

На правах рукописи

КАРЛОВ ГЕННАДИЙ ИЛЬИЧ

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-
ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ УСКОРЕННОГО
СОЗДАНИЯ СЕЛЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА РАСТЕНИЙ С
ЗАДАНЫМИ СВОЙСТВАМИ**

*специальности: 03.00.23 – биотехнология
03.00.15 – генетика*

*Автореферат
д и с с е р т а ц и и
на соискание ученой степени
доктора биологических наук*

Москва 2009

Работа выполнена в Российском государственном аграрном университете – МСХА имени К.А.Тимирязева

Научный консультант:

Доктор биологических наук, профессор Л.И.Хрусталева

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук А.В.Поляков

Доктор биологических наук А.А.Поморцев

Доктор сельскохозяйственных наук Н.И.Тимин

Ведущая организация: Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН

Защита состоится «30» декабря 2009 г. в 14:30 на заседании диссертационного совета Д.220.043.10 при Российском государственном аграрном университете – МСХА имени К.А.Тимирязева по адресу: 127550, г.Москва, ул.Тимирязевская, 49. Факс: +7(495) 9777001, сайт www.timacad.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Н.И.Железнова РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева.

Автореферат разослан «___» _____ 2009 г.
и размещен на сайте <http://www.vak.edu.gov.ru>

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Е.А.Калашникова

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Важной и актуальной проблемой в селекции растений является задача создания селекционного материала с заданными свойствами. Создание такого материала до сих пор остается сложной и в отдельных случаях трудновыполнимой задачей. С одной стороны с появлением технологий генной инженерии стало возможным создание таких растений. Однако, несовершенство этих технологий и возможность генетической модификации только единичных признаков не всегда позволяет применять их на практике. С другой стороны классическими методами селекции создано огромное количество ценного селекционного материала. Применение и интеграция новых технологий молекулярно-генетической оценки этого материала в селекционный процесс позволит значительно сократить время создания генотипов с заданными свойствами.

За последние два десятилетия использование молекулярно-генетических методов позволило исследовать физическую и функциональную организацию геномов многих сельскохозяйственных культур (Collard and Mackil, 2007). Одним из основных понятий, объединяющих эти методы, является понятие «молекулярно-генетический маркер». Внедрение ДНК-маркеров позволяет значительно сократить затраты труда, ускорить и удешевить селекционный процесс, а также контролировать перенос хозяйственно-ценных генов от одного организма другому (Francia et al. 2005). В настоящее время разработано большое количество типов молекулярно-генетических маркеров, которые основаны на различных классах последовательностей геномной ДНК. Они позволяют выявлять генетическое разнообразие на молекулярном уровне организации ДНК, что является базисом, на котором основаны все дальнейшие теоретические (филогения, изучение организации генома) и прикладные (картирование, маркирование генов, генотипирование) исследования.

При отборе нужных генотипов в расщепляющихся популяциях, селекционер сталкивается обычно со следующими проблемами:

- 1) Для отбора генотипа по заданному признаку необходима большая расщепляющаяся популяция;
- 2) Необходимо дожидаться нужного поколения (F_5 , F_6);
- 3) Становится достаточно сложно проводить отбор в популяции по нужному признаку, если его проявление зависит от условий окружающей среды;
- 4) Чаще всего приходится ждать до поздних этапов онтогенеза растений, чтобы провести отбор по признаку;
- 5) Трудно проводить накопление генов, например устойчивости, так как сложно провести отбор генов в присутствии уже существующих (Gupta and Varshney, 2000).

Помочь решить данные проблемы может использование близко сцепленных с признаком молекулярных маркеров, полученных различными методами.

До недавнего времени в селекции сельскохозяйственных культур использовались только морфологические маркеры. Они могли проявляться на различных этапах развития растений, идентифицироваться визуально или в результате биохимических исследований. При этом проявление тех или иных признаков в значительной степени зависит от условий внешней среды. Традиционные методы селекции на устойчивость требуют создания инфекционных фонов и трудоемкую оценку каждого образца. Проведение таких работ связано со значительными затратами труда и времени. Селекционный процесс для однолетних культур затягивается до 10, а для двулетних до 20 лет.

Использование ДНК-маркеров позволяет значительно сократить затраты труда, ускорить и удешевить селекционный процесс, а также контролировать перенос хозяйственно-ценных генов от одного организма другому. Наиболее эффективными молекулярными маркерами являются те, которые основаны на характерных особенностях нуклеотидных последовательностей самих генов. Для разработки таких ДНК-маркеров необходимо выявить различия в структуре последовательностей ДНК локусов (генов) у форм растений отличающихся по проявлению признака, например по устойчивости к фитопатогену генотипов.

Цель и задачи исследования. Цель исследований – разработка комплексной системы, основанной на использовании современных молекулярно-генетических и молекулярно-цитогенетических технологий для эффективной и ускоренной селекции растений

Задачи исследования

1. Разработать систему идентификации родительских геномов и мониторинга чужеродного генетического материала в селекционных программах с использованием межвидовой гибридизации.
2. Изучить особенности организации геномов растений, представителей различных семейств, для разработки эффективных ДНК маркеров.
3. Разработать методологию использования молекулярных и молекулярно-цитогенетических маркеров на различных этапах селекционного процесса.
4. Разработать новые подходы изучения механизмов формирования 2n-гамет с целью преодоления межвидовой несовместимости при создании ценного селекционного материала.
5. Исследовать возможности использования ISSR-PCR-маркеров для оценки исходного селекционного материала и при создании эффективных ДНК-маркеров.
6. Клонировать и охарактеризовать последовательности генов устойчивости растений и их аналогов.

7. Создать ДНК маркеры на хозяйственно-ценные гены томата, риса, огурца, малины и хмеля.

Научная новизна и практическая значимость. Адаптирована методика геномной *in situ* гибридизации на межвидовых гибридах лилий и изучен геномный состав этих гибридов, получаемых с использованием 2n-гамет. Впервые установлен механизм формирования 2n-гамет у межвидовых гибридов лилий, основанный на редукции первого деления мейоза (FDR). На основе разработанного метода многоцветной геномной *in situ* гибридизации на лилиях впервые подтверждена возможность создания трехгеномных гибридов ($2n=36$).

Разработана оптимизированная методика совместного применения дифференциального окрашивания хромосом, геномной гибридизации *in situ* и ДНК-маркирования, позволяющая проводить эффективное выявление межгеномных транслокаций у тритикале и пшеницы.

