На правах рукописи

ДОМБЛИДЕС Артур Сергеевич

УДК 577.215:631.52:635.1/.7

ИНТЕГРАЦИЯ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАРКИРОВАНИЯ С СЕЛЕКЦИОННЫМ ПРОЦЕССОМ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР

Специальность: 06.01.05 – селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений

Автореферат

Диссертации на соискание учёной степени
доктора сельскохозяйственных наук

Москва – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр овощеводства» Минобрнауки РФ (ФГБНУ ФНЦО) в 2003-2021 гг.

Научный консультант:
доктор сельскохозяйственных наук, профессор,
академик РАН, научный руководитель
ФГБНУ ФНЦО **Пивоваров Виктор Фёдорович**

Официальные оппоненты:
доктор биологических наук, профессор,
академик РАН, научный руководитель ФГБНУ
«Всероссийский научно-исследовательский
институт сельскохозяйственной
биотехнологии» **Харченко Пётр Николаевич**

доктор биологических наук, директор
ФГБНУ «Агрофизический
научно-исследовательский институт» **Чесноков Юрий Валентинович**

доктор биологических наук, профессор,
заведующая кафедрой биотехнологии
ФГБНУ «Российский государственный
аграрный университет –МСХА
имени К.А.Тимирязева» **Калашникова Елена Анатольевна**

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова»

Защита состоится « 7 » апреля 2022 года в 10:00 на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 220.019.02, созданном на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства» по адресу: 143080, Московская область, Одинцовский район, п. ВНИИССОК, ул. Селекционная, 14.

Тел: +7 (495) 599-24-42 E-mail: vniissok@mail.ru;
Факс: +7(495) 599-22-77; aspirantura@vniissok.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства» и на сайте института www.vniissok.ru

Автореферат разослан «____»_____2021 года

Учёный секретарь совета по защите
докторских и кандидатских
диссертаций Д 220.019.02,
доктор сельскохозяйственных наук,
старший научный сотрудник Бондарева Людмила Леонидовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Разработка и применение генетических технологий для изучения и оценки биоразнообразия культурных и диких форм растений во многом определяет основные направления селекционной работы на улучшения хозяйственно ценных качеств. Основное направление использования этих методов – выявление уровня генетической изменчивости среди селекционных образцов с определением ценных генотипов или изучение отдельных функциональных участков ДНК, влияющих на свойства растений. Несмотря на то, что изменчивость может быть оценена на фенотипическом уровне по ряду морфологических показателей, число этих характеристик по сравнению с вариабельностью ДНК молекулы ограничено, и не все важные свойства могут быть выявлены только при внешней и/или даже более глубокой биохимической оценке. Селекция только по фенотипу может вызвать потерю многих признаков в ходе отбора, наличие которых также будет трудно проследить и в дальнейшем потомстве после скрещивания. Современное развитие технологий маркирования ДНК идёт по пути от фрагментного анализа с применением методов RAPD, ISSR, AFLP до увеличения точности и производительности, как при использовании SSR и SNP-маркеров, где определяется каждый раз большее число мутационных событий за один проведённый анализ. Кроме того, ДНК-технологии позволяют проводить поиск генов хозяйственно ценных признаков среди большого разнообразия исходных и используемых селекционных образцов сокращая время и средства для полевой фенотипической оценки. Развитие систем ДНК-маркирования помогает реализации селекционных программ по получению новых форм овощных культур, хотя необходимо отметить, что несмотря на большое число исследований многие селекционно ценные генотипы и генисточники остаются неизученными по таким причинам, как невысокая производительности анализа при значительных затратах, отсутствие стандартной обработки полученных результатов и отсутствие начальной генетической информации об используемом селекционном материале. Таким образом, генетическое маркирование становиться важным условием проведения селекционной работы

у овощных культур при отборе новых конкурентоспособных генотипов. Внедрение таких технологий становиться неотъемлемой и актуальной задачей в современной селекции сельскохозяйственных растений.

Цель работы. Разработать системы ДНК-маркирования, адаптировать существующие подходы генетического анализа, реализуя применение этих методов для усовершенствования селекционного процесса и ускоренного получения новых форм овощных культур.

Задачи исследований:

1. Разработать систему ДНК-маркирования генотипов с использованием различных методов для эффективной селекции овощных культур.
2. Определить генетическую изменчивость, изучить генетическое разнообразие по степени схожести и различия используемых селекционных образцов овощных культур и классифицировать их соответственно генетической основе с применением различных методов ДНК-маркирования.
3. Провести генетическую оценку исходного селекционного материала и выявить на основе результатов ДНК-анализа ценные генисточники среди используемых селекционных образцов овощных культур.
4. Разработать ДНК-маркеры для оценки признаков овощных культур для селекции генотипов с высокими качественными характеристиками у моркови столовой на содержание каротина и капусты огородной на содержание аскорбиновой кислоты.
5. Провести оценку ценного селекционного материала на наличие генов хозяйственно ценных признаков, включающих генетические факторы мужской стерильности, устойчивости к вирусным заболеваниям.
6. Оптимизировать и адаптировать методы ДНК-маркирования для оценки исходного и используемого селекционного материала овощных культур.

Научная новизна. Впервые установлены генетические взаимосвязи между ценными селекционными образцами видов, разновидностей, современных и стародавних сортов капусты кочанной, линий, гибридов, биотехнологических линий овощных культур семейства капустные на основе полиморфизма RAPD и SSR-маркеров. Впервые обнаружен аллельный вариант гена *orf138*, вызывающего стерильность *Ogura*, сочетающего делецию (*Ogura* тип-F) и две замены (*Ogura* тип –A) у капусты белокочанной Текила F1. Впервые адаптирован метод выявления сразу пяти типов стерильной цитоплазмы *Ogura*, *Ogu-NWSUAF*, *Nap*, *Pol*, *Cam* методом мультиплексной ПЦР для овощных культур семейства капустные. Впервые расшифрованы последовательности транскрибируемых участков генов, кодирующих ферменты синтеза аскорбиновой кислоты ГДФ-L-галактозофосфорилазу (*VTC2*), L-галактозо-1-фосфат фосфатазу (*VTC4*) и L-галактозодегидрогеназу у селекционно ценных сортов вида *B. oleracea* L. Впервые разработана система праймеров для оценки уровня экспрессии генов, кодирующих ферменты синтеза аскорбиновой кислоты ГДФ-L-галактозофосфорилазу (*VTC2*) и L-галактозодегидрогеназу для представителей вида *B. oleracea* L. Впервые определены генетические взаимосвязи между хозяйственно ценными видами, межвидовыми гибридными формами и сортами представителей рода *Allium* на основе полиморфизма ISSR и SSR-маркеров. Адаптирован метод ISSR-PCR для ускоренной оценки происхождения форм, полученных при отдалённой гибридизации видов рода *Allium*. Установлен высокий уровень полиморфизма микросателлитных локусов среди ранее неизученных селекционных генотипов чеснока *A. sativum* L.

Практическая значимость. С использованием RAPD и SSR-маркеров проведена генетическая идентификация сортов, линий составляющих более чем 50 селекционных образцов капустных культур. Данные о генетических взаимоотношениях позволили определить отдалённые и родственные ценные генотипы, которые вовлечены в процесс селекции на получение новых форм. Установлено, что инбредные линии значительно отличаются генетически от исходного генотипа. Таким же образом по результатам SSR-анализа доказано проис-

хождение и подтверждена гомозиготность растений капусты белокочанной, полученной через культуру изолированных микроспор.

С помощью адаптированных ДНК-методов проведена идентификация типов цитоплазмы у 40 ценных селекционных образцов семейства Капустные. Расшифрованная последовательность обнаруженного нового аллельного варианта гена *orf138* депонирована в генетическую базу данных NCBI (KR149045.1).

Разработаны и адаптированы ДНК-маркеры для оценки уровня синтеза аскорбиновой кислоты у капусты *B. oleracea* L. и каротина у моркови *Daucus carota* L. позволяющие выявлять генисточники с высокими показателями качества. С использованием данных ДНК-анализа в процессе отбора селекционных образцов сельдерея и петрушки были получены сорта Атлант и Нежность, которые, как было подтверждено генетически, отличались от других селекционных генотипов.

Использование ДНК-маркеров для определения факторов стерильности в цитоплазме и генов *Rf* в ядре у лука репчатого позволяет выявить стерильные линии, линии закрепители стерильности и линии восстанавливающие фертильность. Разработан эффективный метод на основе ISSR-ПЦР для ускоренного подтверждения гибридного происхождения форм, полученных при скрещивании видов рода *Allium*.

Маркирование генов устойчивости у фасоли позволило установить, что большинство из коллекционных образцов содержали рецессивный ген *bc-3*, а 14 образцов содержали ген *I*, который отвечает за устойчивость к вирусу. Практически подтверждено, что гены *I* и *bc-1*^{2} играют определяющую роль в проявлении устойчивости к вирусу обыкновенной мозаики.

Положения, выносимые на защиту:

- Оценка генетической изменчивости селекционных образцов капустных культур выявляет ценные генотипы для дальнейшего селекционного процесса. Факторы мужской стерильности и гены синтеза аскорбиновой кислоты и их экспрессия идентифицируются на основе результатов ДНК-анализа.

- Результаты генетической идентификации подтверждали происхождение селекционных генотипов моркови столовой. Используемые селекционные образцы моркови столовой, согласно результатам ДНК-анализа обладали стерильностью типа петалоид. Уровень экспрессии генов синтеза каротиноидов определяется генетической основой селекционных образцов моркови столовой. ДНК-маркеры генетически определяют разновидности сельдерея и петрушки с выявлением полиморфизма между соответствующими селекционными генотипами.

- Для рационального использования в селекционных программах необходима генетическая классификация сортов видов, и особенно форм, полученных от межвидовой гибридизации у представителей рода *Allium*. Для получения гибридов у лука репчатого необходимые линии закрепители стерильности, стерильные линии, которые идентифицируются с использованием ДНК-маркеров.

- Выявление генисточников устойчивости у фасоли обыкновенной возможно только при определении сочетания аллелей устойчивости с помощью ДНК-анализа.

Апробация результатов исследований. Значимые научные результаты в форме устных и стендовых докладов были представлены на 26 Российских и Международных научных мероприятиях, среди которых: VI International Symposium on Brassica and VIII Crucifer Genetic Workshop “Exploitation of Brassica Diversity for Improving Agriculture Chain”, 2012 – Catania, Italy; Международная научная конференция «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы», 2012 - Минск, Белоруссия; Международная научно-практической конференции «Современные тенденции развития селекции и семеноводства капустных культур», 2013 - ФГБНУ ФНЦО (ВНИИССОК); VIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2014», 2014 – Москва; VI съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) и ассоциированные генетические симпозиумы, 2014 - Ростов-на-Дону; International Symposium on Carrot and Other Apiaceae, 2014 – Anger, France; VI Международная научно-практической

конференция «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира», 2014 - Никитский ботанический сад, Ялта, Республика Крым, Россия; VII International Symposium on Edible Alliaceae, 2015 – Nigde, Turkey; International Union for the Protection of New Varieties of Plants, Fifteenth Session UPOV, 2016 – Moscow, Russian Federation; The 69th Agronomic Congress of Chile and the 16th Congress of the Chilean Fruit, 2018 - The Agronomic Society of, the Institute of Agricultural Research (INIA) and the University of Magallanes (UMAG), Punta Arenas, Chile; Международная конференция «Состояние и перспективы селекционных исследований культур семейства Brassicaceae в современных условиях», 2019 - Санкт-Петербург; VII международная научно-практическая конференция «Современные тенденции в селекции, семеноводстве и товарном производстве овощных, бахчевых и цветочных культур. Традиции, современность, перспективы», посвящена 100-летию основания Федерального государственного научного учреждения «Федеральный научный центр овощеводства», 2020 – ФГБНУ ФНЦО (ВНИИССОК).

Публикации по результатам диссертационной работы. Результаты исследований представлены в 41 печатных работах, из которых 8 – база данных Scopus; 8 – издания, рекомендованные ВАК; 25 - остальные издания.

Личное участие соискателя в полученных результатах. Автор провёл аналитический обзор литературных данных, планирование и осуществление экспериментов на базе лаборатории генетики и цитологии ФГБНУ ФНЦО. Установка необходимой приборной базы, подготовка условий, координация и реализации исследовательских работ проводилась совместно с научным консультантом. Автор выражает глубокую благодарность за предоставленный для работы ценный селекционный материал заведующим и сотрудникам лабораторий ФГБНУ ФНЦО: селекции и семеноводства капустных культур; селекции и семеноводства столовых корнеплодов; селекции и семеноводства луковых культур; селекции и семеноводства зеленных, пряно-вкусовых и цветочных культур; репродуктивной биотехнологии в селекции сельскохозяйственных растений; селекции семеноводства бобовых культур; а также сотрудникам Фе-

дерального исследовательского центра Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова; сотрудникам Белорусской государственной сельскохозяйственной академии; селекционерам компании Agrosvitfarm.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, куда входят описание использованного материала, методов исследования, результаты исследований, заключение, выводы по результатам, библиографический список использованной литературы и приложение. Общий объем диссертации составляет 349 страницы печатного компьютерного текста, включая 37 таблиц и 119 рисунков. Библиографический список литературы насчитывает 614 источника, из которых 587 на иностранных языках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объекты исследований. У Brassicaceae были использованы растения разновидностей, сортов и линии вида *Brassica oleracea* L.; разновидности, сорта линии вида *Brassica rapa* L., сорта *Raphanus sativus* L., ценные образцы дайкона *R. sativus* L. ssp. *acanthiformis* (Morel) Stankev., образцы капусты японской Mizuna, Mibuna (11 генотипов), шесть образцов озимой сурепицы три образца *Brassica napus* subsp. *oleifera* (DC.) Metzg. и один образец горчицы *Brassica juncea* (L.) Czern. Для исследований по моркови *Daucus carota* subsp. *sativus* (Hoffm.) были отобраны 25 сортов и полученные в культуре семяпочек биотехнологические линии. Для исследования по семейству Сельдерейные были отобраны сорта, разновидности сельдерея *Apium graveolens* L., и сорта, разновидности петрушки *Petroselinum crispum* (Mill.) *Fuss*. Изучение генетического происхождения в роде *Allium* проводили с видами луков *A. fistulosum* L., *A. altaicum* Pall., *A. nutans* L., *A. schoenoprasum* L., *A. odorum* L., *A. cepa* L. и гибридными комбинациями между видами *A. cepa* L. и видами *A. fistulosum* L., *A. nutans* L., *A. schoenoprasum* L. Для ДНК-типирования были отобраны традиционные сорта лука репчатого. Для изучения биоразнообразия чеснока озимого *A. sativum* L. было отобрано 54 селекционных образца. Для поиска генов стерильности были взяты 19 селекционных образцов лука репчатого. Для поиска генов устойчиво-

сти были использованы два вида *Phaseolus coccineus* L. и *P. lunatus* L. 32 сорта и гибридных комбинаций фасоли овощной (*P. vulgaris* L.).

Методы исследований. Выделение ДНК из растений производили двумя основными методами: с использованием детергента додецилсульфат натрия (SDS) по протоколу Dellaporta S.L., Wood и Hicks (1983); и с использованием детергента цетилтриметиламмония бромида (CTAB) по базовому протоколу Murray и Thompson (1980). Экстракцию тотальной РНК проводили в колонках согласно инструкции, прилагаемому к набору для выделения растительной РНК, Aurum™ Total RNA Mini Kit (Bio-Rad). Разработку праймеров осуществляли на целевые нуклеотидные последовательности полученные в настоящем исследовании или отобранные из генетической базы данных The Arabidopsis Information Resource (TAIR) (Huala et al., 2001; Berardini et al., 2015) и National Center for Biotechnology Information (NCBI) (NCBI Resource Coordinators, 2018) с использованием программы Primer-BLAST (Ye et al., 2012). Синтез олигонуклеотидов (праймеров) производили в научно-производственных компаниях «Синтол» и «Евроген» (Москва).

