBank NCBI. Оказалось, что фрагменты ДНК, амплифицированные с праймером *Pr8*, на 98 %, а с праймером *Pr9* на 81 % гомологичны последовательности № gb|HQ222362.1| в Gen Bank (Bachlava et al., 2011). Следовательно, секвенированные нами участки ДНК попадают в семейство генов (сайт NBS – LRR), контролирующих устойчивость подсолнечника к комплексу патогенов, что подтверждает выбор праймеров *Pr8* и *Pr9* в качестве маркеров устойчивости подсолнечника к зарази.

Таким образом, нами генотипированы 10 образцов подсолнечника селекции Донской опытной станции

им. Л.А. Жданова ВНИИМК с различной устойчивостью к наиболее вирулентным в Ростовской области расам зарази. Из 9 изученных маркеров, 2 оказались информативными, для оперативного скрининга устойчивых генотипов к распространенным на юге РФ расам зарази, которые можно рекомендовать в практику для селекции подсолнечника. Проведенные исследования еще раз подтвердили, что одним из надежных и результативных способов получения исходного материала, выносливого к зарази, является селекционный путь, на основе ДНК-маркеров, в результате которого в дальнейшем будут созданы сорта и гибриды, устойчивые к этому растению паразиту.

Список литературы:

1. Антонова Т.С. и др. Вирулентность зарази, поражающей подсолнечник в Волгоградской и Ростовской областях / Т.С. Антонова, Арасланова, С.А. Рамазанова, С.З. Гучетль, Т.А. Челюстикова // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень ВНИИ масличных культур. – Краснодар, 2011. – Вып. №1 (146-147) – С. 127-130.
2. Горбаченко Ф.И., Усатенко Т.В., Горбаченко О.Ф. Результаты селекции подсолнечника на устойчивость к зарази на Дону // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень ВНИИ масличных культур. – Краснодар, 2010. – Вып. №2 (144-145) – С. 30-35.
3. Дьяков А.Б., Васильева Т.А., Бойко Ю.Г. Опасность новых рас зарази для подсолнечника в России и меры предупреждения возможного ущерба // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень ВНИИ масличных культур. – Краснодар, 2008. – Вып. №1 (138) – С. 3-12.
4. Маркин Н.В., Усатов А.В., Федоренко М.А. RAPD-анализ генотипов солеустойчивых форм горчицы (*Brassica juncea* L.) // Экологический вестник научных центров Черноморского экономического сотрудничества. – 2006. – № 2. – С. 78-81.
5. Lu Y.H. Development of SCAR markers linked to the gene Or5 conferring resistance to broomrape (*Orobancha cumana* Wallr.) in sunflower / Lu Y.H., Melero-Vara J.M., Garcia-Tejada J.A., Blanchard P. // Theor. Appl. Genet. – 2000. – V.100. – P. 625-632.

ПОИСК ДОНОРОВ ГЕНА *PL6* СРЕДИ СТАРОДАВНИХ СОРТОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ STS-МАРКЕРОВ

Тихобаева В.Е.¹, Воличенко М.И.¹, Гаврилова В.А.², Маркин Н.В.¹, Усатов А.В.¹

¹Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им.Н.И. Вавилова РАНХ, Санкт-Петербург, Россия

Поиск доноров хозяйственно ценных признаков сельскохозяйственных культур – приоритетная задача современной селекции. Основными источниками этих признаков, как правило, являются дикорастущие предковые формы, либо стародавние сорта-популяции составляющие мировые генетические ресурсы. Известно, что такие сорта и местные популяции сельскохозяйственных растений в результате длительного отбора лучше других приспособлены к локальным условиям произрастания и отличаются оптимальной для данного региона длиной вегетационного периода.

В изучении и использовании генофонда значимую роль

играют методы исследования. Внедрение современных молекулярно-генетических методов в практику биологических исследований значительно повысило эффективность селекционного процесса. ДНК-маркеры востребованных практикой признаков и свойств сельскохозяйственных культур позволяют с достаточно большой точностью и оперативностью отбирать нужные генотипы.