Впервые продемонстрирована возможность использования высокоповторяющейся геномспецифичной последовательности ДНК GenBR-1 для визуализации генома В капустных в разном геномном окружении.

С помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) впервые установлена геномная организация высокоповторяющихся последовательностей ДНК *Ty-1-soria*-подобных ретротранспозонов томата. Показано, что у томата ретротранспозоны локализованы в прицентромерных гетерохроматиновых регионах хромосом. Подтверждена эффективность использования пахитенных хромосом томата для такого анализа. Для растений с крупными геномами (лилии, крокусы, тюльпаны и лук) показано равномерное распределение *Ty-1-soria*-подобных ретротранспозонов, за исключением С-бэндинг положительных регионов хромосом, где они не выявляются.

Впервые клонирована высокоповторяющаяся субтеломерная последовательность ДНК хмеля. С помощью FISH анализа показана субтеломерная локализация этой последовательности на хромосомах. Выявлено, что эта последовательность может служить цитогенетическим маркером для идентификации хромосом хмеля. Впервые установлено, что последовательности генов рибосомной РНК (45S и 5S) являются эффективными цитогенетическими маркерами для идентификации трех из 10 хромосом хмеля с использованием флуоресцентной гибридизации *in situ*.

Выявлен высокий полиморфизм межмикросателлитных последовательностей ДНК (ISSR) на видовом и межвидовом уровнях у видов *Solanum*, *Humulus lupulus*, *Cucumber* и *Rubus*. Рекомендован набор ISSR праймеров для анализа исходных родительских и гибридных форм при внутри- и межвидовой гибридизации, а также форм растений томата с различным уровнем интрогрессии генетического материала. На основе выявленного полиморфизма ISSR создана интегрированная генетическая карта межмикросателлитных последовательностей ДНК томата и высокоэффективные ДНК-маркеры для выявления пола у растений хмеля и признака ремонтантности малины.

Впервые проведено клонирование двух последовательностей ДНК, специфичных для хромосомы Y мужских растений хмеля. На основе анализа клонированных последовательностей созданы эффективные ДНК маркеры для выявления пола растений хмеля, которые могут использоваться в селекционном процессе.

Впервые клонированы фрагменты последовательностей генов устойчивости подсолнечника остролистного. Установлена их высокая степень гомологии с ранее клонированными генами устойчивости растений.

Идентифицированы молекулярные маркеры WA-типа ЦМС риса. Идентифицированы и картированы молекулярные маркеры, тесно сцепленные с геном восстановления фертильности *Rf4*, расположенные на длинном плече 10-й хромосомы риса.

Продемонстрирована высокая эффективность сравнительного анализа ДНК локусов генов устойчивости у устойчивых и неустойчивых генотипов растений для создания надежных ДНК маркеров. Созданы кодоминантные CAPS-маркеры генов устойчивости к фузариозу (*I2*) и ветрициллезу (*Ve*) томата. Созданы ДНК диагностикумы на гены устойчивости томата - к фузариозу и вертициллезу, хмеля – на определение пола растений, риса – на ЦМС и ген восстановления фертильности и оптимизированы условия применения ДНК маркеров на гены устойчивости томата к нематоду, ВТМ, кладоспориозу. Предложены оптимальные высокопроизводительные методики выделения ДНК для массового скрининга селекционного материала. Разработаны методы и схемы высокопроизводительной оценки на наличие хозяйственно-ценных признаков в исходном селекционном материале с помощью ДНК технологий. Получены перспективные формы томата, сочетающие несколько генов устойчивости к болезням и вредителям в одном генотипе, и создан коммерческий гибрид F₁.

Выносимые на защиту положения.

1. Методология использования молекулярно-генетических и молекулярно-цитогенетических методов в селекции основанная на:

- достижениях в геномике и биоинформатике;
- надежности и эффективности молекулярно-генетических и молекулярно-цитогенетических ДНК-маркеров;
- возможности ускорения селекционного процесса в два раза и сокращения расходов при создании гибридов F₁ овощных культур;
- предлагаемой схеме интеграции ДНК технологий для сопровождения селекционного процесса.

2. Схема интегрированных исследований для сопровождения селекционного процесса.

3. Эффективные ДНК-маркеры для селекции растений по хозяйственно-ценным признакам.

4. Механизм формирования 2n-гамет межвидовых гибридов лилий, основанный на редукции первого деления мейоза (FDR).

Апробация работы. Основные результаты исследований были представлены на XIX International Symposium on Improvement of Ornamental

Plants (Angers, France, 1999), Fifth International Solanaceae Conference (Nijmegen, 2000), Международной научно-практической конференции «Селекция и семеноводство овощных культур в XXI в.» (Москва, 2000), научной конференции «Памяти Грегора Менделя» (Москва, 2001), научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения А.Р.Жебрака и 70-летию образования кафедр генетики в Московской с.-х. академии им. К.А.Тимирязева (Москва, 2002), International Hop Growers` Convention (Dobrna-Žalec, Slovenia 2003), 2-й научной конференции МОГИС им.Н.И.Вавилова «Актуальные проблемы генетики» (Москва, 2003), 4th International Iran and Russian Conference in Agriculture and Natural Resources (Shakhrekord, Iran, 2004), XV Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB) Congress (Lyon, France, 2006), Второй Вавиловской международной конференции «Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке: состояние, проблемы, перспективы» (Санкт-Петербург, 2007), International Conference “Molecular Mapping and Marker Assisted Selection in Plants” (Vienna, Austria, 2008), международной конференции «Научное наследие Н.И.Вавилова - фундамент развития отечественного и мирового сельского хозяйства» (Москва, 2007), конференциях преподавателей и сотрудников РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева 1997-2008 гг.

Связь работы с крупными научными программами. Исследования проводились в рамках проектов РФФИ (00-04-49561-а, 01-04-06522-мас, 06-04-49753-а), государственных контрактов с Министерством образования Российской Федерации в рамках ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники» на 2002—2006 годы”, государственных контрактов с Федеральным агентством науке и инновациям в рамках ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы" и ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009 - 2013 годы, а также государственных контрактов с Министерством сельского хозяйства Российской Федерации.

Публикации. По материалам докторской диссертации опубликовано 61 работа, из них 20 научных работ в рецензируемых журналах из «Перечня...» ВАК РФ, 1 патент на изобретение и 1 авторское свидетельство.