Базовую постановку ПЦР проводили в реакционной смеси (объем 25 мкл), которая включала 2,5 мкл 10Х ПЦР буфера, 2,5 мМ $MgCl_2$, 0,25 мМ каждого dNTP, 0,3 мкМ каждого праймера, 1,5 ед. Taq ДНК-полимеразы (ООО «Синтол», Москва) и 3 мкл ДНК каждого исследуемого образца. Основной протокол амплификации включал следующие этапы: 45 с при 92-95 °С (денатурация), 30 с при температуре от 35 до 62 °С в зависимости от пары праймеров (отжиг) и метода анализа, от 30 с до 1 мин при 72 °С (элонгация). Амплификацию осуществляли на приборе C1000 Touch (Bio-Rad). Обратную транскрипцию выделенной РНК проводили с использованием смеси iScript RT (BioRad). ОТ-ПЦР осуществляли на приборе CFX96 (Bio-Rad) с применением набора реактивов мастермикс SsoAdvanced universal (Bio-Rad). Программа амлификации состояла из шага денатурации при 98°С, 30 сек., и последующих 39 циклов денатурации с 95°С, 15 сек. и отжига, элонгации и детекции флюоресценции при 60°С, 35 сек. Эффективность ПЦР проверяли на серии разведённых образцов по

каждому гену. Относительный уровень экспрессии изучаемого гена был посчитан методом Pfaffl (2001), на основе которого нормализуются Ct значения, полученные с изучаемого гена с Ct значениями референсных генов с учётом различий в количестве исходной РНК, эффективности обратной транскрипции, эффективности ПЦР и ошибок раскапывания. Разделение продуктов амплификации проводили в горизонтальных агарозных гелях и вертикальных 6 % полиакриламидных гелях с использованием электрофоретических ячеек Sub-Cell GT Cell, Mini-Sub Cell GT, систем Sequi-Gen GT и Mini-PROTEAN Tetra Cell, и автоматической станции Experion™ (Bio-Rad). Гели различного формата документировали на установке ChemiDoc XPS+ (Bio-Rad). Секвенирование продуктов амплификации проводили в научно-производственной компании Синтол (Москва) на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3100 (Thermo Fisher Scientific). При подсчёте ПЦР-фрагментов учитывали присутствие и отсутствие продукта (1 и 0, соответственно) для составления итоговой бинарной матрицы. Расчёт генетических расстояний проводили с использованием коэффициента в статистических пакетах Genstat 6 (GENSTAT 6, 2002) и Darwin 6 (Perrier, Jacquemoud-Collet, 2006). Частоту фрагментов и процент изменчивости рассчитывали в программе GenAlEx 6.5 (https://biology-assets.anu.edu.au/GenAlEx/Download.html). Для изучения структуры популяции селекционных образцов использовали программу STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Выравнивание расшифрованных участков ДНК и построение кладограмм осуществляли в пакетах программ MEGA5 (Tamura et al., 2011), CLC sequence viewer 6 (http://www.clcbio.com) и сервиса BLAST (Altschul et al., 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Определение генетического разнообразия капустных культур на основе ДНК-маркирования

RAPD-маркеры были использованы для генетической идентификации 45 селекционных образцов капусты, принадлежащей к двум видам *B. oleracea* L. и *B. rapa* L. В ходе исследования было отобрано девять праймеров, с которыми

было получено 137 локусов, включая 128 полиморфных. Полиморфизм среди образцов *B. oleracea* L. составлял 89,78%, а среди *B. rapa* L. 85,40%. Согласно рисунку 1 на построенной дендрограмме по результатам оценки образцы каждого из двух видов образовали отдельные кластеры.

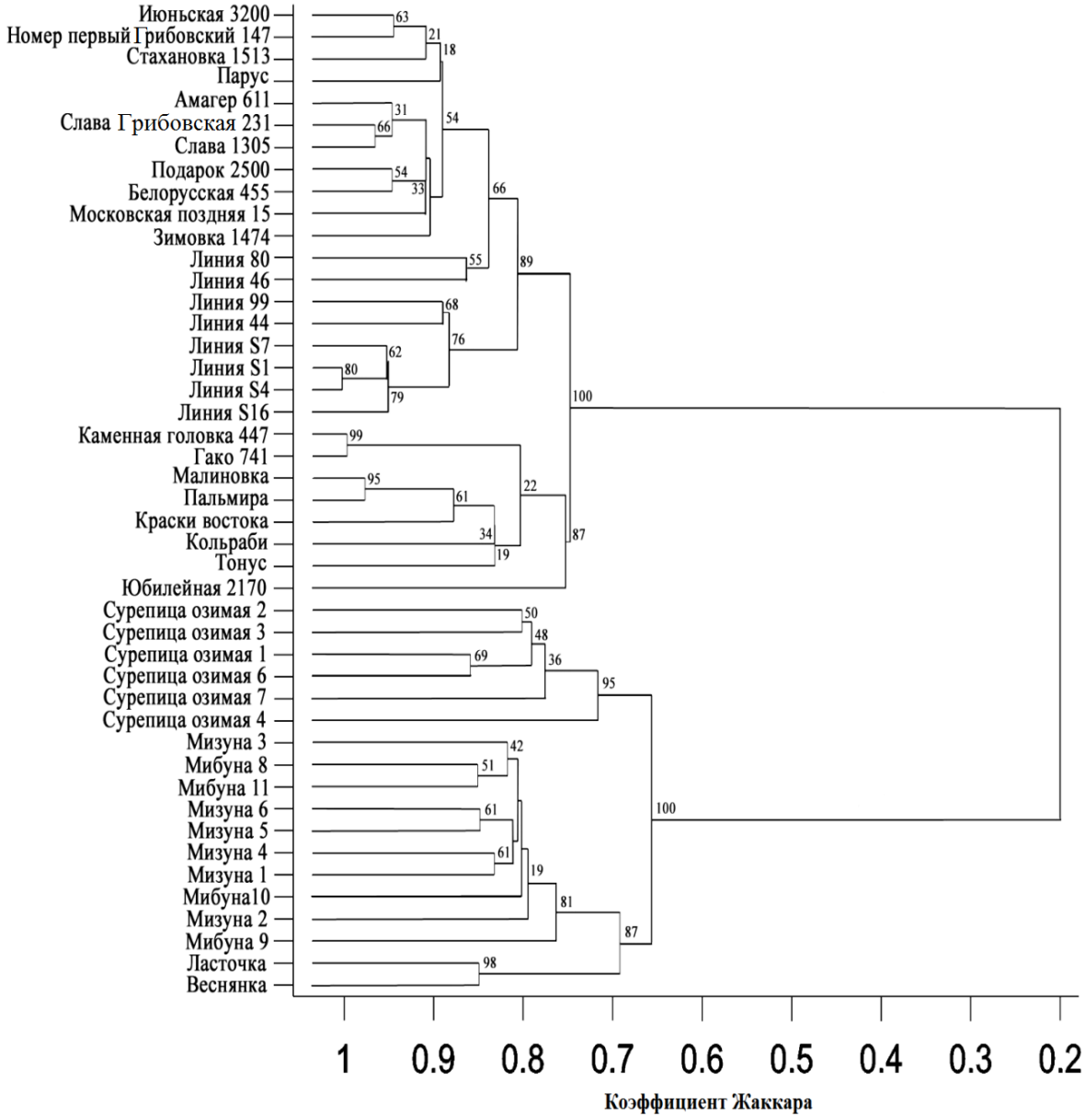

Рисунок 1 – Дендрограмма генетических расстояний образцов капустных культур, построенная по результатам подсчёта RAPD фрагментов. Значения бутстрэпа посчитаны для 1000 реплик

В кластер вида *B. oleracea* L. вошли все образцы капусты белокочанной, и генетически отличные разновидности, капусты краснокочанной (Каменная го-

ловка 477, Гако 741), капусты декоративной (Малиновка, Пальмира, Краски Востока), кольраби, брокколи (Тонус) и савойской капусты (Юбилейная 2170). Среди генотипов капусты белокочанной можно выделить группу ранних, среднеранних сортов, группу среднеспелых и позднеспелых сортов. Так, раннеспелые сорта Июньская 3200 и Номер первый Грибовкий 147 образовали отдельную группу, рядом с которой находился среднеранний сорт Стахановка 1513. Среднеспелые сорта Слава 1305 и Слава Грибовская 231 имели наименьшие генетические различия (индекс 0,95) среди исследованных сортов.

Сорт Подарок образовывал одну кладу с среднеспелым сортом Белорусская 455, что так же можно объяснить общностью их генетической основы (Подарок 1500 был выведен при участии Белорусская 455). В отдельном подкластере объединились стерильные линии (S1, S7, S4, S16). Вместе расположились две самосовместимые фертильные линии (99 и 44) выделенные из сорта Зимовка. Две фертильные самосовместимые линии (80 и 46), выделенные из сорта Белорусская 455, также были сгруппированы вместе. В кластере с образцами *B. rapa* L., образовались две группы. В первую вошли образцы сурепицы озимой, а во вторую образцы японской и китайской капусты. Генотипы капусты японской не разделились точно в соответствии с их сортотипам Mizuna и Mibuna. Только четыре из шести образцов сортотипа Мизуна (Сэнсудзи куо (j6), j5, Shirojuki sensuji (j4), j1) образовали отдельную группу. Из четырёх образцов сортотипа Мибуна два сгруппировались вместе (j8 и j11), а два других не вошли не в одну из групп (Бансэи маруба (j9) и Васэ мибуна (j10)). Сорта капусты китайской (Ласточка, Веснянка) выделились в отдельную ветвь значительно отличаясь от образцов капусты японской группы.

Таким образом, RAPD-маркеры, позволили исследовать генетическое разнообразие представителей рода *Brassica*, разделить виды, разновидности и сорта у исследованных образцов капустных культур и установить филогенетические взаимосвязи, видовом, внутривидовом и межсортовом уровнях.

SSR-маркеры в отличие от мультилокусных RAPD-маркеров обладают локус-специфичностью и большим уровнем изменчивости. SSR-анализ был ис-

пользован для выявления генетического разнообразия среди сортов, линий и гибридов капусты кочанной разновидности. При амплификации 21 микросателлитного локуса для вида *B. oleracea* L. было получено 103 аллеля со средним числом 4,9 для каждого локуса. При этом для изученных образцов выявили 13 специфичных аллелей. Наибольшее число специфичных аллелей (семь) было найдено у генотипов Северянка F_1, Белорусская 455, Подарок 2500, Амагер 611 и Зимовка 1474. Размеры продуктов амплификации варьировали от 130 до 410 п.н. Наиболее информативные SSR-локусы AF458409 и BZ523957 с индексом информативности для соответствующих пар праймеров 0,90 и 0,86, соответственно были представлены пятью аллелями. Однако менее информативные SSR-локусы с PIC праймеров 0,69 могли содержать большое число аллелей — до 13, как у локуса CC969431, или 11, как у локусов CC956699, CC969507 и AF113918. Наименьшее значение PIC для праймеров локуса AF180355 было 0,30, где обнаружили всего 2 аллеля. В итоге общий процент выявленного полиморфизма составлял 76%, что было сравнимо с исследованиями других авторов на этой культуре. Результаты анализа данных в STRUCTURE показали, что все тестируемые образцы лучшим образом распределились по шести кластерам (ΔK = 2,05), где сгруппировались соответственно их происхождению. Согласно дендрограмме, изображённой на рисунке 2 образцы капусты Северянка F_1, Белорусская 455, Подарок 2500, Амагер 611 и Зимовка 1474 голландской группы с происхождением из Северо-Западной Европы объединились в общий кластер. Высокое генетическое сходство сортов Амагер 611, Белорусская 455 и Подарок 2500 подтверждает то, что последний был получен посредством сложной гибридизации двух первых. Относительно новый гибрид Северянка F_1 с улучшенными показателями качества и устойчивости к фузариозному увяданию, киле и бактериозу был создан при участии сортов Белорусская 455, Зимовка 1474 и Подарок 2500, выведенных на Грибовской опытной станции. Сорт Белорусская 455 имел происхождение из Витебской области и был получен с помощью отбора наиболее скороспелых форм и районирован с 1943 года. Районированный в том же году и обладающий высокой продуктивностью позднеспелый

сорт Московская поздняя 15 находился в отдельном подкластере, ближе к более поздним по спелости образцам, что объясняет его местное происхождение из сорта Пышкинская. Генетическая отдалённость этого сорта также подтверждается его принадлежностью к отдельному сортотипу в Среднерусской группе сортов.

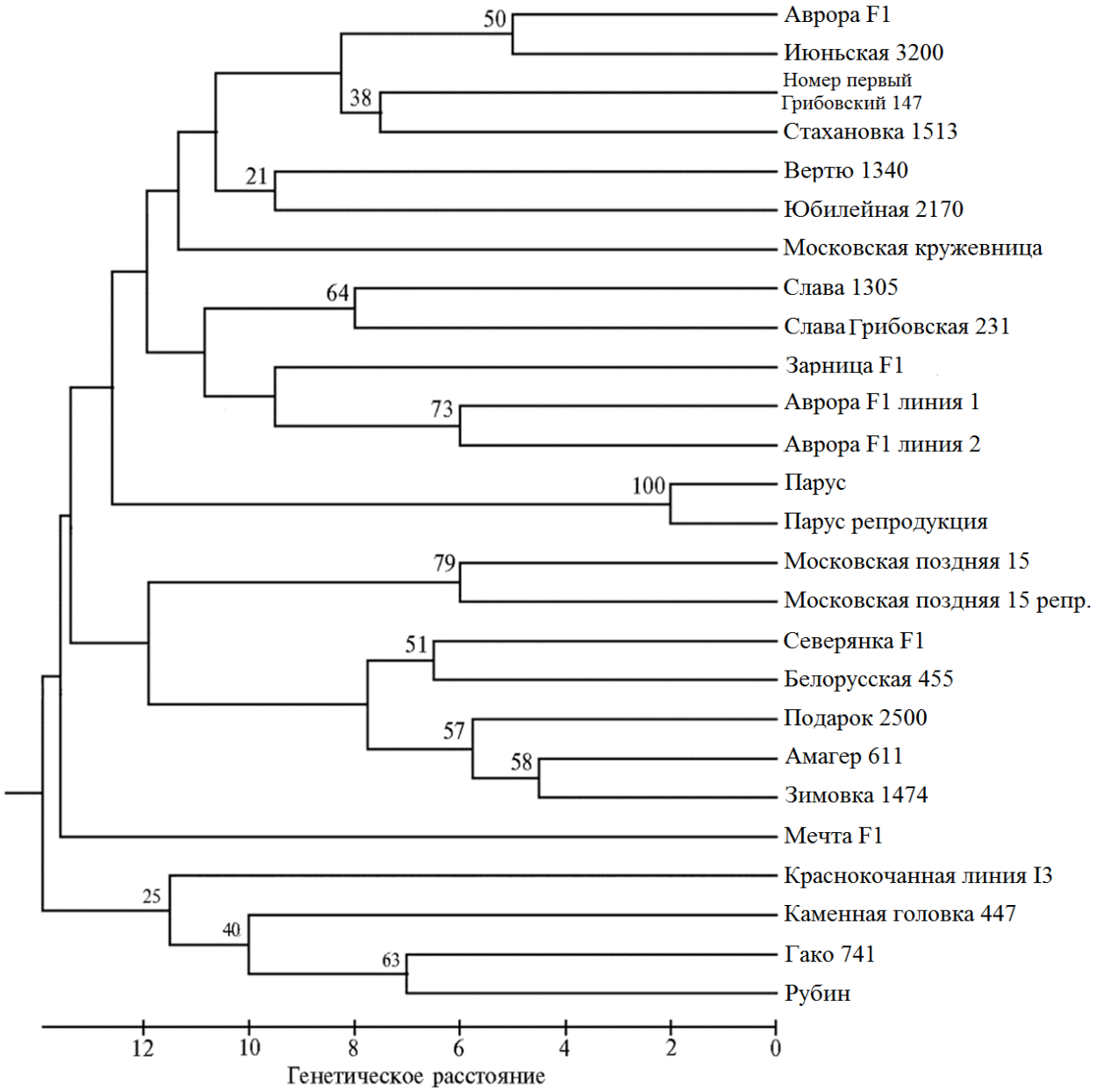

Рисунок 2 – UPGMA-дендрограмма генетического сходства между селекционными образцами капусты кочанной (*B. oleracea* L.), построенная на основе изменчивости микросателлитных локусов. Значения bootstrap получены для 1000 реплик

Сорта сортотипа Дитмарская ранняя происхождением из Центральной Европы (Июньская 3200, Стахановка 1513, Номер первый Грибовский 147 и

скороспелый гибрид Аврора F_1, имеющий в родословной сорт Июньская 3200) сгруппировались в отдельный кластер. Все эти образцы обладали скороспелостью. Сорт Номер первый Грибовский 147, районированный с 1943 года, был использован для создания сорта Июньская 3200.