Подсолнечник в Российской Федерации – наиболее рентабельная и возделываемая масличная культура. В Южном федеральном регионе широко распространенным заболеванием на посевах подсолнечника стала ложная мучнистая роса, вызы-

ваемая облигатным грибным паразитом *Plasmopara halstedii*. Ранее нами показано, что для устойчивых генотипов подсолнечника, в отличие от чувствительных, характерно наличие гена *P16*, определяемого при помощи двух информативных STS маркеров – *HaP2* и *HaP3* (Маркин и др., 2012).

В связи с этим, целью работы является определение доноров гена *P16* среди стародавних сортов подсолнечника из Мировой коллекции ВИР.

Геномную ДНК выделяли из молодых листьев подсолнечника по методу Р. Бума с нашими модификациями (Маркин и др., 2006). Полимеразную цепную реакцию проводили в 25 μ л реакционной смеси следующего состава: 67 мМ трис-НСl, рН 8.8; 16мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.5мМ MgSO_4 , 0.1мМ меркаптоэтанол, 0.25мМ каждого ДНТФ, по 10 пМ праймеров; 2.5 ед. Таq-полимеразы, 30 нг выделенной ДНК. Амплификацию проводили в термоциклере (Palm Cycler Corbett Research, Австралия). Термальный режим реакций подбирали для каждой пары праймеров

с учетом их нуклеотидного состава. Продукты амплификации разделяли в 1 % агарозном геле. Гели фотодокументировали с помощью системы GelDoc 2000 (BioRad, США). В качестве маркера массы, использовали GeneRuler 1Kb DNALadder, ready-to-use (Fermentas, Литва).

В результате анализа 45 стародавних сортов были определены 18 потенциальных доноров устойчивости к ложной мучнистой росе подсолнечника (табл. 1), на электрофореграммах амплификации геномной ДНК которых визуализированы два соответствующих маркера с праймерами *HaP2* и *HaP3*. У 10 сортов на электрофореграммах был обнаружен только один маркер-ампликон, полученный либо с праймером *HaP2*, либо с *HaP3*. В данном случае следует провести более глубокий анализ. У остальных 17 образцов специфические ПЦР-фрагменты с этими праймерами не обнаружены (табл. 1). Следовательно, они не устойчивы к современным расам ложной мучнистой росы подсолнечника.

Таблица 1

Наличие гена *P16* в генотипах стародавних сортов подсолнечника из Мировой коллекции ВИР

№ пп.	Сорт или образец	Наличие гена <i>P16</i>		№ пп.	Сорт или образец	Наличие гена <i>P16</i>	
		<i>HaP2</i>	<i>HaP3</i>			<i>HaP2</i>	<i>HaP3</i>
1	Зеленка 139	-	-	24	СМ 225	-	-
2	Зеленка 55	-	-	25	Impira Suta	+	+
3	Зеленка	+	-	26	№ 1	+	+
4	Гяр-Гяр (Герир)	-	-	27	№ 2	+	+
5	Успенка	-	-	28	ТА 6463	-	-
6	Чернянка 11	-	-	29	ТА 4181-8	-	-
7	Ждановский 8281	+	+	30	№ 3	-	+
8	Степняк Р2	+	+	31	№ 4	-	+
9	Грызовой местный	-	-	32	№ 5	-	+
10	№ 6540	+	+	33	№ 6	+	+
11	ВНИИМК 8883	-	-	34	СХМС-29-3	-	+
12	ВНИИМК 8932	-	+	35	№ 7	-	-
13	Армавирский 9343	-	+	36	Мастер	-	-
14	Армавирский 9345	+	+	37	НА R4	-	-
15	Смена	+	+	38	№ 8	+	+
16	Армавирец	-	-	39	НА 89 Б	+	+
17	Заря	+	+	40	НА-89 ЦМС PEF-1А	+	+
18	Спутник	+	+	41	Н.РНА-299	-	-
19	Армавирский 14	-	+	42	НА R5 (VE-0100085)	-	+
20	Салют	±	+	43	НА-61-1	+	+

Продолжение таблицы 1

№ пп.	Сорт или образец	Наличие гена Pl6		№ пп.	Сорт или образец	Наличие гена Pl6	
		HaP2	HaP3			HaP2	HaP3
21	Прогресс	+	+	44	Передовик	+	±
22	СМ 198	-	+	45	№ 9	-	-
23	СМ 204	-	-				

Некоторые, из изученных нами на устойчивость к ложной мучнистой росе, стародавние сорта подсолнечника получены в Краснодарском крае и Ростовской области. В связи с этим, по результатам исследований мы рекомендуем ввести в селекционную программу на устойчивость к ложной мучнистой росе Юга РФ, следующие образцы: № 6540, Армавирский 9345, Смена, Спутник, Салют, Прогресс (Краснодарский край) и Ждановский 8281, Степняк Р2, Передовик (Ростовская область), которые наиболее адаптивны к региональным агроклиматическим зонам.