Личный вклад соискателя. Экспериментальные результаты получены автором лично и совместно с коллегами из центра молекулярной биотехнологии, кафедры генетики, международного института исследований растений PRI (Wageningen, Нидерланды), Университета Хохенхайма (Германия), а также с аспирантами и студентами, работавшими под руководством диссертанта. Соискателю принадлежат разработка программы исследования, схемы основных экспериментов и теоретическое обобщение полученных результатов. Доля личного участия в публикациях, выполненных в соавторстве, пропорциональна числу соавторов. Автор выражает большую благодарность научному консультанту, д.б.н., профессору Л.И.Хрустальной, а также сотрудниками центра молекулярной биотехнологии, кафедры генетики, аспирантам и студентам,

которые принимали участие в экспериментальных работах и обсуждении результатов. Особую признательность автор выражает Григорию Федоровичу Монахосу, директору селекционной станции им. Н.Н. Тимофеева, и Александру Александровичу Соловьеву, заведующему кафедрой генетики РГАУ-МСХА, за предоставленный селекционный растительный материал для проведения исследований.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на ___ стр. машинописного текста, включает ___ таблицы, ___ рисунка, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, выводов, списка литературы включающего ___ отечественных и зарубежных источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования выполнены в 1996-2009 годах в Российском государственном аграрном университете – МСХА имени К.А.Тимирязева.

В работе использовали 6 форм межвидовых гибридов лилий (PRI, Wageningen), семена первичных тритикале АД-1, АД-3, АД-4, межамфилоидного гибрида (МАГ) и перспективных линий тритикале 491-07 и 497-07 (ГНУ НИИСХ Юго-Востока), селекционные формы тритикале, сорта и линии яровой и озимой пшеницы, коллекцию видов томата и их межвидовые гибриды и моносомно-дополненные формы (кафедра генетики РГАУ-МСХА), расщепляющиеся по хозяйственно-ценным признакам селекционные популяции томата (Селекционная станция имени Н.Н.Тимофеева, агрофирмы «Ильинична», «Гавриш», «Манул»), набор видов *Brassicaceae* с геномом В (коллекция ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии), коллекцию из более 60 форм и сортов хмеля (ВНИПТИХ, Цивильск, Центр молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА, Университет г.Штутгарта, Германия), ЦМС линии капусты пекинской *Brassica pekinensis* (Селекционная станция имени Н.Н.Тимофеева), селекционные линии риса с WA-типом ЦМС и генами восстановления фертильности (Иран) (4 ЦМС линии: Neda-A, IR67017-180-2-1-2-A, Usen-A, IR68897-A, 4 их соответствующих фертильных аналогов (линий закрепителей) Neda-B, IR67017-180-2-1-2-B, Usen-B, IR68897-B; 7 фертильных линий восстановителей: IR24, IR28, Amol2, IR36 IR62030, IR60966, Amol1; 7 Популяций F2), аллоцитоплазматические линии пшеницы (РУДН), 64 образца ДНК, выделенные из растений F₂ расщепляющейся популяции межвидового гибрида *S. lycopersicum* X *S. pennellii* (образцы ДНК подготовлены и предоставлены док. A. W. van Heusden, PRI, Wageningen, The Netherlands).

Цитологические препараты готовили по стандартным методикам приготовления постоянных препаратов методами раздавливания и распластывания митотических и мейотических хромосом (Пухальский и др., 2004; Zhong X.-B. et al., 1996).

Геномную *in situ* гибридизацию осуществляли по стандартной методике (Schwarzacher., 1992), с некоторыми модификациями. Хромосомы контрокрашивали пропидий-йодидом или DAPI 1 мг/мл. Анализ результатов проводили на флуоресцентных микроскопах “AxioPhot” и “AxioImager” (“Zeiss”, Германия) с соответствующими системами фильтров. Для анализа изображений производили фотосъемку на пленку Fuji 400 или использовали цифровую фотокамеру с соответствующим программным обеспечением. После проявки пленку сканировали в компьютер и обрабатывали изображение, используя программу Photoshop CS.

Выделение ДНК осуществляли из молодых листьев или семян вегетирующих растений, а также этиолированных проростков пшеницы, ржи и тритикале по стандартным методикам с некоторыми модификациями (Bernatzky and Tanksley, 1986; Van der Beek et al., 1991; Fulton et al., 1995).

Праймеры для амплификации и флуоресцентные ДНК-зонды синтезированы в ЗАО «Синтол», Москва. Амплификацию проводили на амплификаторах «Терцик» («ДНК-технология», Москва) и «DNA Engine Tetrad 2» (Bio-Rad, USA). Детекцию флуоресценции осуществляли на приборе «Джин» с программным обеспечением фирмы изготовителя («ДНК-технология», Москва). Условия проведения амплификации были индивидуальны для каждого из праймеров. В некоторых случаях производили оптимизацию условий амплификации.

Продукты ПЦР разделяли в 1,5-2% агарозном геле с буфером TBE при напряженности поля 6 В/см. В качестве маркера молекулярного размера использовали «100 bp leader» (Fermentas).

Клонирование ПЦР-продуктов проводили с помощью набора pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, USA) в соответствии с инструкцией, предложенной производителем.

Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программных пакетов GeneDoc (Multiple sequence alignment editor and shading utility. Ver. 2.6.002. Copyright© by K. Nicholas), Clone manager 6 version 6.00 (Sci Ed Central). Поиск гомологичных последовательностей и их анализ проводили в открытых базах генетических данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Sol Genomic Network (http://www.sgn.cornell.edu/about/tomato_project), EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk>).

Филогенетическая модель родства исследованных видов была построена путем обработки данных ISSR-PCR-анализ с помощью кластерного анализа по методу невзвешенного попарного арифметического среднего UPGMA (Nei et al., 1983). В качестве филогенетической дистанции между двумя видами брали отношение, полученных при сравнении количества полиморфных ISSR-фрагментов к общему количеству ISSR-фрагментов.

Обработку данных по расщеплению и расчет генетических расстояний проводили с помощью программного пакета MapMaker/EXP 3.0 (Lincoln et al. 1992). Для анализа сцепления по отдельным маркерам, частота рекомбинации

между маркером и локусом была рассчитана с использованием метода максимального правдоподобия (Allard, 1956).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ РОДИТЕЛЬСКИХ ГЕНОМОВ И МОНИТОРИНГА ЧУЖЕРОДНОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА В СЕЛЕКЦИОННЫХ ПРОГРАММАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОТДАЛЕННОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ.