Выведенные на Грибовской опытной станции и районированные в 1940 году традиционные среднеспелые сорта Слава Грибовская 231 и Слава 1305, представляющие сортотип Слава, находились в отдельном подкластере. Также в отдельный подкластер внутри кластера капусты белокочанной объединились сорта капусты савойской Юбилейная 2170, Вертю 1340 и Московская кружевница. Новый сорт Московская кружевница среднераннего срока созревания с сильной пузырчатостью листа оказался наиболее генетически отдалённым от двух других сортов. Традиционные сорта капусты краснокочанной Каменная головка 447 и Гако 741, выведенные на Грибовской опытной станции и районированные в 1943 году, относятся к сортотипам Эрфуртская и Гако, что подтверждается их генетической отдалённостью. В этом же кластере сгруппировались сорт Рубин и селекционная линия I3 (424-17). Нужно также отметить, что выведенные относительно недавно сорта Парус, Московская кружевница, гибриды Зарница F_1 и Мечта F_1 были достаточно отдалены от основных кластеров традиционных сортов. Таким образом, SSR-маркеры показали высокую эффективность в выявлении генетической изменчивости у 24 генотипов капусты кочанной, среди которых были близкие по происхождению, принадлежащие к одному сортотипу.

Идентификация признака мужской стерильности у капустных культур. Производство гибридных семян на основе цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) является одним из перспективных направлений в современном семеноводстве овощных капустных культур. ЦМС-формы, относящиеся к определённому типу стерильности, характеризуются своим типом мтДНК и системой ядерного генетического контроля. Большинство митохондриальных генов, обуславливающих ЦМС у капустных культур, имеет химерную природу и имеет новые открытые рамки считывания, такие как *orf222*,

orf224, orf138, orf125, orf263, кодирующие цитотоксические белки. Основные, описанные в литературе, типы цитоплазмы, встречающиеся при различных типах ЦМС у растений семейства Brassicaceae Burnett, – *Ogura*, *nap*, *pol*, *cam*, *rad/rap*, *tour/jun*. Кроме этого, выделяют и типы цитоплазмы, характерные для фертильных образцов различных видов, такие как *cam, rad/rap, ole*. 22 пары ранее известных праймеров было отобрано для определения генетических факторов в цитоплазме у 40 селекционных образцов капустных культур, включающих стерильные и фертильные формы капусты белокочанной, капусты савойской, брюссельской, кольраби, капусты китайской, дайкона, редиса. Амплификация с праймерами atp9-5', atp9-3' с получением ПЦР-продукта 200 п.н. подтвердила наличие мтДНК у всех анализируемых образцов. Митохондриальный участок *orf138* известен как маркерный ген стерильности цитоплазмы типа *Ogura* у капустных культур. Для идентификации данного типа цитоплазмы использовали 13 пар праймеров, из которых пары orfBF, orfBR2 и P6+(orfB), P6-(orfB) не позволяли точно отличить фертильные и стерильные растения редиса и идентифицировать закрепитель стерильности у дайкона Ushiki-Gensuke, где отсутствовали искомые фрагменты размером 300 п.н. и 600 п.н. После амплификации была произведена расшифровка последовательности продуктов размером 788 п.н. (полученных с праймерами Orf138-F2 и OrfB-R1) и размером 465 п.н. (полученных с праймерами P11 и P12) у стерильных образцов редиса, дайкона, капусты белокочанной, капусты пекинской. Результаты выравнивания полученных участков ДНК подтвердили наличие последовательности размером 417 п.н. на 100% гомологичной с митохондриальным геном *orf138* – типа А, согласно результатам выравнивания, полученным в программе BLAST. У всех изученных стерильных образцов эта этот регион была абсолютно идентичным, за исключением образца капусты белокочанной F_1 Текила, где наблюдали делецию в 39 п.н., соответствующую стерильности *Ogura* - тип F с двумя нуклеотидными заменами в 95-й и 99-й позициях, характерные для стерильности *Ogura* - тип А. Такое сочетание мутаций в данном участке можно рассматривать как новый аллельный вариант гена *orf138*, последовательность которого

депонирована в международную базу данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI) под номером KR149045.1. Для идентификации цитоплазмы типа *Napus* использовали две пары праймеров nap-5 и nap-3, а также P21 и P22, из которых последняя пара достоверно идентифицировала ген *orf222* с фрагментом 1102 п.н., характерным для цитоплазмы типа *napus* и обнаруженным у стерильных растений капусты пекинской, у стерильных и фертильных растений рапса. У всех остальных тестируемых образцов наблюдали фрагмент размером 500 п.н., присутствующий при таких типах, как *ogu*-ЦМС, *pol*-ЦМС, *cam-, ole-* и *rad*-цитоплазме. Секвенирование продукта размером 1102 п.н., полученного с праймерами P21и P22, подтвердила присутствие *orf222* в изученных стерильных растениях капусты пекинской, растениях рапса. Идентичность этого участка с референсной последовательностью составляла 97% при 100% покрытии изучаемой последовательности, согласно выравниванию в BLAST. У капусты пекинской было обнаружено сразу два митохондриальных гена стерильности, *orf138* и *orf222*, что соответствовало типу *Ogu-NWSUAF*. Для идентификации цитоплазмы типа *Polima* использовали три пары праймеров: pol-5'и pol-3', Orf224f и Orf224r, P21 и P32. В соответствии с расшифровкой нуклеотидной последовательности фрагмента, полученного с праймерами P21 и P32 размером 747 п.н, был выявлен участок размером 675 п.н. полностью гомологичный *orf224* (GenBank accession number *orf224 Polima* CMS EU254235), что подтвердило тип цитоплазмы *Polima* у стерильных растений рапса. Единственным отличием в полученной последовательности была однонуклеотидная замена G →A в 337 позиции. Для ПЦР-анализа на тип цитоплазмы (*rad*) нормального редиса использовали пару праймеров rad-5'и rad-3'. Известно, что тип *Ogura* был передан культурным видам рода *Brassica* и европейскому редису от дайкона. У стерильных образцов с *Ogura* рода *Raphanus* было обнаружено отличие по генам мтДНК от образцов с нормальным типом цитоплазмы, выявляемое праймерами rad-5'и rad-3'. У образцов с нормальным типом цитоплазмы обнаруживался фрагмент размером 550 п.н., отсутствующий у стерильных образцов с ЦМС *Ogura*. В этом случае данный фрагмент присут-

ствовал у фертильного образца дайкона (закрепителя стерильности) и отсутствовал у стерильного.

Использование мультиплексной ПЦР для определения основных типов стерильной цитоплазмы. Мультиплексная ПЦР позволяет идентифицировать у *B.napus* сразу пять типов цитоплазмы *Ogura*, *Ogu-NWSUAF*, *Nap*, *Pol*, *Cam*. Данный подход был нами использован для всех исследуемых образцов. Комбинация продуктов, полученных с использованием одновременно трех пар праймеров (P11 и P12, P21 и P22, P21 и P32) размером 465 п.н. и 500 п.н. была специфична для образцов с типом цитоплазмы *Ogura*, 747 п.н. и 500 п.н. для типа цитоплазмы *Polima*, 1102 п.н. и 800 п.н. для типа цитоплазмы *Napus*, 800 п.н. и 500 п.н. для типа цитоплазмы *Cam*, а 465 п.н. и 1102 п.н. для типа *Ogu-NWSUAF* как показано на рисунке 3.

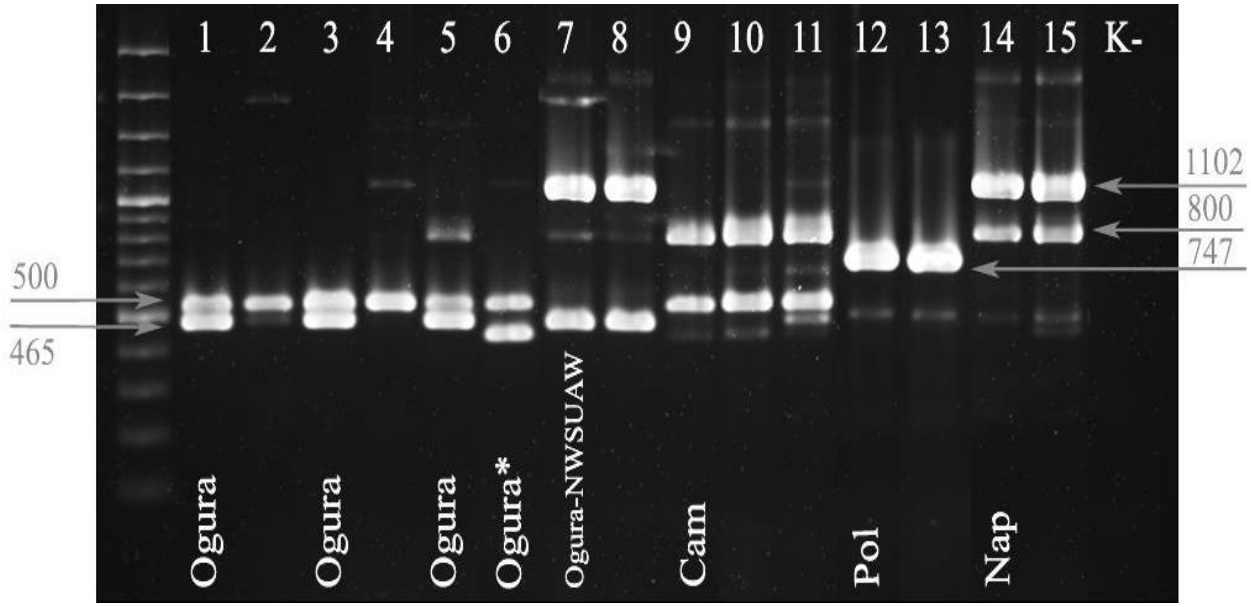

Рисунок 3 – Результаты по выявлению различных типов цитоплазмы у селекционных образцов с использованием мультиплексной ПЦР. 1 - MS-Gensuke; 2 - Ushiki-Gensuke; 3 - Donar F_1; 4 – Ariya; 5 - 4-13; 6 - Tekila F_1*,(новый вариант цитоплазмы Ogura); 7 - 9-07; 8 - 9-07; 9 – Хибинская; 10 – Ласточка; 11 – Волнушка; 12 - BC1 (Regent AxV 36-13)-стерильный; 13 - к-5099 Line Rf; 14 - BC1 (Regent A x V 36-13)-фертильный; 15 - к-4512 Tira (MS), К- отрицательный контроль

В итоге был идентифицирован тип стерильности *Ogura* у стерильных образцов капусты белокочанной, капусты китайской, дайкона, редиса и тип *Ogura-NWSUAF* у стерильного образца капусты пекинской. У фертильных об-

разцов капусты пекинской, капусты китайской, горчицы был идентифицирован тип цитоплазмы *cam*. У фертильных образцов рапса к-4512 Tira и Regent AxV 36-13 был тип цитоплазмы *nap*, а у рапса к-5099 Line Rf и стерильного растения образца рапса Regent AxV 36-13 был диагностирован тип цитоплазмы *pol*.

Эти данные подтвердили диагностированные ранее типы у образцов с использованием стандартной ПЦР и позволили выделить образцы с типом цитоплазмы *cam*. Таким образом, разработанная ранее для рапса адаптированная мультиплексная ПЦР подходит для диагностики типа цитоплазмы и для других представителей семейства Капустные.

Идентификация генов восстановителей фертильности у капустных культур. Помимо идентификации типа стерильности цитоплазмы, необходимы молекулярные маркеры для выявления ядерных генов – восстановителей фертильности (*Rf*), в этом случае удастся создать эффективную схему отбора стерильных линий, линии-закрепителя стерильности и линии восстановителя фертильности на основе ДНК-анализа для капустных культур. У редиса ген восстановитель фертильности *Rfo*/*Rfk1* для цитоплазмы *Ogura*/*Kosena* кодирует белок (*Orf687*) состоящий из 687 *аминокислот* и имеющий 16 повторов-мотивов из последовательности 35 аминокислот пентатрикопептидных повторов (PPR), которые редуцируют количество белка, кодируемого *Orf138* не изменяя уровня синтезируемой мРНК. Восстановление фертильности основано на ядерных генах, которые таким образом подавляют факторы в цитоплазме, вызывающие нарушения приводящие к ЦМС. Восемь известных пар праймеров было использовано для идентификации и определения гомо- и гетерозиготного состояния генов восстановителей *Rfk1*, *Rf*, *Rfw*, *rfw*, *Rfd1/rfd1*, *Rfo/rfo*. В данном исследовании маркер A137 образовывал большее количество аллелей, чем было отмечено в публикациях (333 и 266 п.н.). Образцы дайкона 638 и 639 образовывали продукт около 500 п.н., и имели по две аллели 333 и 266 п.н. и одну 333 п.н., то есть были гетеро- и гомозиготные по данному локусу. Кроме того, было дополнительно показано на разных видах, что у капусты белокочанной нет доминантных аллелей для восстановления фертильности, тогда как у редиса и дай-

кона обнаружено несколько аллельных вариантов. В данном случае стерильные и фертильные образцы, как было показано, несли гены-восстановители, как например, у образцов дайкона 638 и 639 – фертильная линия и стерильная, соответственно. Как известно, геномы капустных культур имеют копийность, так например, вид *B. rapa* содержит три копии генома *Arabidopsis*. Редис генетически располагается ближе к виду капусты китайской, поэтому его геном также имеет большие дублированные участки сходные с родственными видами. В проведённых исследованиях выявлено, что за восстановление фертильности у капустных могут отвечать несколько генов и их аллельных вариантов, что связано с синтетической природой ДНК-матрицы.

Гены, участвующие в синтезе витамина С у капустных культур. У растений L-аскорбат вовлечён во многие процессы, такие как рост, программируемая клеточная смерть, ответ на воздействие патогенов, гормональный ответ, цветение, старение, редокс-сигнализация, также как и защита против стрессов включая воздействия озона, ультрафиолетовой радиации, высоких температур и сильного светового воздействия. Брокколи, брюссельская, китайская, цветная, кочанная капусты обладают достаточным содержанием витамина С для поддержания пищевой нормы. Соответственно, исследование путей синтеза L-аскорбиновой кислоты у растений крайне актуально как для понимания биологических стрессовых реакции, так и для улучшения качества питания для здоровья человека. Восемь последовательных превращений цепочки синтеза витамина С от D-Фруктозо-6-фосфат до аскорбиновой кислоты с катализируемыми эти реакции ферментами были рассмотрены. Для восьми генов кодирующих соответствующие ферменты было разработано десять пар праймеров с использованием референсных последовательностей вида *Arabidopsis* из генетической базы данных NCBI и TAIR. В итоге исследований были получены продукты амплификации для восьми основных генов, кодирующих ферменты необходимые для синтеза аскорбиновой кислоты у растений семейства Капустные. Полученные результаты выявили определённое генетическое сходство между большинством взятых образцов капустных культур, однако обнаружены и от-

личия между некоторыми образцами различных видов. Для генов, кодирующих маннозо-6-фосфат изомеразу, фосфоманномутазу, маннозо-1-пирофосфатазу с помощью разработанных праймеров было получено несколько высокомолекулярных фрагментов. При амплификации локуса ГДФ-L-галактозофосфорилазы (ген *VTC2, VTC5*) обнаружено два высокомолекулярных фрагмента 900 п.н. и 1000 п.н. у образцов капусты вида *B. oleracea* L. и нечёткий фрагмент у образцов *B. rapa* L. и горчицы. ПЦР-продукт размером 761 п.н., близкий по длине к ожидаемому амплифицировался с одной из разработанных пар праймеров. У всех образцов капусты белокочанной, краснокочанной и растений горчицы продуцировался одинаковый по размеру фрагмент. Из двух пар праймеров для амплификации локуса гена, кодирующего L-галактозо-1-фосфат фосфатазу одна комбинация праймеров позволила получить чёткий ПЦР-фрагмент размером 480 п.н. у образцов капусты кочанной, горчицы и капусты китайской. При амплификации с праймерами, разработанных для локуса кодирующего L-галактозодегидрогеназу у всех образцов, включающих капусту белокочанную, капусту китайскую, рапс, горчицу, редис был получен дискретный фрагмент - 760 п.н. У образцов капусты китайской (*B. rapa*) и горчицы (*B. juncea*) наблюдали образование двух ПЦР-продуктов, которые возникали в результате полиморфизма в данной последовательности.

