

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 1,7 % агарозном геле. Гели фотодокументировали с помощью системы GelDoc 2000 (BioRad, США). В качестве маркера массы, использовали 100 bp Ladder DNA marker (Axugen biosciences, США).

По результатам амплификации между исследуемыми образцами выявлены аллельные различия. Размеры амплифицированных фрагментов различались по всем изученным праймерам.

В таблице 1 представлены количественные показатели

40 генотипов гибридов F₂. Видно, что полученные результаты по каждому из 5 генов значительно отличаются от теоретически ожидаемых (1:2:1). Такое отклонение вероятно связано с влиянием отбора, так как в анализ отбирали по фенотипу лучшие в селекционном отношении растения, а гены Pi сцеплены с многими нежелательными признаками, такими как осыпаемость колосков, позднеспелость, гибридная стерильность, остистость, высокорослость. Более того мы отбирали в анализ фертильные формы, которые являются гомозиготами, в то время как гетерозиготы имеют повышенную стерильность.

Таблица 1

Количество генотипов в F₂

Генотипы	Гены устойчивости к пирикулярриозу				
	Pi 1	Pi 2	Pi 33	Pi b	Pi ta
Доминантные гомозиготы Pi Pi	24	19	14	30	31
Гетерозиготы Pi pi	3	9	0	4	0
Рецессивные гомозиготы pi pi	13	12	26	6	9

Таким образом, в результате ПЦР-анализа образцов с пирамидированными генами устойчивости удалось выделить один образец риса, гомозиготный по всем 5 доминантным аллелям. Этот генотип представляет особый интерес для дальнейшей селекции. Так же показано, что с помощью изученных ДНК-маркеров, можно эффективно отбирать образцы с различной степенью пирамидирования генов для их дальнейшей селекции.

Список литературы:

1. <http://www.fao.org>
2. Маркин Н.В., Усатов А.В., Федоренко М.А. RAPD-анализ генотипов солеустойчивых форм горчицы (*Brassica*

jupsea L.) // Экологический вестник научных центров Черноморского экономического сотрудничества. – 2006. – № 2. – С. 78-81.

3. Мухина Ж.М. Эффективность методов молекулярного маркирования в селекции, семеноводстве сельскохозяйственных культур и для изучения биоразнообразия растительных ресурсов // Автореферат дисс... докт. биол. наук, Краснодар, 2012. – 47 с.

4. Супрун И.И. Использование ДНК-маркеров в селекционно-генетических исследованиях риса // Автореферат дисс... канд. биол. наук, Краснодар, 2004. – 24 с.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ИСХОДНОГО СЕЛЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА ПОДСОЛНЕЧНИКА С РАЗЛИЧНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ЗАРАЗИХЕ (*OROBANCHE CUMANA WALLR*)

Токаренко М.Р., Тихобаева В.Е., Горбаченко О.Ф., Усатова О.А., Азарин К.В.

Южный федеральный университет Ростов-на-Дону, РФ
Донская опытная станция им. Л.А. Жданова, Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур имени В.С. Пустовойта, п. Опорный, Ростовская область, РФ

Заразиха подсолнечная (*Orobanche cumana Wallr*) – узкоспециализированный паразит, представленный многочисленными расами, постоянно возникающими в результате сопряженной эволюции паразита и хозяина, которые способны преодолевать иммунитет устойчивых сортов и гибридов подсолнечника. Сегодня у подсолнечника дифференцировано 8 рас *O. cumana*: А, В, С, D, E, F, G, H (Дьяков, 2008, Антонова, 2011). Угроза снижения урожая подсолнечника из-за поражения различными расами заразихи обусловила необходимость создания устойчивых и выносливых генотипов к этому растению паразиту.

Внедрение молекулярных маркеров в практику биологических исследований расширили возможности маркирования селекционных признаков, в том числе устойчивость к патогенам. ДНК-маркеры особенно эффективны для бы-

строй идентификации в больших выборках потенциально устойчивых генотипов к патогену. Так как устойчивость к заразихе у подсолнечника контролируется семейством доминантных генов *Or*, нами были выбраны SCAR-маркеры локуса *Or5*, ассоциированные с устойчивостью подсолнечника к заразихе (Lu Y.H. et al., 2000).

На базе Донской опытной станции им. Л.А. Жданова ВНИИМК создан инфекционный участок, на котором ежегодно в полевых условиях оценивают сотни линий и сортов подсолнечника на устойчивость к заразихе (Горбаченко, 2010). По результатам полевых и лабораторных исследований были отобраны 5 селекционных образцов полностью устойчивых и 5 образцов наиболее чувствительных к этому паразиту.

Геномную ДНК выделяли из листовой ткани пророст-

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 заразице.

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 заразицы. Из 9 изученных маркеров, 2 оказались информативными, для оперативного скрининга устойчивых генотипов к распространенным на юге РФ расам заразицы, 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 заразице, 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 заразицы, поражающей подсолнечник в Волгоградской и Ростовской областях / Т.С. Антонова, Арасланова, С.А. Рамазанова, С.З. Гучетль, Т.А. Челюстникова // 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 заразице 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 заразицы 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 РАСХН, 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 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 мушкетерная роса, вызы-