Успешная межвидовая гибридизация является базой для интрогрессии хозяйственно-ценных признаков в культурные растения. В зависимости от объекта, целей и задач, стоящих в процессе интрогрессии генетического материала, требуется разработка различных систем мониторинга чужеродного генетического материала. Они могут быть основаны, как в отдельности, на молекулярно-цитогенетических или молекулярно-генетических методах, так и их комплексе.

1.1. МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ.

1.1.1. Геномная гибридизация *in situ* на межвидовых гибридах лилий. В процессе межвидовой гибридизации в международном центре исследований растений PRI, Нидерланды, создан ряд форм и гибридов лилий разного уровня пloidности и геномного состава. Ранее было показано, что фертильные растения межвидовых гибридов лилий образуют $2n$ -гаметы (Van Tuyl, J.M. et al., 1989, Tuyl, J.M. et al., 1997). Однако механизм возникновения таких гамет и возможность их использования таких в селекционных программах по созданию новых форм лилий оставались неизвестными. В нашей работе была впервые использована геномная гибридизация *in situ* для идентификации родительских геномов в межвидовых гибридах лилий, а также выяснения механизмов возникновения $2n$ гамет.

Гибрид F_1 : *L.longiflorum* 'Gelria' x азиатский гибрид 'Whilito' (LA). В результате геномной *in situ* гибридизации оказалось возможным четко различить оба родительских генома, *L. longiflorum* и азиатского гибрида, в LA-гибриде (рис.1a). Двенадцать хромосом с зеленой флуоресценцией принадлежат *L. longiflorum*. Проба равномерно гибридизовалась по всей длине этих хромосом. Остальные двенадцать хромосом с синей флуоресценцией принадлежат азиатскому гибриду 'Whilito' и визуализованы в следствие контрокрасивания красителем DAPI. Нами наблюдался очень низкий уровень перекрестной гибридизации меченой ДНК *L.longiflorum* на хромосомы, имеющие происхождение от азиатского гибрида 'Whilito'. Сайты гибридизации генов рибосомной ДНК были детектированы на трех хромосомах, имеющих происхождение от *L. longiflorum* и на трех - от азиатского гибрида.

Гибриды F_1 азиатский гибрид x (*L.longiflorum* x азиатский гибрид) (ALA). На рисунке 1b показан результат геномной *in situ* гибридизации на растении ALA-2. В качестве пробы были использованы ДНК *L.longiflorum* (зеленая

флуоресценция) и ДНК плазмиды рГА 71 (красная флуоресценция), контрокрашивали DAPI (синяя флуоресценция). Это растение является триплоидом ($2n=36$) вследствие образования нередуцированных $2n$ -гамет LA-гибридом, который использовался в качестве отцовской формы для получения ALA растений. В растении ALA-1 обнаружено пять рекомбинантных хромосом, восемь нерекомбинантных хромосом от *L. longiflorum* и двадцать три хромосомы азиатского гибрида. Одна из рекомбинантных хромосом содержала четыре сегмента, полученных от геномов *L. longiflorum* и Азиатского гибрида, что указывает на три сайта рекомбинации (рис 1b). Три хромосомы имели два сайта кроссинговера и одна хромосома имела один сайт, который был близко расположен к рДНК региону хромосомы азиатского гибрида. В общей сложности в ALA-1 было обнаружено десять точек рекомбинации и было обнаружено два и семь рДНК-сайтов, принадлежащих *L. longiflorum* и азиатскому гибриду соответственно.

В растении ALA-2 ($2n=36$) выявлено три рекомбинантных хромосомы, 10 принадлежащих *L. longiflorum* и 23 азиатскому гибриду. Две рекомбинантные хромосомы имели по два сайта кроссинговера и одна - один сайт. Три и шесть сайтов рДНК, принадлежащих *L. longiflorum* и азиатскому гибриду соответственно, было обнаружено в этом растении. Растение ALA-3 ($2n=36$) имело 12 хромосом от *L. longiflorum* и 24 хромосомы азиатского гибрида. В растении ALA-4 было обнаружено 48 хромосом, из них 12 имеют свое происхождение от *L. longiflorum*.

Гибрид F_1 Восточный гибрид \times (*L. longiflorum* \times азиатский гибрид) (OLA).

Для визуализации и анализа геномной организации трехвидового гибрида мы успешно использовали метод многоцветной геномной *in situ* гибридизации. В растении OLA ($2n=36$) все три родительских генома были четко различимы (рис 1c). Анализ кариотипа показал, что данный гибрид содержит по 12 гомеологичных нерекомбинантных хромосом каждого родителя *L. longiflorum*, восточный гибрид и азиатский гибрид.