В результате секвенирования и последующего анализа выравнивания для амплифицированных ПЦР-продуктов для гена ГДФ-L-галактозофосфорилазы (*VTC2*) было установлено, что полученный фрагмент соответствует последовательности референсного гена *VTC2* (AF508793) 1,884 п.н. у *Arabidopsis* с идентичностью 85% при общем покрытии 76%, и на 100% идентичен предсказанной последовательности mRNA гена *VTC2* вида *B. oleracea* L. (XM_013745820.1) при общем покрытии 61% в трёх участках. Сходство данного фрагмента на 97% при общем покрытии 51% была также обнаружена с *B. rapa* L. Разницы в данных участках последовательностей между взятыми сортами капусты белокочанной выявлено не было. При секвенировании и последующем анализе ПЦР-фрагмента размером 480 п.н. для гена L-галактозо-1-фосфат фосфатазы было

трудно найти гомологичные последовательности в генбанке для выравнивания, поэтому расшифрованный участок был сравнен с последовательностями *Arabidopsis* с использованием инструментов TAIR. В результате была выявлена схожесть на 81 % и 86 % в двух участках длины всей последовательности 73 и 83 п.н., соответственно с последовательностью гена *VTC4*. Также часть этого же ПЦР-фрагмента длиной 89 п.н. на 86% совпадала с последовательностью mRNA *B. napus* L. и B. *oleracea* L., отвечающего за кодирование фермента инозитол-фосфат фосфатазу, что соответствует функции гена *VTC4*. Анализ расшифрованных последовательностей полученный фрагментов размером 760 п.н. в BLAST для гена, кодирующего L-галактозодегидрогеназу выявили, что у образцов *B. oleracea*, полученные ПЦР-продукты имели сходство на 98% с последовательностью мРНК этого гена у *B. oleracea* с общим покрытием в 72%. Высокая степень схожести последовательностей фрагмента (96.4%) при покрытии в 72% также отмечена с мРНК гена, кодирующего L-галактозодегидрогеназы у *B. rapa* subsp. chinensis. Сходство на 94% при покрытии всего в 32% было отмечено с тем же участком мРНК у *R. sativus*. А с той же последовательностью у *B. napus* L. сходство составляло 96% при покрытии 72%. При сравнении отсеквенированных последовательностей данного фрагмента у 14 различных образцов капусты огородной была обнаружена генетическая изменчивость, заключающаяся в нескольких одиночных заменах. Выравнивание и сравнение расшифрованных последовательностей у сортов и одной разновидности капусты показало высокую степень схожести. Наибольшие генетические отличия наблюдали между сортом Геркулес и образцами капусты белокочанной со степенью схожести 94,62%. Среди образцов капусты кочанных наиболее отдалённых от остальной группы была Московская поздняя 15 со схожестью 95% к остальным образцам. Два образца капусты краснокочанной были генетически близки с образцами капусты белокочанной на уровне 96-98%, тогда как среди самих капуст белокочанных генетическая схожесть составляла выше 99%. Полученные результаты подтверждают высокую степень единообразия гена, кодирующего L-галактозодегидрогеназу у сортов капусты. Информации по полной последова-

тельности данного гена крайне ограничена, представлена только транскрибируемая часть мРНК, которая составляет 1147 п.н. для *B. oleracea* L. Тот фрагмент, который был расшифрован у селекционных образцов также представляет транскрибируемый участок с открытой рамкой считывания (*ORF*) длиной 447 п.н.

Разработка системы ОТ-ПЦР для идентификации генов, участвующих в синтезе витамина С. Для изучения качества образцов капусты по содержанию витамина С были взяты полученные расшифрованные последовательности двух генов у *B. oleracea* L., участвующих непосредственно в цепочке синтеза аскорбиновой кислоты. Для изучения активности этих найденных локусов были разработаны оригинальные пары праймеров на собственные расшифрованные последовательности генов ГДФ-L-галактозофосфорилазы (*VTC2*) и L-галактозодегидрогеназы (GDH) с целью установить количество транскрибируемой мРНК, что отражает уровень экспрессии генов. В качестве референсных генов для проведения ОТ-ПЦР (полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией) были использованы известные локусы *BolC.TUB6, BolC.TBP1,* для которых были разработаны соответствующие праймеры. Для амплификации непосредственно локуса ГДФ-L-галактозофосфорилазы разработали пару собственных праймеров FV2 и RV2, с которыми образовывался фрагмент 92 п.н., и пару праймеров RTVTFF и RTVTRR для локуса L-галактозодегидрогеназы с ожидаемым ПЦР-фрагментом 112 п.н. (таблица 1). Для разработанных праймеров была показана эффективность при амплификации с изучаемыми последовательностями-мишенями. Так, для пары FV2, RV2 эффективность амплификации с ДНК матрицей составляла 92,9%, а для пары RTVTFF, RTVTRR доходила до 114%. При оценке уровней транскрипции фрагмента как показано на рисунке 4, кодирующего ГДФ-L-галактозофосфорилазу (*VTC2*) выделились некоторые селекционные генотипы. У образцов капусты цветной Полярная звезда, капусты белокочанной Северянка F_1 и капусты савойской Вертю 1340 был отмечен наивысший уровень экспрессии локуса ГДФ-L-галактозофосфорилазы.

Таблица 1 – Последовательности и характеристики, разработанных праймеров для ОТ-ПЦР генов, участвующих в синтезе аскорбиновой кислоты у капустных культур

Последовательности праймеров 5' - 3'	Ген	Размер продукта п.н.
FV2 CTGCCTGCGAGACCAAAGTA RV2 TGGATTCCTCAGAAGCCAACA	ГДФ-L-галактозо фосфорилаза (*VTC2*)	92
RTVTFF TCTCTGTGAACAGCGTTTTGC RTVTRR ACCGATGAACCGTGTCTTCC	L-галактозо дегидрогеназа (GDH)	112
TUB6F CAAGGTGGTCAATGTGGGAAAC TUB6R TAACGACCAGTGGGACCGTG	BolC.TUB6.a KF218597, tubulin beta-6	80
TBP1F TGCAGGCTCGTAATGCTGAA TBP1R TGCTGTGGTCTTTGGTTCTCT	BolC.TBP1.a KF218595, TATA-box-binding protein 1	80

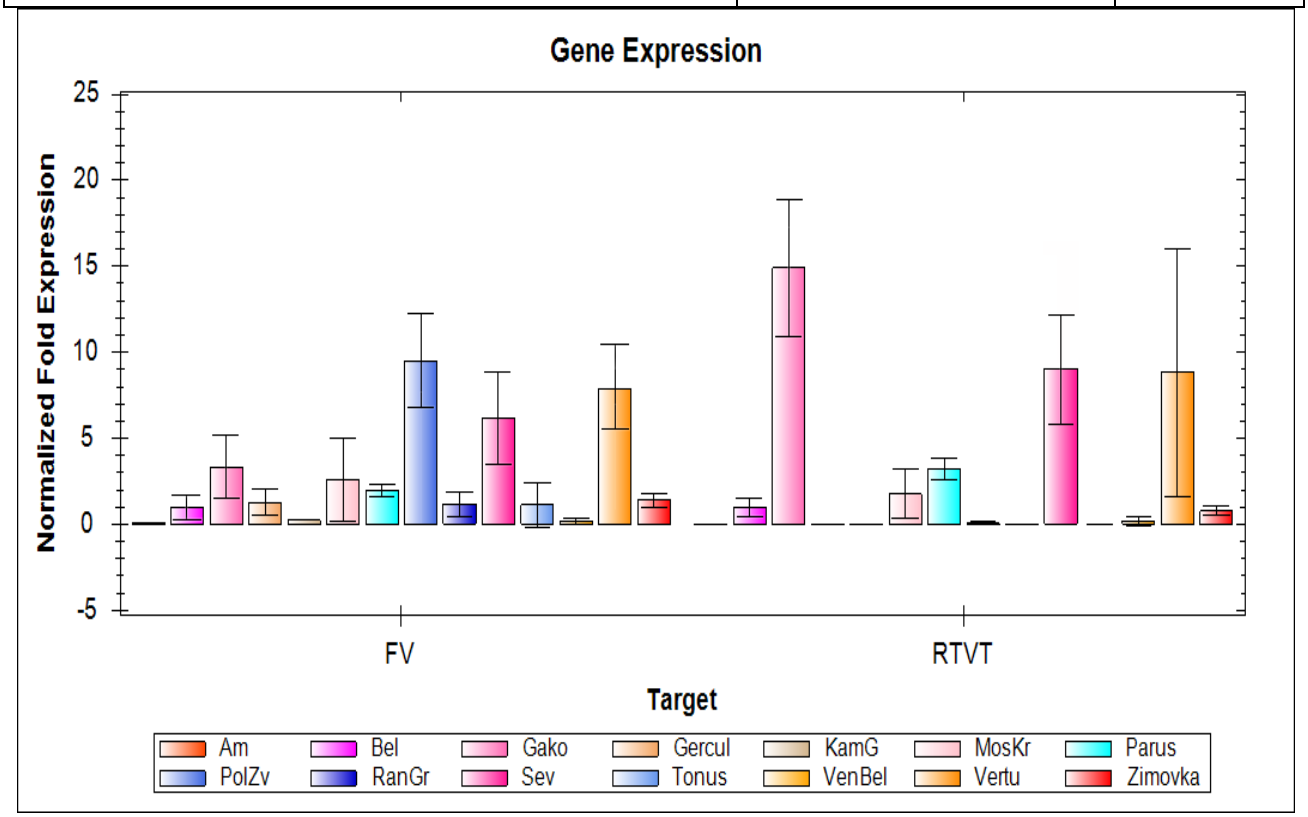

Рисунок 4 – Уровень экспресии генов ГДФ-L-галактозо-фосфорилазы (*VTC2*) (FV) и L-галактозодегидрогеназы (RTVT) синтеза аскорбиновой кислоты у капустных культур. Am – Амагер; Bel – Белорусская; Gako – Гако; Gercul – Геркулес; KamG – Каменная головка; MosKr – Московская кружевница; Parus – Парус; PolZv – Полярная звезда; RanGr – Ранняя грибовская; Sev – Северянка F_1; Tonus – Тонус; VenBel – Венская белая; Vertu – Вертю; Zimovka – Зимовка.

Тогда как образцы Амагер 611, Каменная головка и кольраби Венская белая характеризовались наименьшим уровнем активности гена *VTC2*. Кроме гибрида Северянка F_1 из образцов капусты белокочанной отмечено наличие до-

статочной экспрессии данного локуса у сорта Парус. Вместе с сортом Парус экспрессию наблюдали у краснокочанной капусты краснокочанной сорта Гако 741. Кроме того, образцы Гако 741, Северянка F_1 и Вертю 1340 показали наивысший уровень транскрипции для локуса, кодирующего L-галактозодегидрогеназу. Из образцов капусты белокочанной выделился сорт Парус, что подтверждает его высокую ценность. Оба гена экспрессировались у гибрида Северянка F_1 и сорта Вертю 1340. Сорт капусты краснокочанной Гако 741, характеризующийся высокими потребительскими качествами показал экспрессию у двух изучаемых генов.

Таким образом, разработанные маркеры могут быть использованы для относительной оценки степени активности генов, участвующих в синтезе аскорбиновой кислоты при отборе селекционного материала с генетически обусловленными повышенными качественными характеристиками.

Оценка генетической изменчивости у представителей семейства Apiaceae Lindl. с использованием ДНК маркеров

Генетическая идентификация селекционных генотипов моркови. Семь геномных микросателлитных локусов были использованы для оценки образцов 25 разнообразных генотипов с различной окраской корнеплодов, где в итоге было получено 34 аллели, с 4,9 аллели в среднем на локус. Продукты амплификации варьировали от 110 п.н. до 380 п.н., где среди генотипов 85% полученных продуктов ПЦР были полиморфны. Наибольшее количество аллелей – 9 было выявлено с локусом DARKUROAII, а наименьшее 2 с локусами DCEXTG, DARKUROAI и DCHSP70. Индекс информативности праймера (PIC) был самый низкий 0,28 у праймеров для локуса DCEXTG, а наивысшее значение (0,74) наблюдали при амплификации локуса DCU47081. В результате оценки генетического разнообразия между образцами моркови, как показано на рисунке 5, было отмечено, что наиболее отдалёнными сортами оказались Purple dragon (фиолетовая окраска) и Loberricher (желтая окраска); Mignon (небольшой корнеплод) и Кристи при значении коэффициента схожести 0,42. Отдельно

также располагался сорт моркови Nutri-Red Ruban с красной окраской корнеплода.

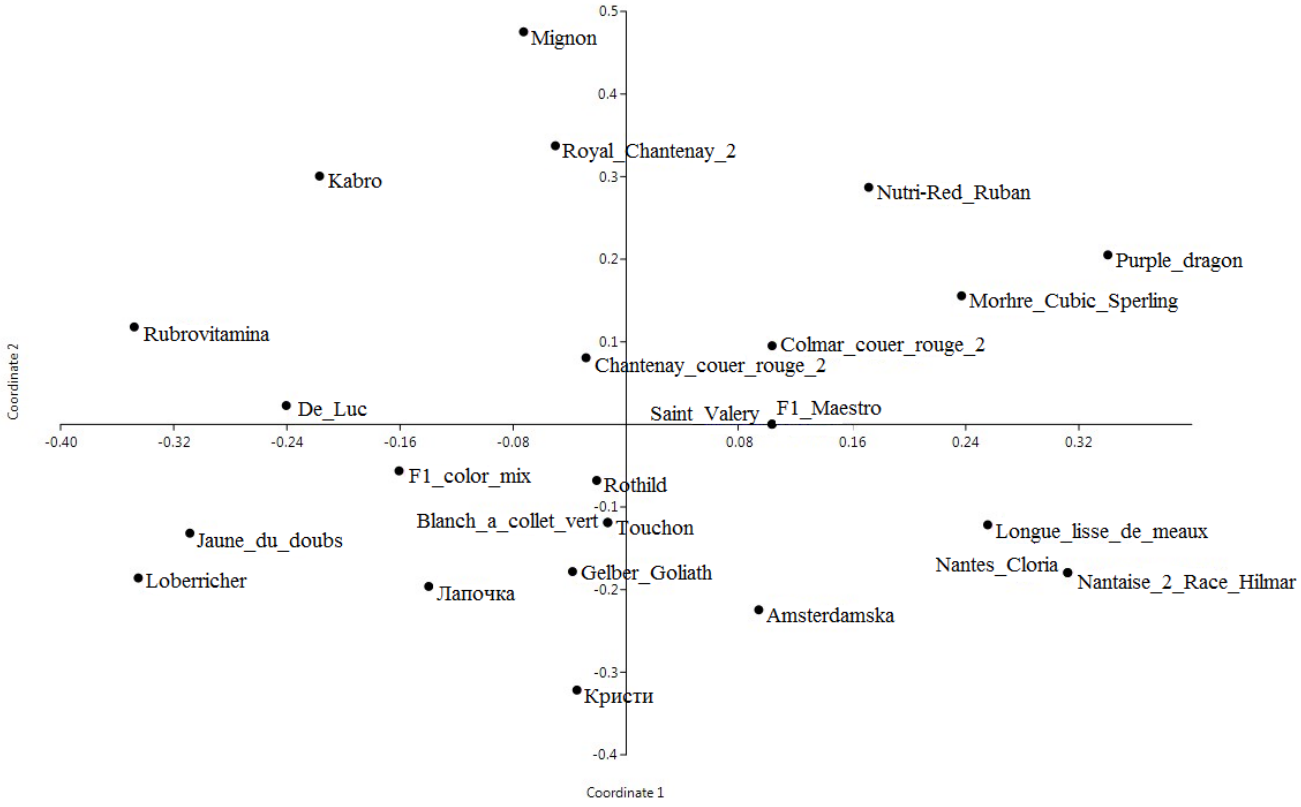

Рисунок 5 – Графическое расположение 25 образцов моркови согласно анализу методом главных компонент по изменчивости семи микросателлитных локусов

Две разновидности сорта Нантская, Gloria и Hilmar были максимально генетически близкими со значением коэффициента схожести 1, в соответствии с рисунком 5. Генотипы моркови сходные по окраске и размеру корнеплодов были генетически ближе друг другу. Так, генотипы с жёлтой окраской корнеплодов и светло жёлтой окраской Loberricher, Gelber Goliath сорт белой кормовой моркови Blanche a collet vert оказались генетически близкими. Сгруппировались также образцы моркови сортотипа шантане Colmar a coeur rouge, Chantenay Coeur rouge, Royal Chantenay. На основе оценки образцов моркови был взят генотип Purple Dragon для получения выровненной формы из типичных растений популяции. Полученная форма от самоопыления обладала достаточной выровненностью по размеру и форме по сравнению с исходной популяцией.

В результате исследований показано, что микросателлитные маркеры обладают большой информативностью в идентификации сортов моркови и могут быть широко использованы для селекции новых генетических форм и генотипирования существующих сортов, линий и гибридов.

Изучение экспрессии генов, участвующих в синтезе каротина. Семь сортов моркови с оранжевой (Nantes Glodia (вариант сорта Нантская), Rothild, Touchon), фиолетовой (Purple Dragon), желтой (Jaune du doubs, Gelber Goliath) и белой (Blanch a collet vert) окраской корнеплодов были отобраны. В качестве референсных генов были взяты последовательности «*генов домашнего хозяйства*» - ген фактор элонгации 1-альфа (*EF1a*) и ген синтеза актина AC1 (*AC1*), уровень экспрессии которых должен быть стабильным у различных генотипов моркови (таблица 2).