Таким образом, при помощи STS-маркеров, из 45 стародавних сортов подсолнечника Мировой коллекции ВИР отобраны 18 – несущие ген устойчивости к ложной мучнистой росе. Девять из них можно рекомендовать для введения в селекционную программу подсолнечника Южного

региона.

Список литературы:

1.Маркин, Н.В. RAPD-анализ генотипов солеустойчивых форм горчицы (*Brassica juncea* L.) / Н.В. Маркин, А.В. Усатов, М. Федоренко // Экологический вестник научных центров Черноморского экономического сотрудничества. – 2006. – № 2. – С. 78-81.

2.Маркин, Н.В. 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-техн. бюл. ВНИИМК. – 2012. – Вып. 2 (151-152). – С. 35-39.

МОЛЕКУЛЯРНО – ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КАРИОТИПОВ *DESCHMPSIA ANTARCTICA* С ДВУХ ОСТРОВОВ ПРИМОРСКОЙ АНТАРКТИДЫ

А.В. Амосова¹, Т.Е. Саматадзе¹, М.О.Твардовская², С.А. Зошук¹, В.А.Кунах², О.В. Муравенко¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

²Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина

ВВЕДЕНИЕ. Щучка или луговик антарктический *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*) (2n=26) – одно из двух видов цветковых растений, произрастающих на островах в Приморской Антарктиде. Растение хорошо приспособлено к суровым условиям обитания (экстремально низкие температуры, засуха, сильный ветер и высокий уровень УФ-радиации) и обладает значительной изменчивостью по содержанию ДНК в ядре, а также высоким уровнем генетической гетерогенности растений, собранных на отдельных островах Приморской Антарктиды. Это растение является удобной моделью для изучения механизмов адаптации генома к экстремальным условиям произрастания и перспективным источником генов устойчивости для селекции и биотехнологии. Известно, что стрессовые факторы среды могут вызывать изменения структуры генома, которые выявляются при исследовании числа (появление В-хромосом, анеуплоидия) и морфологии (структурные перестройки) хромосом, а также изменчивости молекулярно-цитогенетических маркеров. Вместе с тем, изучены только монохромно окрашенные хромосомы *D. antarctica*: определено число и описана формула кариотипа (Moore, 1967; Cardone *et al.*, 2008). Хромосомный полиморфизм в кариотипах *D. antarctica*, произрастающей на разных островах Приморской Антарктиды до сих пор не изучен. Нами впервые было проведено такое исследование.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В качестве материала для

исследований использованы растения, полученных методом микроклонального размножения из разных видовых образцов *D. antarctica*, которые собраны на о.Гелиндез и о.Дарбо в Приморской Антарктиде. Хромосомные препараты готовили из корневой меристемы с использованием обработки 0,2% колхицином для накопления митозов. Цитогенетическое изучение проведено с применением С- и DAPI-дифференциального окрашивания, флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с зондами 26S рДНК и 5S рДНК. Изучение активности ЯОР хромосом проводили по методике Ag-NOR-окрашивания. Анализ метафазных пластинок проводили при помощи флуоресцентного микроскопа Olimpus BX61с черно-белой ПЗС камерой CoolSnap ("Roper ScientificInc", США). Хромосомы в кариотипах расположены по размеру и центромерному индексу в соответствии с цитологическими принципами (Levan *et al.*, 1964).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ. В кариотипах двух изученных образцов *D. antarctica* наблюдали 13 пар (2n=26) хромосом размерами около 3-10 мкм. В кариотипах растений, полученных с острова Дарбо, наряду с 26 хромосомами основного набора (А-хромосомы), впервые обнаружены от 1 до 3 микрохромосом, предположительно, В-хромосом. Вариабельности по числу основного набора хромосом не обнаружено.

Рисунок С-дифференциального окрашивания хромосом относится к «прицентромерно-теломерному» типу с