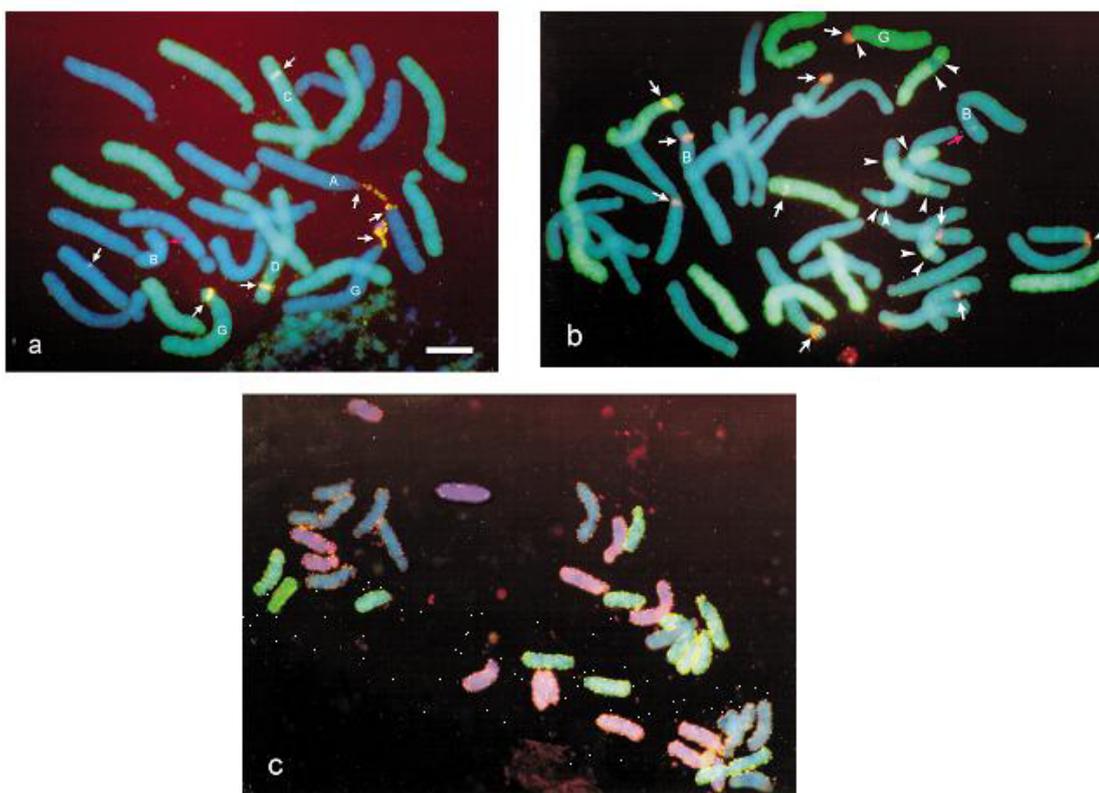


Рис 1 . Геномная гибридизация *in situ* на межвидовых гибридах лилий. а. F₁: (*L. longiflorum* x азиатский гибрид (синие хромосомы) (LA) б. F₁ (азиатский гибрид x [*L. longiflorum* x азиатский гибрид (ALA)) с. F₁ восточный гибрид (красные хромосомы) x (*L. longiflorum* x азиатский гибрид). Стрелками указаны сайты рекомбинации. *L. longiflorum* - зеленые хромосомы, азиатский гибрид - Синие хромосомы, восточный гибрид - красные хромосомы).

Итак, адаптированный нами применительно к лилиям метод геномной *in situ* гибридизации, позволил четко различить геномы *L. longiflorum*, восточных и азиатских лилий в гибридах, полученных при их скрещиваниях. Исходя из этого, мы можем заключить, что *L. longiflorum*, восточная и азиатская лилии содержат в своих геномах различающиеся семейства высоко- и среднеповторяющейся ДНК. Изменчивость этих типов ДНК считается источником дифференциации видов (Dean and Schmidt, 1995). Такая дифференциация и позволяет визуализировать геномы в межвидовых гибридах с использованием геномной *in situ* гибридизации (Schwarzacher et al. 1992).

Мониторинг чужеродного хроматина при интрогрессии генетического материала от одного вида к другому является очень важным. На данный момент геномная *in situ* гибридизация - наиболее эффективный метод для такого мониторинга и позволяет четко установить геномный состав межвидовых гибридов. Нами этот метод успешно применен на межвидовых гибридах лилий. При этом нам удалось визуализировать сайты рекомбинации и таким образом показать возможность интрогрессии генетического материала. Основным преимуществом метода геномной *in situ* гибридизации является и то, что интрогрессию в гибридах лилий из-за слабой изученности их геномов, невозможно установить с использованием

других молекулярных методов (RFLP, RAPD, AFLP и др.).

Успех интрогрессии полностью зависит от гомеологической рекомбинации между родительскими геномами в мейозе F₁ гибридов и от их фертильности (van Tuyl and DeJeu, 1997). Растения F₁ *L. longiflorum* х азиатский гибрид обычно полностью стерильны. Для преодоления этой проблемы на лилиях в настоящее время используются два подхода: митотическое удвоение хромосом и применение растений, формирующих нередуцированные 2n-гаметы (van Tuyl et al, 1989). Последний подход наиболее предпочтителен для селекционных программ, в которых упор делается на использование интрогрессии генетического материала от одного вида к другому. Формирование нередуцированных гамет связано обычно с двумя типами нарушения мейоза: 1. отсутствием первого мейотического деления (first division restitution - FDR); 2. отсутствием второго мейотического деления (second division restitution - SDR) (Mok and Peloquin, 1975; McCoy, 1982; Hermsen, 1984). Для использования гибридных растений, формирующих 2n-гаметы в селекционных программах, необходимо знать путь формирования таких гамет (FDR или SDR). В нередуцированных гаметах, образующихся в результате FDR, в каждую гамету попадают несестринские хроматиды каждой гомологичной хромосомы, в то время как в результате SDR сестринские хроматиды попадают в одну гамету (Ramana, 1979). В случае межвидовых гибридов по одной хроматиде от каждого родителя попадает в гаметы, сформированные в результате FDR. Отсутствие гомологичных хромосом *L. longiflorum* в ALA и OLA гибридах указывает на механизм FDR формирования 2n-гамет в LA-гибридах, которые были использованы в качестве отцовской формы

При анализе геномов гибридных растений ALA-1 и ALA-2 нами продемонстрировано наличие рекомбинации между геномами *L. longiflorum* и азиатских гибридов. Эти данные указывают на формирование хиазм в процессе формирования 2n-гамет. Отсутствие рекомбинантных хромосом в растениях ALA-3, ALA-4 и OLA, вероятно, связано с полным подавлением или низким уровнем спаривания между гомеологичными хромосомами.

Использование наряду с геномной пробой рибосомальной ДНК рТа 71 позволило получить дополнительную информацию и идентифицировать хромосомы, несущие ядрышкообразующие регионы. Проанализировав распределение рДНК в ALA-1 растении, мы также получили дополнительное подтверждение образования 2n-гамет через FDR механизм.

Таким образом, использование геномной гибридизации *in situ* позволило получить нам ценную информацию о частоте рекомбинации между геномами *L. longiflorum* и азиатского гибрида в образующих 2n гаметы F₁-гибридах. Результаты нашей работы указывают на то, что такие F₁-гибриды могут быть использованы для интрогрессии генетического материала от одного вида к другому.

1.1.2. Геномная гибридизация *in situ* на моносомно дополненных линиях томата. Геномная гибридизация *in situ* продемонстрировала свою эффективность и в случае анализа дополненных линий томата по второй

хромосоме *S. lycopersicoides*. При этом мониторинг чужеродного хроматина в геноме томата возможно было проводить, как на митотических, так и мейотических хромосомах.

1.2. СОВМЕСТНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ.