Таблица 2 – Локусы генов, которые были использованы для оценки уровня экспрессии у селекционных образцов моркови

Локус	Гены, кодирующие ферменты	Последовательности праймеров 5' - 3'	Номер NCBI
ZDS1, ZDS2	ζ-каротиндесатураза	CCGAAGCTAAAAGTGGCTATTATAGG TGGCCCTGATCTAGAAGCTCAA’	DQ222430, DQ192189
LCYB1	ликопин-β-циклаза	AGTGGGAATTGGCGGTACAG GCAGCTAGAGTTCTTGCTACCATATATC	DQ192190
LCYE	ликопин-ε-циклаза	CATTCCATGCAGGCTTGCTA CCCAACCTCATACTGCAAAAGTT	DQ192192
EF1a	фактор элонгации 1-альфа	GGAACCTCTCAGGCTGATTGTG TTGGAGATACCAGCTTCAAAACC	D12709
AC1	актин AC1	TGCCCCCAGTAGCATGAAG CCAATCCAGAGATCGCTGTACTT	X17526

В результате полученных данных было показано, что наибольшую экспрессию всех трёх генов наблюдали у сортов моркови оранжевой и фиолетовой окраски, причём у сорта Touchon экспрессия генов *LCYB1*, *LCYE* и *ZDS1* была выше в 2, 1,5 и 1,9 -раза чем у сорта Nantes Glodia, соответственно, в 1,1, 1,3 и 1,9 раза выше, чем у сорта Rothild, соответственно. Эти факты совпадали с описаниями сорта, где указано, что корнеплоды сорта Touchon отличаются интенсивной окраской и высоким содержанием каротина. Сорт Rothild незначительно превосходил сорт Nantes Glodia по экспрессии всех трёх генов, что подтверждается высоким качеством его корнеплодов. Экспрессия генов у сорта Purple Dragon

была сопоставима с уровнем экспрессии у сортов Nantes Glodia и Rothild, уступая только сорту Touchon. В корнеплодах фиолетовой окраски также синтезируется, как показано на рисунке 6.

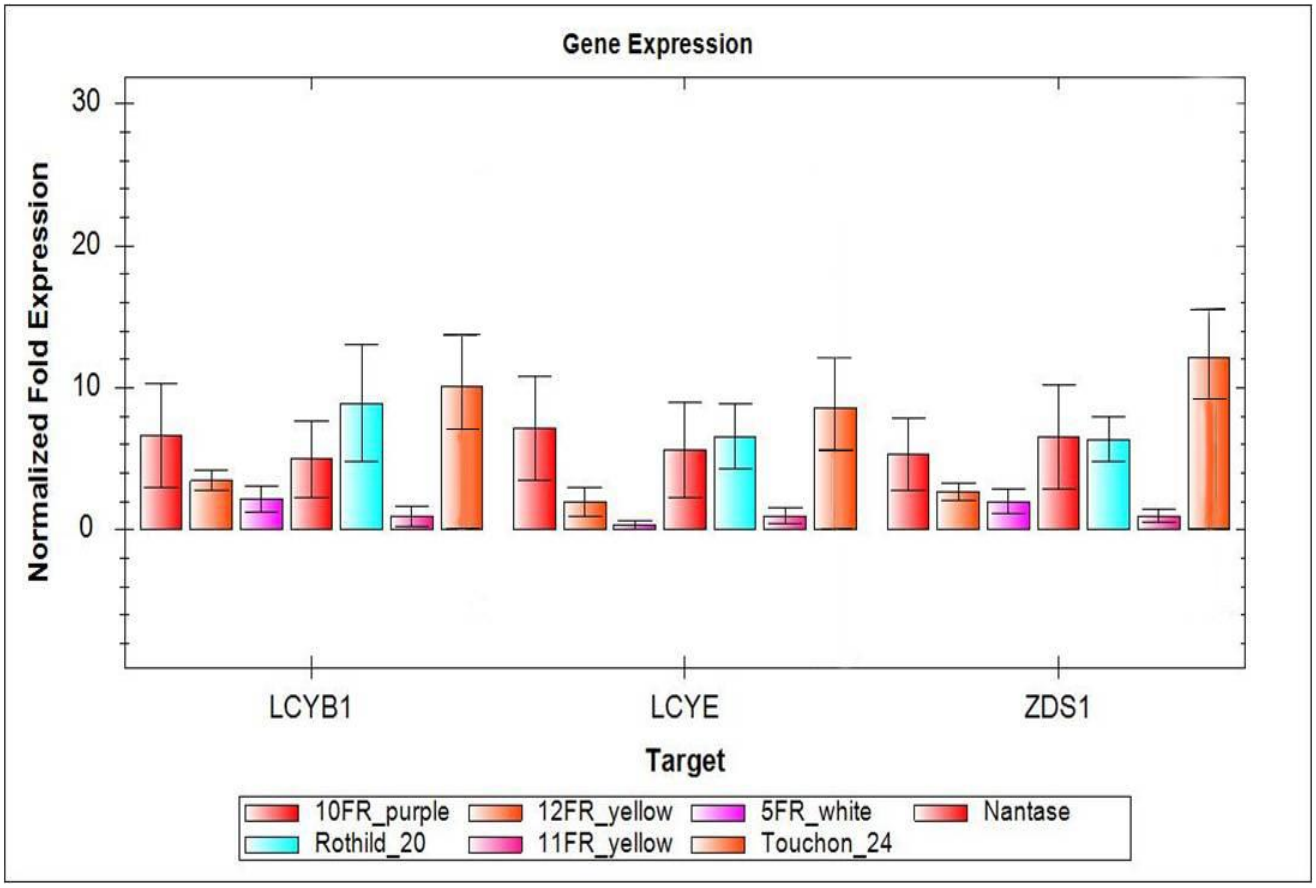

Рисунок 6 – Уровень экспрессии трех генов, участвующих в синтезе каротиноидов у семи сортов моркови после 10 недель культивирования в полевых условиях. Сорта: 10 – Nutri-Red Ruban; 12 - Jaune du doubs; 5 - Blanch a collet vert; Nantase - Nantes Glodia; Rothild_20 – Rothild; 11 – Gelber Goliath; Touchon_24 – Touchon

По всем трём генам (*LCYB1*, *LCYE* и *ZDS1*) уровень экспрессии у сортов с оранжевой окраской превосходил сорта с белой и жёлтой окраской в 1,2, 6,2 и 4,4 раза, соответственно. Из двух сортов желтой моркови у Jaune du doubs наблюдали повышенную экспрессию по всем трем генам. Этот же сорт Jaune du doubs превосходил по уровню экспрессии гена *LCYE* сорт Blanch a collet vert с белыми корнеплодами в 6,7 раза и в 1,6 раза по уровню экспрессии гена *LCYB1*. Эти результаты полностью совпадали с данными, полученными при оценке уровня каротина на спектрофотометре. Так, при измерении поглощения при длинах волн 443, 475, и 492 нм, также установлено наибольшее содержание

общих каротина в сорте Touchon, и отсутствие у белой кормовой моркови сорта Blanch a collet vert. Корнеплоды сорта Purple Dragon также содержали достаточное количество каротина, что совпадало с результатами по экспрессии соответствующих генов, хотя другой генотип с полностью темно-фиолетовой окраской коры и сердцевины показал отсутствие каротина на уровне сорта жёлтой моркови Jaune du doubs. В данном случае метод ПЦР в реальном времени позволяет прослеживать метаболические процессы с большой степенью точности, позволяя выявлять ценные генисточники с высокими показателями качества.

Оценка генетического разнообразия образцов сельдерея. Для изучения было взято 12 сортов сельдерея (*Apium graveolens* L.), включающие листовые, корневые и черешковые разновидности. Шесть отобранных RAPD-праймеров было использовано в исследовании. Общее число локусов составило – 54 со средним числом общих и полиморфрых для одного праймера равным 8,7, и 3,7, соответственно. Общий уровень выявленного полиморфизма составил 42%. Наиболее генетическая разнородная – группа образцов корневой разновидности, где было обнаружено пять специфических фрагментов. Группы листовых и черешковых форм были сходны по генетическому разнообразию внутри каждой группы, с ожидаемой гетерозиготностью внутри листовых, черешковых и корневых форм 0,17, 0,18 и 0,26 соответственно. Построенная дендрограмма, согласно рисунку 7, показывает генетическое распределение сортов согласно их генетическим особенностям. Кластер черешковых образцов оказался генетически ближе к группе корневых образцов при схожести 0,62. В то время как разница между кластером листовых и корневых разновидностей была 0,60. Сорта корневых форм как Юдинка, Егор, Албин, образовывали свои подкластеры, что подтверждало их генетическую обособленность. Сорта Пражский гигант и Корневой Грибовский были ближе друг к другу при схожести 0,79. Образцы черешковых форм оказались генетически достаточно близки между собой со средней схожестью в кластере 88%.

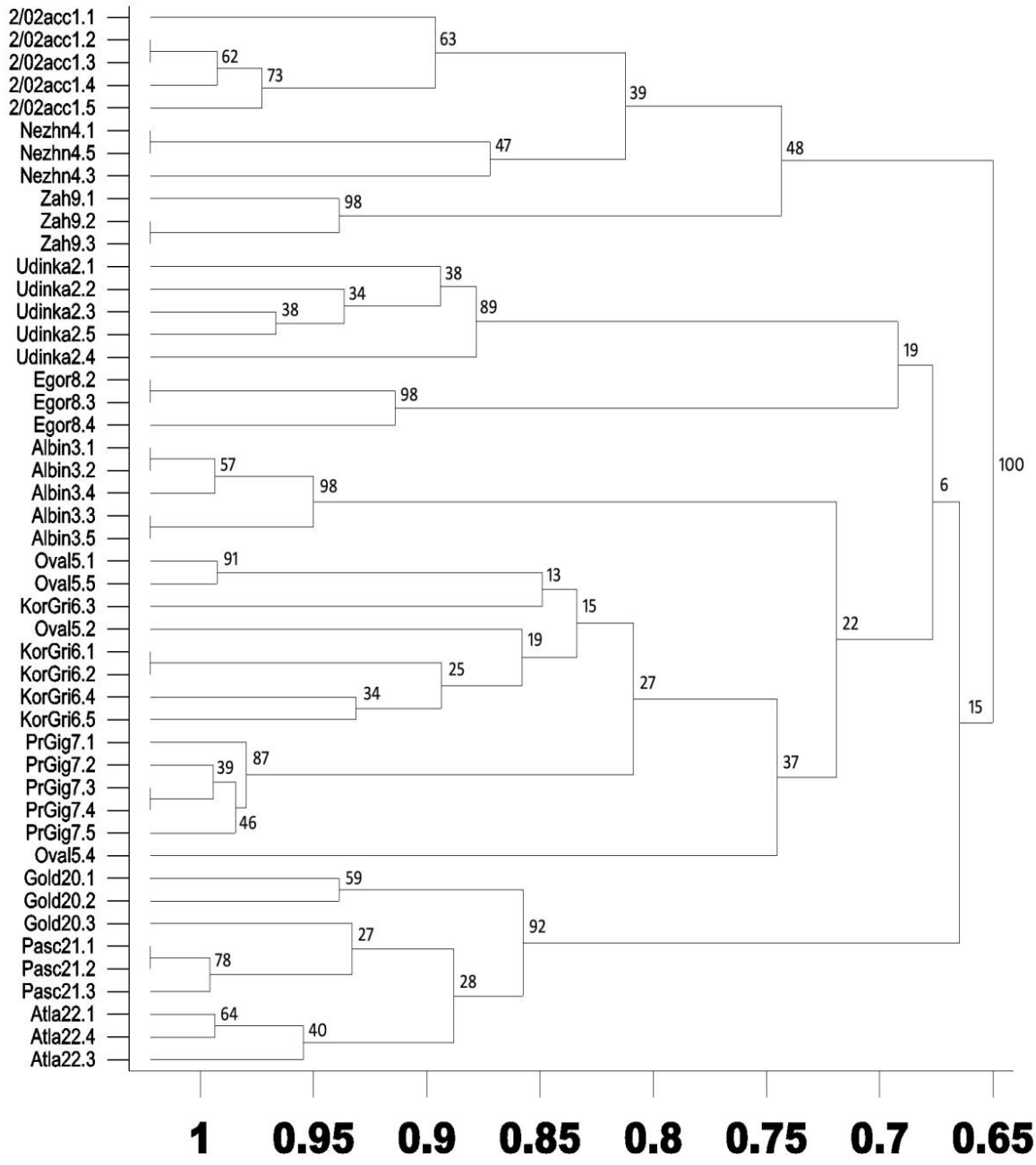

Рисунок 7 – Дендрограмма, отражающая степень схожести между сортами и разновидностями сельдерея, построенная на основе коэффициента Жаккара. Значения бутстреппа представлены для 1000 реплик. Обозначения: Atla – Атлант; Pasc – Паскаль; Gold – Golden Self-blanching; PrGig – Пражский гигант; KorGri – Корневой грибовский; Oval – Овал; Albin – Албин; Udinka – Юдинка; Zah – Захар; Nezhn – Нежный; 2/02Acc – селекционный образец 2/02; Egor – Егор. Представленные значения будстрэпа посчитаны для 1000 реплик

Таким же образом был выявлен уровень генетической изменчивости внутри каждого сорта, так ДНК-профили растений сортов Овал и Корневой Грибовский показали высокий полиморфизм (до 20 %), где сорт Овал оказался

наиболее генетически неоднородным. Другие сорта оказались более генетически выровненными с полиморфизмом среди растений до 10 %. Сорт Пражский гигант оказался наиболее генетически однородным среди всех изученных образцов. В ходе отбора новой популяции среди разновидностей черешкового сельдерея была выделена форма, отличающаяся от остальных и подходящая для условий выращивания в Центральной Нечернозёмной зоне. С помощью проведённого ДНК-анализа подтверждена генетическая идентичность этого генотипа, где наиболее генетически близким образцом был сорт Паскаль, согласно расположению на дендрограмме. Эта новая форма послужила основой для создания среднеспелого сорта черешкового Атлант.

Генетическая идентификация селекционных образцов петрушки. По внешним признакам среди культурных форм можно выделить три основные разновидности: листовая обыкновенная (var. *vulgare* (Nois.) Danert), кудрявая (var. *crispum* Gand.) Mazk.) и корневая, известная ранее как var. *radicosum.* (Alef) Danert, или как var *tuberosum* (Bernh.) Mart. Crov. Пять RAPD и шесть ISSR- праймеров было отобрано для оценки 32 селекционных образцов. Среднее количество амплифицированных RAPD-фрагментов составило 10,2, а ISSR-фрагментов – 11. Образцы, которые отличались по ISSR-спектрам, также выделялись и при RAPD-анализе и общий процент полиморфизма составляет 95 %. Высокая корреляция (0,98) между RAPD и ISSR производными матрицами генетических расстояний была доказана с использованием Mantel-теста. Дендрограмма, построенная на основе совместного анализа RAPD и ISSR фрагментов, в соответствии с рисунком 8, отображает генетические взаимоотношения между изученными образцами. Наиболее удалённые (0,29) друг от друга два больших кластера, соответствуют листовым и корневым разновидностям петрушки. В кластере листовых образцов с большим значением генетической схожести (0,86) образовались два подкластера листовых кудрявых и листовых обыкновенных форм. В кладе листовой петрушки с обыкновенным типом листа диапазон генетической схожести варьирует от 0,87 до 0,92, в то время как у листовых кудрявых форм этот показатель составляет от 0,85-0,92. Два образца U-521

(ВИР) и Einfache Schnitts с обыкновенным типом листа попали в кластер с кудрявыми формами петрушки. Низкие значения бутстрепа показывают невысокую степень надежности разделения в кластере листовых форм. Кроме того, не было выявлено никаких специфичных фрагментов для каждой из листовых форм петрушки в амплифицированных ДНК-спектрах.

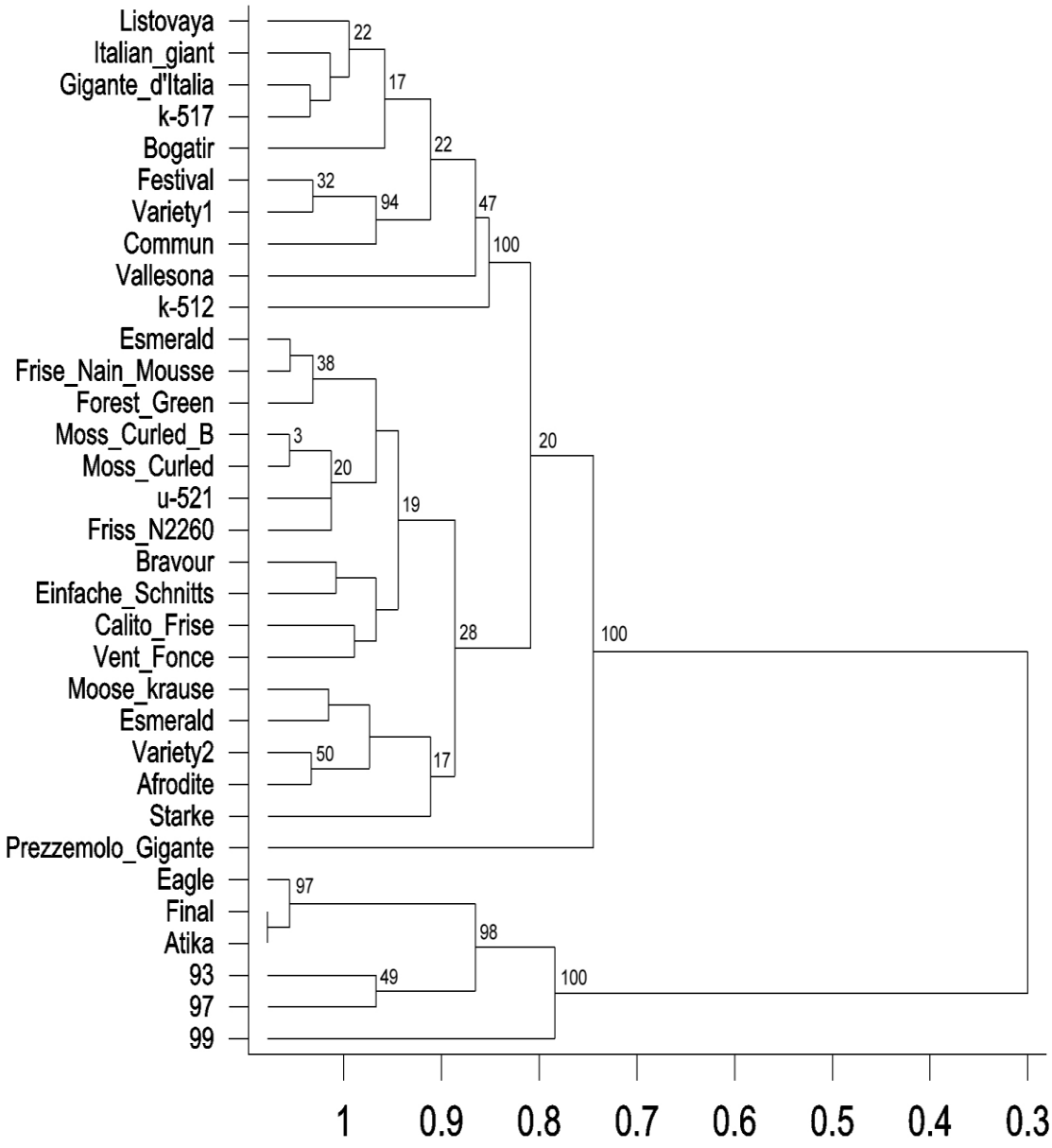

Рисунок 8 – Дендрограмма генетических расстояний между разновидностями и сортами петрушки, построенная на основе полиморфизма RAPD и ISSR-маркеров

Тем не менее, в кластере обыкновенных форм из всех известных генотипов выделился листовой образец (Listovaya), который был использован для создания сорта петрушки листовой Нежность. Этот генотип располагался в кла-

стере с образцами происхождением из Италии и образцом к-517. Итальянский генотип с характерным темно-зелёным, большим и гладким листом Prezzemolo Gigante d'Italia отделился от других форм петрушки, что может подтвердить, в данном случае, его отношение к отдельно выделяемой листовой разновидности *neapolitanum* Darnet. В подкластере корневых разновидностей коэффициент Жаккара составляет 0,89-0,99. Листовые разновидности в нашем исследовании оказались генетически достаточно близкими. Впервые проведенный ISSR-анализ петрушки выявил достаточное число микросателлитных повторов для генетических исследований *Petroselinum crispum* [Mill.] Nym. ex A.W. Hill.

Изучение генетического разнообразия у представителей луковых культур

Для изучения генетических взаимоотношений и выявления родственных генотипов было взято 34 селекционных образца включающие виды, межвидовые гибриды и сорта луковых культур. В результате было проанализировано 179 локусов, полученных в результате проведения ISSR-анализа по четырём отобранным праймерам. 44,5 фрагмента в среднем приходится на каждый ISSR-праймер. По причине большого генетического видового различия было обнаружено много специфичных фрагментов. Среднее значение величины информационного полиморфизма для праймеров составляло 0,23 с наибольшим значением 0,24. Более того, все подобранные праймеры показали относительно сходные характеристики между собой. На основе анализа ISSR-фрагментов была построена дендрограмма, изображённая на рисунке 9 со всеми проанализированными селекционными образцами.

Представители подрода *Cepa* образовали большой кластер, объединяющий родственные виды и межвидовые гибридные формы. Так, 16-ти хромосомные виды *A. altaicum* и *A. fistulosum* генетически были очень близки, сходство которых составляло 45%, что подтверждало их принадлежностью одному подроду и секции *Cepa*. Большое генетическое разнообразие обнаружено внутри различных образцов лука батуна *A. fistulosum* L.

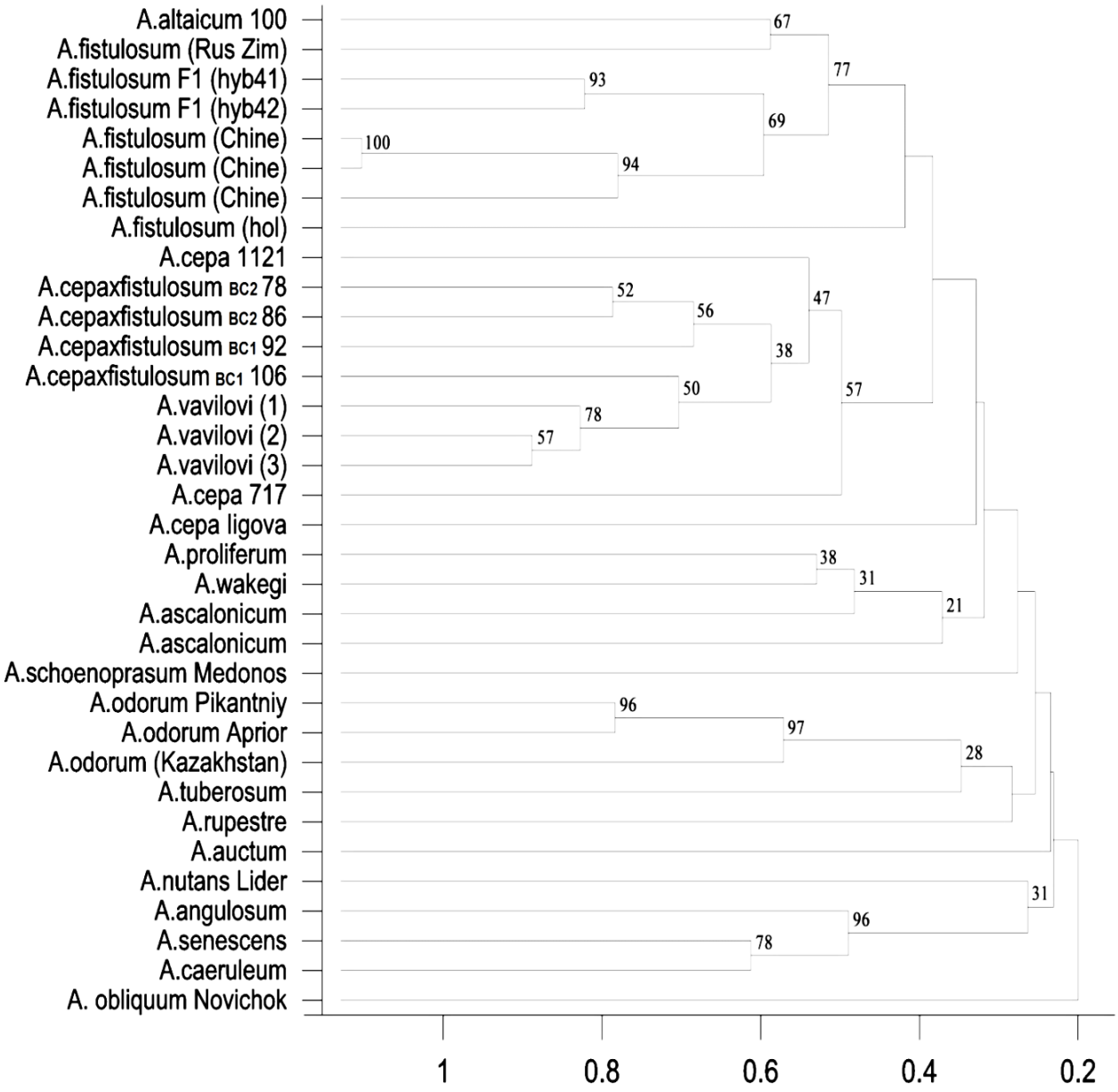

Рисунок 9 – Дендрограмма генетических расстояний среди 34 селекционных образцов, построенная на основе коэффициента подобия Жаккара, рассчитанного с использованием данных ISSR-анализа. Показатели бутстрэпа приведены для 1000 реплик

Отдельная ветвь была образована образцами, полученными из Китая. Две гибридные формы между луками батунами китайского и голландского происхождения располагались рядом друг с другом, имея высокую генетическую схожесть – до 70%. В соседний подкластер вошли образцы лука репчатого *A.cepa* L., сорта Альба, Красное кружево и Йыгева, гибридные формы *A.*

vavilovii Popov et Vved. с луком репчатым и гибриды F_1 между *A. cepa* и *A. fistulosum*. Формы межвидовых гибридов между батуном и луком репчатым под номерами 78, 86, 92 и 106 генетически расположились ближе к луку репчатому.

Форма под номером 106 была отдалена от остальных гибридных форм со схожестью в 63%. В то же время, виды *A.× proliferum* (Moench) Schrad. ex Willd. и *A.×wakegi* Arak., известные как естественные гибридные формы между *A. cepa* и *A. fistulosum*, генетически были рядом друг другу со схожестью в 40%, и образовывали отдельную ветвь дендрограммы в группе *Cepa* рядом с образцами лука шалота *A. cepa aggregatum* cult. (*A. ascalonicum* L.). Результаты оценки также показали, что образцы, обозначенные изначально как *A. vavilovii* Popov et Vved., расположились в подкластере гибридных форм между батуном и луком репчатым, где было показано, что эти образцы оказались гибридными формами между видами *A. vavilovii* и *A. cepa*. Наиболее генетически отдалённый представитель подрода *Cepa*, но находящийся в другой секции *Schoenoprasum*, вид *A. schoenoprasum* L. шнитт лук, сорт Медонос имел сходство с луком репчатым всего 21%. Вид лука *A. odorum* L., принадлежащий к подроду *Butomissa*, и представленный тремя образцами Пикантный, Априор и образец из Казахстана, были сгруппированы вместе в отдельном кластере со схожестью между собой в 65%. Вид *A. tuberosum* Rottl. ex Spreng. также расположился рядом, что подтверждает его принадлежность к тому же подроду и секции *Butomissa*, где схожесть с луком душистым составляла всего 27%. Лук косой *A. obliquum* L. образовывал свою отдельную ветвь дендрограммы и был генетически отдален от остальных видов со схожестью с кластером *Cepa* всего в 16%, что также подтверждало его принадлежность к самостоятельному подроду *Polyprason*. Вид лука *A. nutans* L. с хромосомным набором 2n=2x=32 сорт Лидер на достаточном генетическом удалении объединился с *A. senescens* L., с хромосомным набором 32, и с 16-ти хромосомным видом *A. angulosum* L.. Следует отметить, что эти виды относятся к одному подроду и к одной секции *Rhizirideum*. *A. rupestre* Steven, лук скальный генетически не имел схожести с другими видами и образовывал отдельную ветвь дендрогаммы, что определяется его принадлежно-

стью к подроду *Allium* генетическое сходство с другими видами составляет не более 22%. Также отдельно от других генотипов расположился *A. auctum* Omelczuk. со схожестью с другими видами менее 17%. В итоге показана возможность быстрого определения происхождения межвидовых гибридов на основе ДНК-анализа.

Оценка гибридов, полученных при скрещивании отдалённых видов лука. Гибриды, полученные между отдалёнными видами представляют селекционную ценность и перспективность для дальнейшей селекции на улучшение хозяйственно важных свойст. Так, получены гибриды между *A. cepa* L. и *A. schoenoprasum* L., принадлежащих к одному подроду и гибриды между *A. cepa* L. и *A. nutans* L. Для подтверждения их происхождения был использован ISSR-анализ. При оценке гибридной комбинации *A. cepa x A. nutans* было получено всего 77 локусов, с 19,3 в среднем на праймер. Математическая обработка результатов анализа, как показано на рисунке 10, с использованием метода главных компонент позволила графически показать распределение генотипов родителей и их потомств.

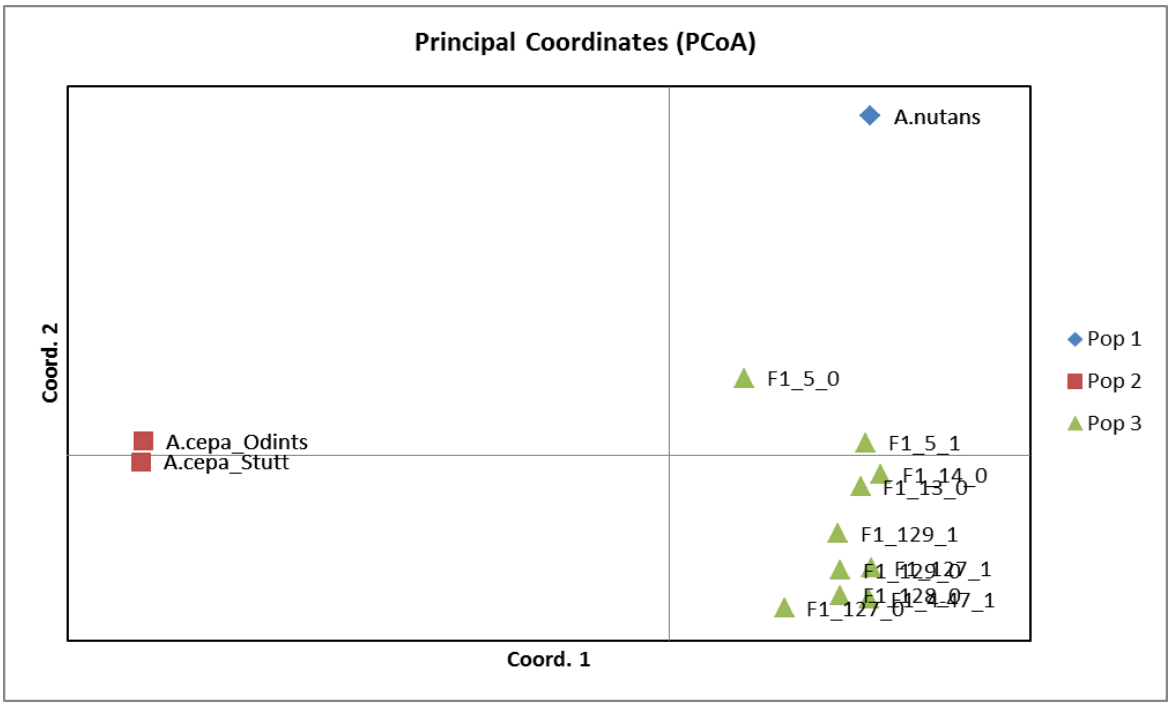

Рисунок 10 – Результаты анализа методом главных компонент родительских видов *A. cepa* L., *A. nutans* L. и их гибридов по 77 ISSR-локусам

Кроме того, было показано, что в этой комбинации все полученные межвидовые гибриды были генетически близкими к отцовским формам, то есть к виду *A. nutans* L. Были обнаружены генетические различия между межвидовыми формами в пределах одной комбинации. Комбинация *A. cepa x A. schoenoprasum* была оценена с использованием четырёх праймеров с продуцированием 147 локусов, со средним числом – 36 на праймер. При оценке данной гибридной комбинации величина PIC для праймеров была в среднем - 0,33. Большого генетического разнообразия между другими полученными гибридными формами не наблюдали, также, как и число специфических фрагментов для этих образцов было до 18 у *A. cepa* и 6 у гибридных форм, но общая гетерозиготность значительно повышается. В результате анализа полученных фрагментов методом главных компонент, как показано на рисунке 11, все шесть гибридных форм расположились ближе к отцовскому компоненту - шнитт-луку, где наиболее генетически близко расположилась форма F1_135.