1.2.1. Тритикале. Тритикале - это относительно новая и перспективная культура, получившая признание производителей сельскохозяйственной продукции в последние десятилетия. В производстве представлены в основном гексаплоидные тритикале. Причем, как демонстрируют исследования перспективные линии и сорта тритикале часто несут замещения или транслокации (Zillinsky, 1980; Gustafson, Lukaszewsky, 1984; Соловьев, 2007). Замещения и транслокации хромосом позволяют решать проблемы, характерные для яровой тритикале, как это показано в отношении признаков хлебопекарных качеств зерна, устойчивости к прорастанию на корню, толерантности к ионам алюминия и другие (Rybka, 2003; Oracka and Łapiński, 2006; Wos et al., 2006). Таким образом, идентификация и подробная молекулярно-генетическая характеристика таких линий является важной проблемой. Эта информация будет основой для создания новых перспективных линий тритикале с заданными свойствами.

Идентификация хромосом и их участков может быть выполнена с использованием различных методов – дифференциального окрашивания, молекулярного маркирования, геномной гибридизации *in situ*. Применение комплексного подхода с использованием разных методов позволяет осуществлять надежную идентификацию хромосомных наборов тритикале.

С целью разработки такого подхода в нашей работе использовалась модельная линия тритикале 131/7, несущая пшенично-ржаную транслокацию. Для идентификации хромосом, вовлеченных в эту транслокацию применяли в комплексе молекулярно-генетические и молекулярно-цитогенетические методы. На первом этапе была физически картирована точка транслокации с использованием адаптированного нами метода геномной гибридизации *in situ* после дифференциального окрашивания на одной и той же метафазной пластинке (Рис.2).

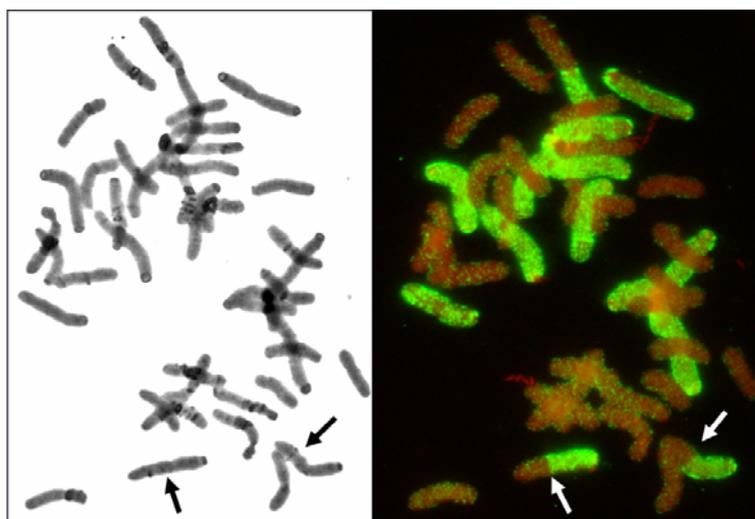


Рис.2. Совмещение дифференциального окрашивания и гибридизации *in situ* на одной и той же метафазной пластинке хромосом линии тритикале 131/7 (генетический материал ржи имеет желтый цвет, пшеницы – красный).

После анализа рисунка дифференциального окрашивания хромосом нами определено, что в геноме линии 131/7 присутствует замещение 2В хромосомы на 2D-хромосому и транслокация длинного плеча хромосомы 2В в хромосому 2R.

Однако, применение только цитологических маркеров для характеристики хромосом не может полностью исключить ошибок при идентификации генетического материала (Devos et al., 2000, Pestsova et al., 2000; Salina et al., 2003). Для подтверждения данных молекулярно-цитогенетического анализа нами был использован метод молекулярного маркирования. Для этого экспериментальным путем были подобраны микросателлитные маркеры, специфичные для конкретных хромосом. Отсутствие амплификации таких маркеров на других геномах позволило нам использовать их как STS-маркеры. Это позволило удешевить проведение такого анализа, так как не требуется проведение дорогостоящего денатурирующего гель-электрофореза. К преимуществам такого подхода можно отнести и отсутствие необходимости выявления полиморфизма исходных форм, участвовавших в создании тритикале. Нами были подобраны следующие микросателлитные маркеры на длинное и короткое плечи 2В хромосомы: Xwmc317, Xwmc361, Xwmc332, Xgwm120, Xwmc441, Xbarc167, Xbarc1064, Xbarc1139, Xwmc592, Xwmc477, Xbarc13, Xgwm429 (рис. 3), а также маркеры, специфичные на короткое и длинное плечо всех хромосом генома D (Табл.1).

Таблица 1.

Результаты амплификации микросателлитных маркеров, специфичных для D-гена у линии тритикале 131/7.

Локализация	SSR-маркер	Наличие амплификации	Локализация	SSR-маркер	Наличие амплификации
1DL	Xbarc271	-	4DS	Xwmc285	-
1DS	Xbarc149	-	5DL	Xbarc110	-
2DL	Xgwm349	+	5DS	Xwmc233	-
2DS	Xwmc111	+	6DL	Xbarc1030	-
3DL	Xbarc270	-	6DS	Xbarc196	-
3DS	Xbarc6	-	7DL	Xbarc53	-
4DL	Xbarc1183	-	7DS	Xwmc506	-

Примечание: здесь и далее + маркер присутствует, - – маркер отсутствует.

Маркеры Xwmc317, Xwmc361, Xwmc332, Xgwm120, Xwmc441, Xbarc167, Xbarc1064, Xbarc1147, локализованные в длинном плече хромосомы 2B, присутствовали в геноме линии 131/7. Маркеры Xwmc592, Xwmc477, Xbarc13, Xgwm429 отсутствовали в геноме линии 131/7 (рис. 3). Таким образом, точка рекомбинации находится между маркерами Xwmc592, локус 63,9 сМ, и Xwmc441, локус 76,8 сМ, по карте сцепления (Wheat, Consensus SSR, 2004 NA-SSR-2004-2B, <http://wheat.pw.usda.gov>). По физической карте (Wheat, Physical, SSR, <http://wheat.pw.usda.gov>) точка рекомбинации располагается в районе C-2BL2-0.36.

Для подтверждения замещения хромосомы 2R на хромосому 2D использовали молекулярный STS-маркер на локус запасного белка Sec-2, картированный в коротком плече хромосомы 2R.