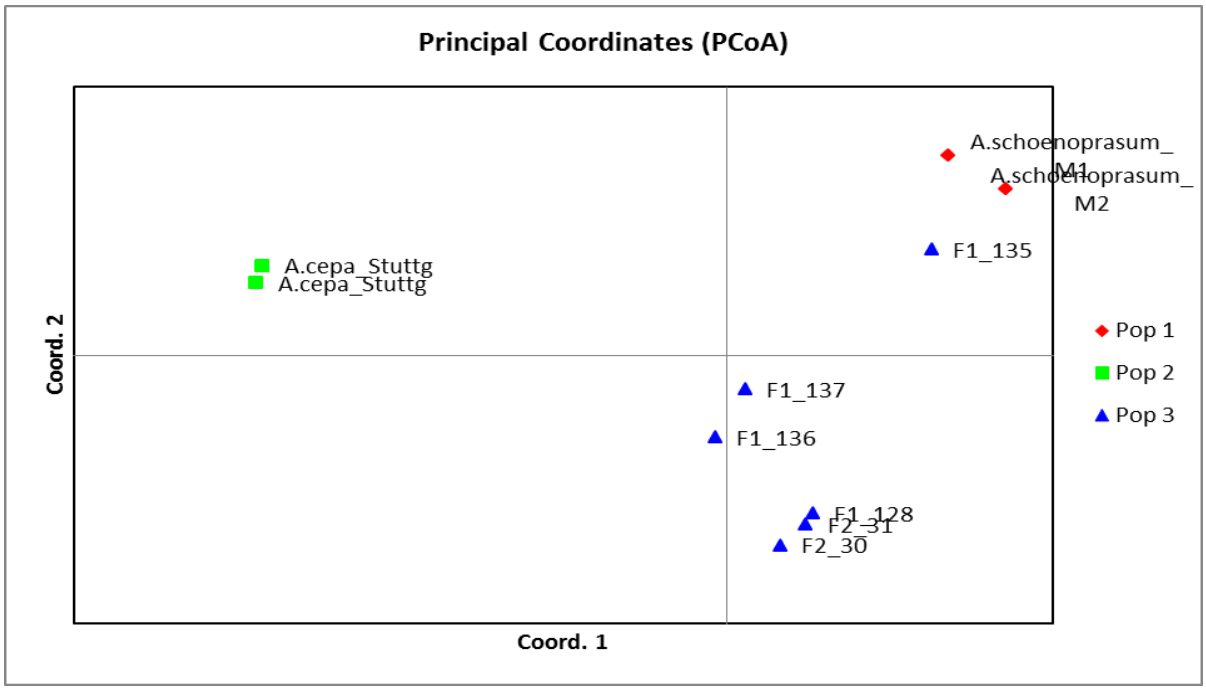

Рисунок 11 – Результаты анализа методом главных компонент родительских видов *A. cepa* L., A. *schoenoprasum* L. и их гибридов по 147 ISSR-локусам

В результате оценки показано, что ISSR-маркеры являются подходящим и универсальным методом для подтверждения происхождения межвидовых гибридов у луковых культур.

Генетическая изменчивость образцов чеснока озимого на основе микросателлитных локусов. Селекция чеснока (*A. sativum* L.) требует выведения новых сортов с такими характеристиками как высокая урожайность, зимостойкость, пригодность к механизированному возделыванию, лёжкость, устойчивость к возбудителям заболеваний и высокие вкусовые качества. Генетическая идентификация используемых селекционных образцов позволяет сгруппировать родственные генотипы по наследственным особенностям и определить положение каждого генотипа среди других, что открывает возможности для поиска форм с комплексом ценных признаков. С целью изучения биоразнообразия чеснока озимого было отобрано 54 селекционных сортообразца. Для выявления генетического полиморфизма выбрали 17 микросателлитных локусов. В результате амплификации с микросателлитными локусами было получено 115 аллелей, с 6,7 аллели на локус в среднем. Наименьшее число амплифицированных аллелей (3) наблюдали у локуса GB-ASM-080 и наибольшее – 15 для локуса GB-ASM-040. При анализе результатов амплификации можно было отметить чёткие отличимые фрагменты, показывающие видимую разницу между исследуемыми образцами, как например по локусу GB-ASM-053. Подсчитанные PIC для каждой пары праймеров амплифицирующих определённый локус существенно не отличались от значений, полученных в предыдущих исследованиях, кроме маркеров GB-ASM-078, Asa18 и Asa17 со значениями 0,32, 0,22, 0,31, соответственно. Практически для всех остальных локусов показатель PIC был выше 0,5, что доказывает высокую информативность этих микросателлитных локусов. Наибольшие значения PIC (0,81, 0,79, 0,80) были обнаружены у пар праймеров для локусов Asa10, Asa24, GB-ASM-109, соответственно. В результате статистического анализа полученных фрагментов была построена кладограмма, как показано на рисунке 12. Кластерный анализ показал, что все селекционные образцы распределились по 10 кластерам, где наиболее генетически удалёнными от основной группы были образцы CR1-18 и MM2-18, относящиеся к VI кластеру.

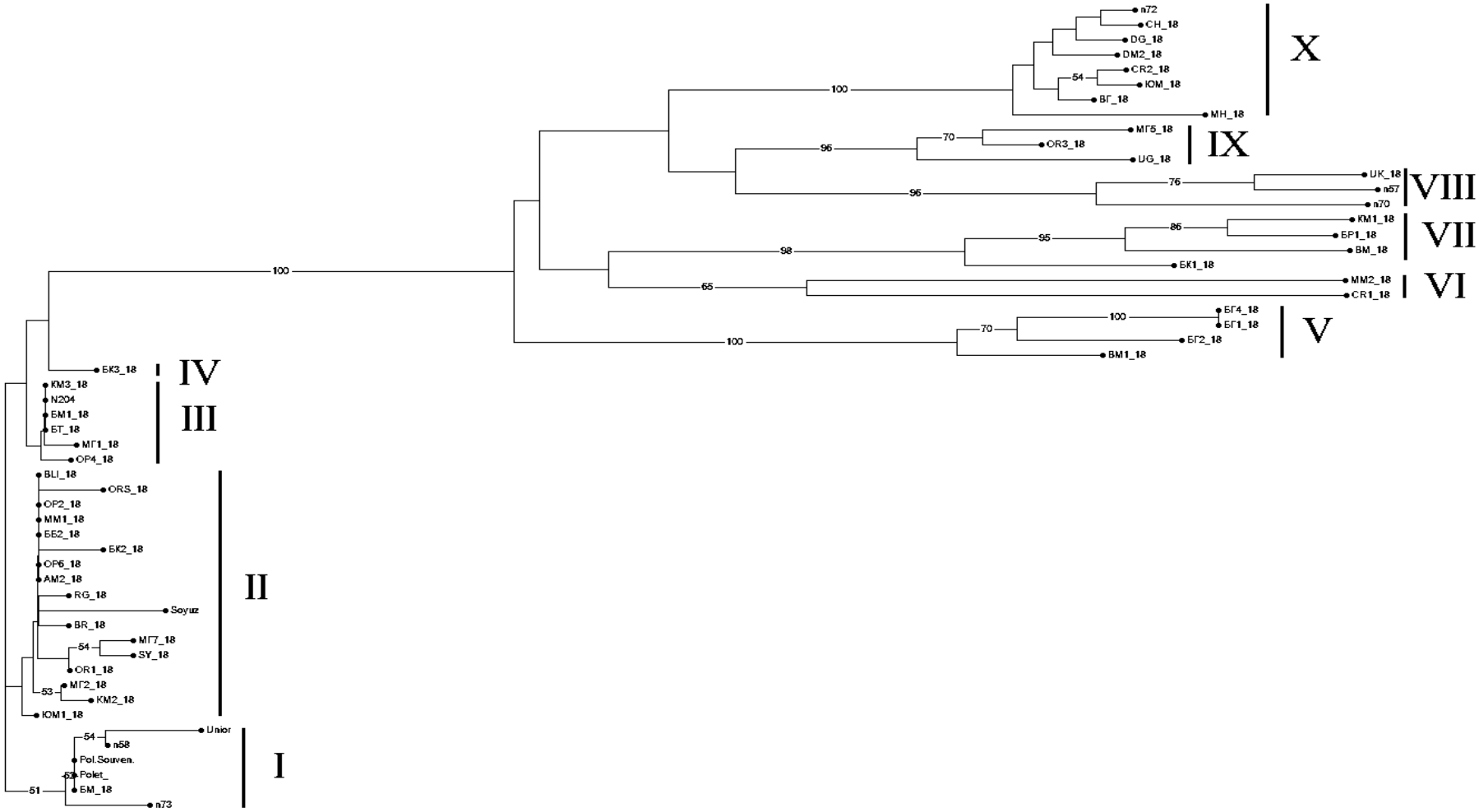

Рисунок 12 – Дендрограмма генетических дистанций между 54 селекционными образцами чеснока (*A. sativum* L.) на основании анализа изменчивости по 17 микросателлитным локусам. Значения бутстрэра получены для 1000 реплик

Среди всех проанализированных образцов существенных генетический различий по изученным локусам не было выявлено внутри кластера I между образцами Полесский сувенир, Полет, БМ-18, однако внутри кластера выделился сорт Юниор и образец №73. При анализе не было отмечено генетических различий между образцами в кластере II - ММ1-18, ББ2-18, АМ2-18, BLI-18, ОР6-18, ОР2-18; в кластере III - КМ3-18, N204, БМ1-18, БТ-18; и двумя образцами БГ4-18, БГ1-18 из кластера V. Наибольший кластер II состоял из 17 достаточно генетически близких образцов, из которых выделился генотип сорта Союз. Менее отдалёнными от общей группы были образцы ORS-18 и БК2-18. Клоны МГ7-18 и SY-18 сгруппировались вместе. Отбор генотипов из различных районов произрастания и их идентификация позволяет выделить различные генетически образцы с целью их дальнейшего использования в селекционной работе.

Генетическая идентификация признака ЦМС у лука репчатого. В ходе данного исследования маркеры, которые определяли наличие факторов стерильности в цитоплазме показали совпадающие результаты, тогда как маркеры для ядерных генов – восстановителей фертильности не дали однозначных результатов. Наиболее удобными в определении ядерных генов оказались маркеры, разработанные для мультиплексной ПЦР AcSKP1, DNF-566 и RNS-357, вместе с которыми можно использовать маркеры для генов цитоплазмы, такие как *5'cob, orfA501, orf725*. Хотя необходимо отметить, что маркер *accD* для хлДНК для определения стерильности и *Jnurf20* для генов мтДНК не дали положительных результатов в данной работе. Химерный ген *orf725,* состоящий из части гена - *cox1,* рассматривается как определяющий при S-типе цитоплазмы. При расшифровке последовательностей мтДНК этот участок присутствовал только у стерильных генотипов. Наиболее сложный тип цитоплазмы для идентификации – T-тип, который генетически очень близок к нормальной цитоплазме – N-типу. Во всех случаях тестирование различных маркеров остаётся необходимым условием подбора оптимальной системы для использования с це-

лью идентификации факторов стерильности на конкретной популяции растений.

Оценка селекционного материала фасоли обыкновенной на наличие генов устойчивости к вирусу обыкновенной мозаики (BCMV)

Вирус обыкновенной мозаики фасоли (Bean common mosaic virus, BCMV) в последние годы значительно расширяет ареал распространения и становится опасным в экономическом отношении возбудителем болезни на фасоли овощной (*Phaseolus vulgaris* L.) в Нечернозёмной зоне России. Комбинация аллелей генов *I, bc-1*^{2}*, bc-3* позволяет иметь устойчивость ко всем основным штаммам вируса обыкновенной мозаики (BCMV) и вируса некротической мозаики (BCMNV). При амплификации с маркером SW13, который тесно связан с доминантным геном *I* получали ПЦР-продукт размером 690 п.н. Наличие этого гена в доминантном состоянии у образцов Плуто, Cade 128, Плуто х Секунда, Arion, Dilano, Пурпурная, Фатима, Верица, Ранняя восковая, Holberg, Niagare, образец из Китая, Образец 84, Royal Burgundy Purple Pod подтверждает присутствие генетической устойчивости у этих генотипов к BCMV. Маркер SBD5 указывает на присутствие гена *bc-1*^{2} в генотипе при наличии продукта амплификации 1300 п.н. Данный ген присутствовал у практически у всех образцов кроме Royal Burgundy Purple Pod, Niagare, *P. coccineus*, *P. lunatus*, Holberg, МБЗ, Грибовская 92, причем образцы Niagare и Holberg имели ген *I*. Наличие комбинации доминантного гена *I* совместно с геном *bc-1*^{2} ограничивает распространение небольшого некроза на жилках поражённых листьев. При оценке наших образцов с маркером *ROC11* фрагмент 300 п.н. присутствовал у большинства генотипов и отсутствовал у *P. coccineus, P. lunatus*, Holberg, Фатима, МБЗ (у некоторых растений), Грибовская. Как было показано, маркер ROC11 и маркер SG6 связаны геном *bc-3*, когда оба маркера присутствуют, то можно предположить гетерозиготное состояние данного локуса. При наличие одного маркера можно предположить гомозиготное состояние локуса. Однако, только один SG6 маркер размером 595 п.н. присутствовал у образцов *P. lunatus*, Грибовская 92, *P. coccineus*.

В результате исследований, маркирование трёх генов устойчивости *I*, *bc-1*^{2}, *bc-3* позволило установить, что большинство из 35 изученных коллекционных образцов содержали ген *bc-3*. При искусственном заражении селекционных образцов с разными генотипами в лабораторных условиях типичные симптомы поражения BCMV в виде мозаики и деформации листовой пластинки проявлялись только у растений, в геноме которых отсутствовали гены устойчивости *I* и *bc-1*^{2}.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. На основе RAPD-маркеров выявлены генетические отличия между видами, разновидностями и сортами капустных культур. Получены и расшифрованы специфические RAPD-фрагменты, характерные для видов *B. oleracea* L. и *B. rapa* L.
2. Определено большое генетическое разнообразие среди известных сортов и новых гибридов F1 капусты кочанной на основе полиморфизма SSR-локусов с подтверждением идентичности сортов. Гибридные образцы и инбредные линии имели значительные генетические отличия от исходных родительских форм.
3. Подобран оптимальный набор SSR-маркеров, позволяющий подтвердить гаметофитное происхождение и гомозиготность линий, полученных через культуру изолированных микроспор in vitro у капусты белокочанной.
4. Оптимизирована технология мультиплексной ПЦР для определения факторов мужской стерильности, идентифицирующая тип цитоплазмы в селекционном материале капустных культур без сложного генетического анализа по потомству.
5. Показана вариабельность типов цитоплазмы *Ogura* у капустных культур. Обнаружен новый аллельный вариант гена *orf138*, характеризующийся делецией и двумя несинонимичными нуклеотидными заменами.
6. Отобран и применён набор ДНК-маркеров для идентификации аллелей генов восстановителей фертильности у капустных культур, определивший наличие доминантных гена *Rf* аллелей у генотипов дайкона и редиса.

7. Расшифровка фрагментов генов, участвующих в синтезе аскорбиновой кислоты у представителей *B. oleracea* L. показала высокую консервативность нуклеотидной последовательности среди сортов капусты белокочанной. Однако, селекционные образцы отличались по уровню экспрессии изученных генов.
8. SSR-анализ сортов моркови столовой позволил генетически выделить наиболее отдалённые генотипы, пригодные для селекции новых форм. С использованием ОТ-ПЦР определен различный уровень экспрессии генов, участвующих в синтезе каротина у изученных селекционных образцов.
9. С помощью RAPD-маркеров получены данные о генетической изменчивости сортовых образцов сельдерея, определяя их принадлежность к листовой, черешковой и корневой разновидностям, что позволяет отбирать новые селекционные формы для дальнейшей селекции.
10. Совместное использование RAPD и ISSR-маркеров выявило генетические взаимоотношения между разновидностями и различными сортами петрушки и позволило классифицировать исходный селекционный материал.
11. На основе набора ISSR-маркеров классифицированы селекционные образцы многолетних видов луков и подтверждено гибридное происхождение форм, полученных от межвидовой гибридизации.
12. Определено восемь SSR-локусов позволивших оценить генетические взаимоотношения среди сортов лука репчатого, которые распределились согласно их генетической основе. Высокая степень генетической изменчивости, установленная среди 54 генотипов чеснока по 17 SSR-локусам, позволила идентифицировать генетически отдалённые образцы, необходимые для селекции новых форм.
13. Подобранная система ДНК-маркеров для лука репчатого позволяет определять стерильные линии, линии закрепители стерильности и линии восстановители фертильности на основе стандартной и мультиплексной ПЦР для отбора линейного материала при создании гибридов F1.

14. Генетический анализ выявил в коллекции фасоли обыкновенной три основных гена *I, bc-1*^{2}*, bc-3*, участвующих в проявлении устойчивости к вирусу обыкновенной мозаики. На основании сравнения полевой и генетических оценок выделены генотипы с признаками устойчивости: Плуто, Cade 128, Плуто х Секунда, Arion, Dilano, Пурпурная, Фатима, Верица, Ранняя восковая, Holberg, Niagare, образец из Китая, Образец 84, Royal Burgundy Purple Pod. Эти генотипы могут быть рекомендованы в качестве генисточников устойчивости.
15. В результате исследований показана необходимость оптимизации как известных, так и новых разработанных ДНК-маркеров для интеграции с селекционным процессом овощных культур.

Практические рекомендации

– При изучении используемого и исходного селекционного материала овощных культур наряду с различными методами изучения (морфологического (фенотипирование) и/или биохимического) следует проводить исследования по ДНК-маркированию с целью выявления и контроля генетически ценного материала для дальнейшего селекционного процесса.
– Выявление генисточников качества среди овощных растений рекомендуется осуществлять на основе оценки экспрессии соответствующих генов у селекционных образцов овощных культур.
– Определение генетического разнообразия рекомендуется осуществлять с применением различных систем маркирования, в зависимости от условий и доступности методов как от мультилокусных доминантных техник (RAPD, ISSR, AFLP), так до локус-специфичных кодоминантных методов, таких как STS, SSR, SNP- маркеры.
– Результаты, полученные от разных методических подходов оценки коррелирую между собой. Использование различных техник молекулярно-генетического анализа на одном растительном объекте позволяет получить больше информации о генетической изменчивости.

– Для маркирования хозяйственно ценных признаков в селекции овощных культур рекомендуется разрабатывать кодоминантные мультиплексные надёжные маркеры с выявлением гомо – и/или гетерозиготного состояния изучаемого локуса для возможной оценки большого количества селекционных образцов, например на наличие локусов качества, мужской стерильности и устойчивости. При этом необходимо проводить стандартизацию методов анализа для доступности в различных профильных лабораториях.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации, входящие в Web of Science или Scopus

1. Domblides, A.S. Discrimination between celery cultivars with the use of RAPD markers / A. Domblides, H. Domblides, V. Kharchenko // Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact, and Applied Sciences. – 2008. – V.62, N 6. – P. 219-222 DOI: 10.2478/v10046-009-0003-z.
2. Domblides, A.S. Study of genetic variation among parsley (Petroselinum Crispum (Mill.) Num.) samples using RAPD and ISSR markers / A. S. Domblides, E. A. Domblides, V. A. Kharchenko, G. Potekhin // Moscow University Biological Sciences Bulletin. – 2010. – V.65, N 4. – P. 152-154 DOI: 10.3103/S0096392510040073.
3. Домблидес, А.С. Определение типа цитоплазмы у растений семейства капустные (Brassicaceae Burnett) с помощью ДНК маркеров / Е. А. Домблидес, А. С. Домблидес, Т. В. Заячковская, Л. Л. Бондарева // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т.19, № 5. – С. 529-537. – DOI: 10.18699/VJ15.069.
4. Domblides, A.S. Identification of cytoplasm types in accessions of the Brassicaceae family (Brassicaceae Burnett) by DNA markers / E. A. Domblides, A. S. Domblides, T. V. Zayachkovskaya, L. L. Bondareva // Russian Journal of Genetics: Applied Research. – 2016. – V.6, N 5. – P. 510-519 DOI: 10.1134/S207905971605004X.
5. Domblides, A.S. Anther and ovule in vitro culture in carrot (Daucus carota L.) / A. S. Domblides // Acta Horticulturae. – 2017. – V.11, N 53. – P. 55-60 DOI: 10.17660/ActaHortic.2017.1153.9.
6. Домблидес, А.С. Особенности развития вируса обыкновенной мозаики фасоли (potyvirus, Potyviridae) в условиях Московского региона и исходный материал для селекции на устойчивость / И. А. Енгалычева, Е. Г. Козарь, А.

С. Домблидес [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2020. – Т. 55. – № 5. – С. 901-919 DOI: 10.15389/agrobiology.2020.5.901rus.

7. Домблидес, А.С. Оценка генетического разнообразия образцов капусты кочанной (Brassica oleracea L.) с использованием SSR маркеров / А. С. Домблидес, Л. Л. Бондарева, В. Ф. Пивоваров // Сельскохозяйственная биология. – 2020. – Т.55, № 5. – С. 890-900 DOI 10.15389/agrobiology.2020.5.890rus.
8. Domblides, A.S. Haploid embryogenesis in isolated microspore culture of carrots (Daucus carota l.) / N. Shmykova, E. Domblides, T. Vjurtts, A. Domblides // Life. – 2021. – V.11, N 1. – P. 1-17 DOI: 10.3390/life11010020.

Публикации, в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Домблидес, А.С. Полиморфизм межмикросателлитных повторов у видов лука / А. С. Домблидес, Е. А. Домблидес, Л. Ю. Кан, В. С. Романов // Овощи России. – 2011. – № 3(12). – С. 24-27.
2. Домблидес, А.С. Редис Моховский - источник ms и mf-линий при селекции на гетерозис / М. И. Федорова, Т. В. Заячковская, Е. А. Домблидес, А. С. Домблидес // Овощи России. – 2015. – № 3-4(28-29). – С. 22-27 DOI: 10.18619/2072-9146-2015-3-4-22-27
3. Домблидес, А.С. Характеристика гибридов между *Allium cepa* L. и *Allium nutans* L. по биохимическому составу / В. С. Романов, Л. Ю. Кан, Н. И. Тимин [и др.] // Овощи России. – 2017. – № 5(38). – С. 33-36. DOI: 10.18619/2072-9146-2017-5-33-36.
4. Домблидес, А.С. Получение DH-растений в культуре микроспор моркови / Т. С. Вюртц, Е. А. Домблидес, Н. А. Шмыкова [и др.] // Овощи России. – 2017. – № 5(38). – С. 25-30 DOI: 10.18619/2072-9146-2017-5-25-30.
5. Домблидес, А.С. Генетическое разнообразие межвидовых гибридов рода *Allium* L. / В. С. Романов, Л. Ю. Кан, А. С. Домблидес [и др.] // Овощи России. – 2018. – № 1(39). – С. 21-27 DOI: 10.18619/2072-9146-2018-1-21-27.
6. Домблидес, А.С. Классификация отечественных сортов капусты Brassica oleracea L. с использованием SSR маркеров / А. С. Домблидес, Е. А. Домблидес, Л. Л. Бондарева, В. Ф. Пивоваров // Овощи России. – 2018. – № 5(43). – С. 9-12 DOI: 10.18619/2072-9146-2018-5-9-12.
7. Домблидес, А.С. Селекционные особенности многолетних форм межвидовых гибридов лука / В. С. Романов, А. С. Домблидес, Л. Ю. Кан [и др.] // Овощи России. – 2018. – № 5(43). – С. 18-24 DOI: 10.18619/2072-9146-2018-5-18-24.
8. Домблидес, А.С. Поиск генисточников признака стерильности у образцов лука репчатого с использованием ДНК маркеров / А. С. Домблидес // Овощи России. – 2019. – № 5(49). – С. 15-19 DOI: 10.18619/2072-9146-2019-5-15-19.

Публикации в других изданиях

1. Домблидес, А.С. Использование RAPD-маркеров для идентификации сортов сельдерея / А. С. Домблидес, Е. А. Домблидес, В. А. Харченко, И. М. Греков // Приоритетные направления в селекции и семеноводстве сельскохозяйственных растений в XXI веке, Московская область, 15–18 декабря 2003 года. – Московская область: Всероссийский научно-исследовательский институт селекции и семеноводства овощных культур, 2003. – С. 369-373.
2. Домблидес, А.С. Исследование генетического полиморфизма сортов сельдерея с использованием RAPD-маркеров / А. С. Домблидес, Е. А. Домблидес, В. А. Харченко, И. М. Греков // Селекция и семеноводство овощных культур. – 2003. – № 39. – С. 72-77.
3. Domblides, A.S. Estimation of genetic diversity among cultivars of cabbage using RAPD markers / E. A. Domblides, A. S. Domblides, E. G. Dobrutskaya, E. V. Baranova // Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact, and Applied Sciences. – 2007. – V.61, N 5. – P. 164.
4. Domblides, A.S. Use RAPD markers for identification of celery cultivars / A. S. Domblides, E. A. Domblides, V. A. Kharchenko // Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact, and Applied Sciences. – 2007. – V.61, N5. – P. 164.
5. Domblides, A.S. The use of RAPD markers for identification of celery cultivars / A. S. Domblides, E. A. Domblides, V. A. Kharchenko // Plant Genetic Resources and their Exploitation in the Plant Breeding for Food and Agriculture : 18th EUCARPIA Genetic Resources Section Meeting, Piestany, Slovak Republic, 23 мая – 26 2007 года. – Piestany, Slovak Republic: PNprint, spol.s.r.o, 2007. – P. 151.
6. Domblides, A.S. Estimation of genetic diversity of several vegetable crops by randomly amplified polymorphic DNA markers / A. S. Domblides, E. A. Domblides, V. A. Kharchenko // Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact, and Applied Sciences. – 2007. – V.61, – N 5. – P. 163-164.
7. Домблидес, А.С. Оценка генетического разнообразия капустных культур с использованием RAPD маркеров / Е. А. Домблидес, А. С. Домблидес // Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений: Сборник научных трудов III Международной научной конференции: к 50-летию Отдела биохимии и биотехнологии растений, Минск, 14–16 мая 2008 года / Редколлегия: В.Н. Решетников [и др.]. – Минск: Белорусский государственный университет, 2008. – С. 131-136.
8. Домблидес, А.С. Генетические ресурсы, Eucarpia 19 / А. С. Домблидес, Е. А. Домблидес, В. А. Харченко // Овощи России. – 2009. – № 3(5). – С. 52-55.

9. Domblides, A.S. Revealing of genetic polymorphism among breeding accessions of the Brassica rapa L. and Brassica oleraceae L. by RAPD markers / E. Domblides, A. Domblides, V. Startsev, L. Bondareva // 19th EUCARPIA Conference, Genetic Resources Section : Book of Abstracts, Ljubljana, Slovenia, 26–29 мая 2009 года. – Ljubljana, Slovenia: Kmetijski institut Slovenije, 2009. – P. 76.
10. Domblides, A.S. RAPD markers as screening tools for analyzing vegeuable plant accessions / A. S. Domblides, E. A. Domblides, V. A. Kharchenko // 19th EUCARPIA Conference, Genetic Resources Section : Book of Abstracts, Ljubljana, Slovenia, 26–29 мая 2009 года. – Ljubljana, Slovenia: Kmetijski institut Slovenije, 2009. – P. 27.
11. Домблидес, А.С. Изучение генетического полиморфизма образцов петрушки с использованием RAPD и ISSR маркеров / А. С. Домблидес, Е. А. Домблидес, В. А. Харченко, Г. А. Потехин // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. – 2010. – № 4. – С. 25-28.
12. Домблидес, А.С. Оценка генетического разнообразия и филогенетических связей у образцов А и С геномов капустных культур / Е. А. Домблидес, А. С. Домблидес, Л. Л. Бондарева, В. И. Старцев // Современные тенденции в селекции и семеноводстве овощных культур. Традиции и перспективы : II Международная научно-практическая конференция: материалы докладов, сообщений, Москва, 02–04 августа 2010 года / Редактор: В.Ф. Пивоваров. – Москва: Всероссийский научно-исследовательский институт селекции и семеноводства овощных культур, 2010. – С. 214-223.
13. Домблидес, А.С. Изучение генетической изменчивости образцов петрушки с использованием RAPD и ISSR маркеров / А. С. Домблидес, Е. А. Домблидес, В. А. Харченко, Г. А. Потехин // Современные тенденции в селекции и семеноводстве овощных культур. Традиции и перспективы : II Международная научно-практическая конференция: материалы докладов, сообщений, Москва, 02–04 августа 2010 года / Редактор: В.Ф. Пивоваров. – Москва: Всероссийский научно-исследовательский институт селекции и семеноводства овощных культур, 2010. – С. 208-213.
14. Domblides, A.S. RAPD and ISSR markers for study of genetic variation among parsley (Petroselinum Crispum (Mill.) Num.) accessions / A. S. Domblides, E. A. Domblides, V. A. Kharchenko // 2nd International Symposium on Genomics of Plant Genetic Resources : Book of Abstracts, Bologna, Italy, 24–27 апреля 2010 года. – Bologna, Italy: Stampato alla Tipografia Negri, 2010. – P. 125.
15. Domblides, A.S. DNA markers used to study the genetic variation among parsley (Petroselinum crispum (Mill.) Nym.) accessions / A. S. Domblides, E. A. Domblides, V. A. Kharchenko // Proceedings of the EUCARPIA Leafy Vegeta-

bles 2011, Lille, France, 24–26 августа 2011 года. – Lille, France: Universite Lille Nord de France, 2011. – P. 58.
16. Domblides, A.S. PCR-based identification of cytoplasm types in male sterile accessions of Brassicaceae / E. A. Domblides, A. S. Domblides, T. V. Zayachkovskaya [et al.] // Exploitation of Brassica diversity for improving agriculture chains, Italy, Catania, 12–16 ноября 2012 года. – Italy, Catania: University of Catania, 2012. – P. 116-117.
17. Домблидес, А.С. Идентификация межвидовых гибридов лука с использованием ДНК маркеров / А. С. Домблидес, Е. А. Домблидес, В. С. Романов [и др.] // Молекулярная диагностика : Сборник трудов, Москва, 18–20 марта 2014 года. – Москва: Издательство МБА, 2014. – С. 436-437.
18. Домблидес, А.С. Диагностика типа ЦМС с использованием мультиплексной ПЦР / Е. А. Домблидес, А. С. Домблидес, Т. В. Заячковская, Л. Л. Бондарева // Молекулярная диагностика : Сборник трудов, Москва, 18–20 марта 2014 года. – Москва: Издательство МБА, 2014. – С. 435-436.
19. Domblides, A.S. Anther and ovule in vitro culture in carrot (Daucus carota L.) / A. S. Domblides // Abstracts Carrot and other Apiaceae, International Symposium: Innovation, Cropping systems andPproducts quality,Health and Environment, Angers, France, 17–19 сентября 2014 года. – Angers, France: INRA, 2014. – P. 28.
20. Домблидес, А.С. Идентификация типа цитоплазмы у образцов семейства капустные с использованием ПЦР / Е. А. Домблидес, А. С. Домблидес, Т. В. Заячковская, Л. Л. Бондарева // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты) : VI Международная научно-практическая конференция, Ялта, 12–17 октября 2014 года. – Ялта: Общество с ограниченной ответственностью «Издательство Типография «Ариал», 2014. – С. 164-165.
21. Домблидес, А.С. Полиморфизм ISSR и SSR маркеров у представителей рода Allium L / А. С. Домблидес, Е. А. Домблидес, В. С. Романов [и др.] // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты) : VI Международная научно-практическая конференция, Ялта, 12–17 октября 2014 года. – Ялта: Общество с ограниченной ответственностью «Издательство Типография «Ариал», 2014. – С. 163.
22. Domblides, A.S. Biotechnological approaches for breeding programs in vegetable crops / E. A. Domblides, N. A. Shmykova, D. V. Shumilina [et al.] // Agrosym 2017: BOOK OF PROCEEDINGS, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 05–08

октября 2017 года. – Jahorina, Bosnia and Herzegovina: East Sarajevo: Faculty of Agriculture, 2017. – P. 452-460.
23. Домблидес, А.С. Исторические этапы развития лаборатории генетики и цитологии ФГБНУ ФНЦО / Л. Ю. Кан, А. С. Домблидес // Известия ФНЦО. – 2020. – № 1. – С. 10-22. – DOI 10.18619/2658-4832-2020-1-10-22.
24. Домблидес, А.С. Идентификация сортов чеснока озимого (*Allium sativum* L.) с использованием микросателлитных маркеров / И. Г. Кохтенкова, В. В. Скорина, А. С. Домблидес // Земледелие и растениеводство – 2021. - №3(136) – С. 44-47.

Патенты

Авторское свидетельство № 43204 РФ Сорт сельдерея черешкового и листового Атлант. / Гинс В.К., Греков И.М., Харченко В.А., Шевченко Ю.П.; заявитель – ГНУ ВНИИ селекции и семеноводства овощных культур. – выдано 02.02.2006. – заявка №9463324. – дата приоритета 06.09.2005.

Авторское свидетельство № 55264 РФ Сорт петрушки Нежность. / Домблидес Е.А., Пивоваров В.Ф., Потехин Г.А., Харченко В.А., Шевченко Ю.П.; заявитель – ГНУ ВНИИ селекции и семеноводства овощных культур. – выдано 10.10.2011. – заявка №9052186. – дата приоритета 06.10.2009.