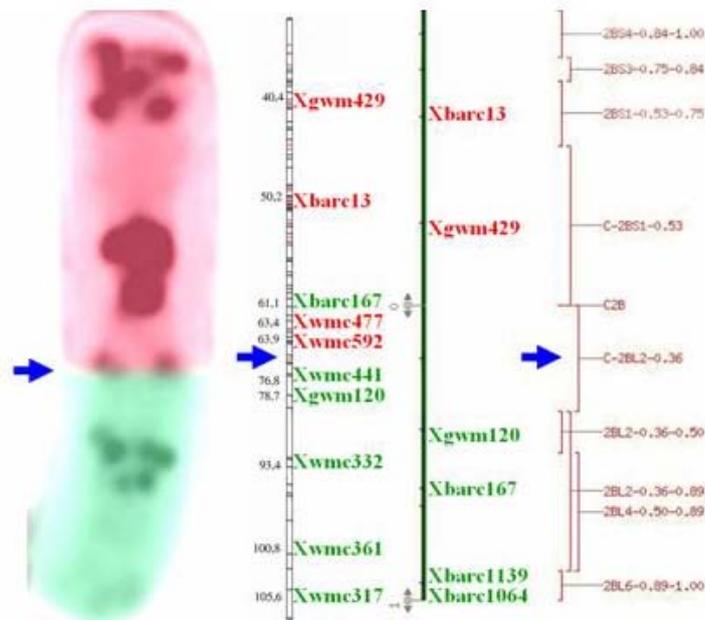


Рис 3. Локализация точки транслокации между хромосомой пшеницы и ржи на физической и генетической картах.

1.2.2. Выявление интрогрессии хроматина ржи в геном пшеницы.

Для выявления хроматина генома ржи мы использовали рожь-специфичный ДНК-маркер (RYE) (Ribeiro-Carvalho et al., 1997, Katto et al., 2004). С помощью этого маркера можно идентифицировать даже небольшие интрогрессии хроматина ржи (Ribeiro-Carvalho et al., 1997).

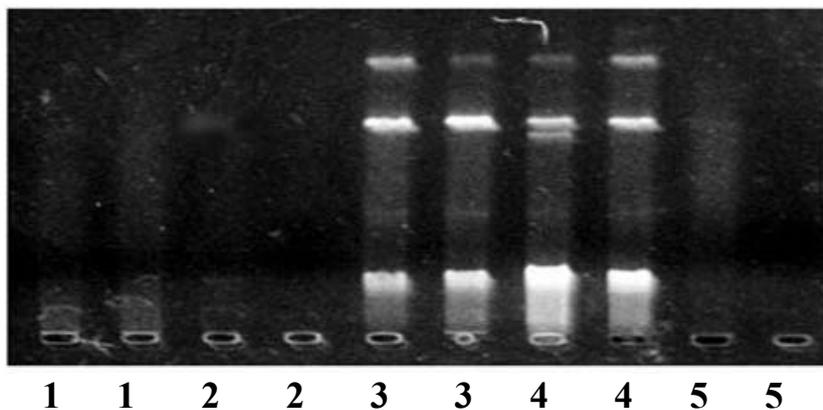


Рис 4. Электрофорез продуктов ПЦР с праймерами, специфичными на генетический материал ржи (1. Аллоцитоплазматическая линия пшеницы (3.2/94), 2. Аллоцитоплазматическая линия пшеницы (8/96), 3. Тритикале 131/7, 4. Рожь 'Вятка' К-9367, 5. Пшеница мягкая 'Энита').

Как видно из рисунка 4 наличие амплификации наблюдается только у линий с наличием хроматина ржи. При этом наличие цитоплазмы ржи не оказывает никакого влияния на амплификацию. При анализе селекционных линий тритикале с использованием этого маркера была выявлена линия, предполагаемый октаплоидный амфидиплоид АД-4, с наличием амплификации по этому маркеру, однако, фенотипически являющаяся мягкой пшеницей. Молекулярно-цитогенетический анализ показал, что

предполагаемый октаплоидный амфидиплоид АД-4 имел в своем генотипе 42 пшеничные хромосомы, при этом одна пара хромосом после геномной гибридизации *in situ* показала гибридизацию с меткой на рожь в субтеломерном участке (рис. 5).

Эти данные позволяют отнести АД-4 к мягким пшеницам ($2n=42$), при этом пара хромосом её в субтеломерном регионе несёт интрогрессию генетического материала ржи. Это и обуславливает амплификацию рожь-специфичного маркера (RYE). Таким образом, на примере линии АД-4 можно видеть, что наличие амплификации рожь-специфичного маркера и маркеров на D-геном совсем не обязательно могут следовать о том, что данная форма является октаплоидной тритикале. То есть использование только молекулярных маркеров без цитогенетических оценок может привести к получению ложных результатов.

Таким образом, рожь-специфичный маркер (RYE) можно использовать для выявления истинных аллоцитоплазматических линий пшеницы с цитоплазмой ржи, не несущих в своем геноме интрогрессий хроматина ржи, а также для быстрого скрининга линий и гибридов пшеницы на наличие хроматина ржи.

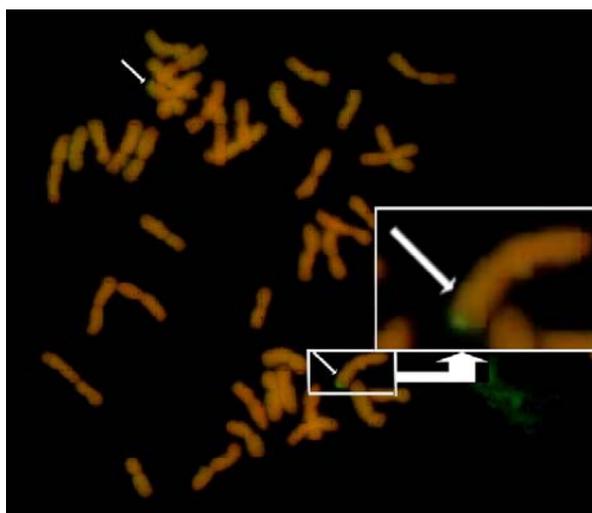


Рис. 5. Геномная *in situ* гибридизация линии пшеницы АД-4 (Генетический материал ржи имеет желтый цвет, пшеницы – красный).

Разработанная нами методика скрининга, основанная на совместном использовании дифференциального окрашивания хромосом, геномной гибридизации *in situ* и анализа с использованием молекулярных ДНК маркеров, позволяет проводить эффективное выявление замещений и межгеномных транслокаций у тритикале и пшеницы.

1.3. КОНВЕРТИРОВАНИЕ ДНК-МАРКЕРОВ В МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ НА ПРИМЕРЕ КАПУСТНЫХ, ХМЕЛЯ И ТОМАТА.

1.3.1. Молекулярно-цитогенетическое маркирование генома В капустных с использованием геном-специфичного ДНК маркера. На растениях с относительно небольшим содержанием ДНК на геном,

применение геномной гибридизации *in situ* во многих случаях затруднено. Это, прежде всего, связано с относительно низким количеством видоспецифичных повторяющихся последовательностей ДНК в сравнении с крупными геномами. Применение геном-специфичных повторяющихся последовательностей ДНК для FISH-анализа может помочь в преодолении этой проблемы.

Ранее Панкиным с соавторами (2006) была клонирована высокоповторяющаяся последовательность GenBR1, специфичная для генома В капустных. С использованием флуоресцентной гибридизации *in situ* эта последовательность нами была локализована на хромосомных препаратах видов с различным геномным составом. В результате было выявлено, что эта последовательность локализуется в прицентромерных регионах всех хромосом генома В (рис.6). Таким образом эта последовательность может служить не только молекулярным, но и цитогенетическим маркером генома В капустных.

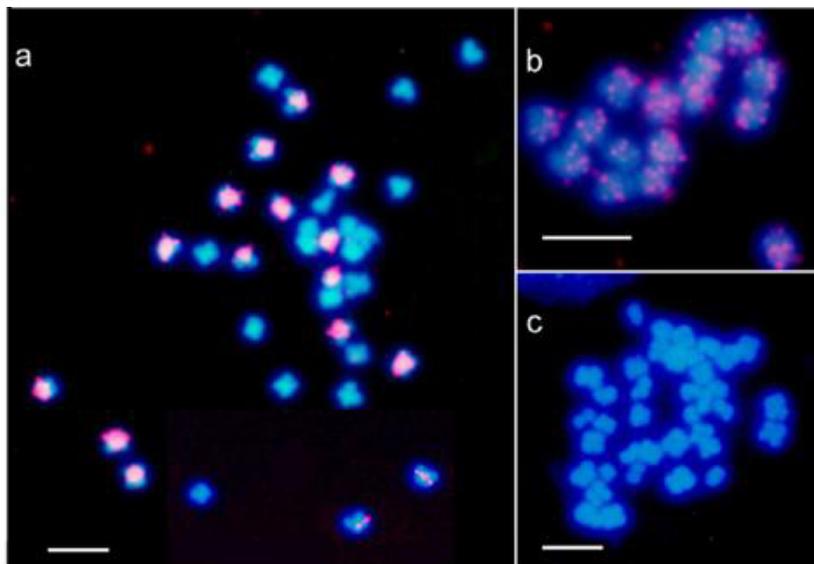


Рис.6. Флуоресцентная гибридизация *in situ* маркера GenBR-1 на метафазных пластинках трех видов *Brassica* а. *B.carinata* CGN04035, б. *B.nigra* CGN06639, в. *B.napus* TAA02.

1.3.2. Хромосом-специфичные маркеры на примере половых хромосом хмеля. Хмель обыкновенный (*H. lupulus*) имеет 20 хромосом и характеризуется XX/XY-системой половых хромосом. Отличия в структурной организации между половыми хромосомами и аутосомами могут быть установлены при их цитогенетическом изучении. Механизм их эволюционного формирования и структурно-молекулярные различия к настоящему времени остаются мало изученными. В нашем исследовании было проведено кариотипирование мужских и женских растений хмеля с использованием методов молекулярной цитогенетики. На первом этапе были использованы цитогенетические маркеры на основе последовательностей рибосомальных генов и дифференциального DAPI-окрашивания (Рис.7). В результате использования последовательностей рибосомальных генов были четко идентифицированы три из десяти хромосом. Между мужскими и

женскими генотипами различий по этим хромосомам не наблюдалось. При наложении результатов с результатами DAPI-окрашивания удалось идентифицировать половые хромосомы. При этом X хромосома, в отличие от других хромосом, имела DAPI положительный бэнд в перичентромерной области (Рис.7). Однако, воспроизводимость такого метода окрашивания не высока.

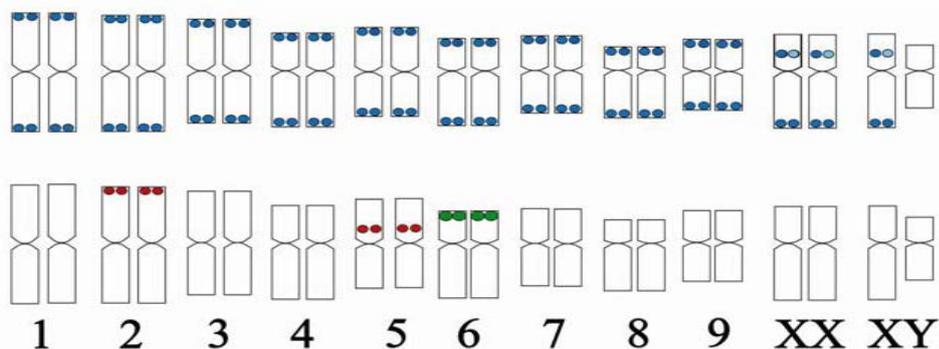


Рис.7. Идиограмма кариотипа мужских и женских растений хмеля обыкновенного. (Верняя часть – DAPI окрашивание, нижняя – FISH маркеры).

Для создания надежного цитогенетического маркера половых хромосом хмеля нами было проведено клонирование и изучение высокоповторяющейся субтеломерной последовательности ДНК хмеля обыкновенного. В результате рестрикционного анализа геномной ДНК хмеля была выделена, клонирована и локализована на хромосомах повторяющаяся последовательность ДНК размером 380 п.о. Эта последовательность является надежным цитогенетическим маркером половых хромосом хмеля (Рис.8).

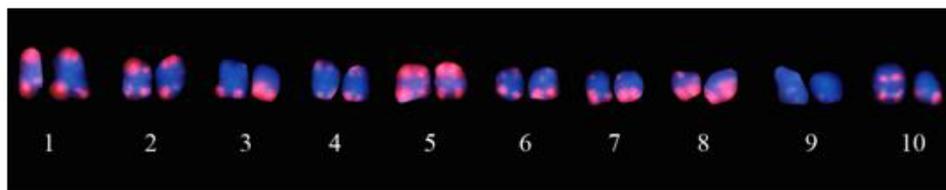


Рис.8. Кариограмма хмеля обыкновенного (1-9 - аутосомы, 10 - половые хромосомы (X - слева и Y - справа))

1.3.3. Повторяющиеся последовательности как молекулярно-цитогенетические маркеры для изучения их хромосомной организации. Повторяющиеся последовательности ДНК занимают до 90 и более процентов генома растений. Они группируются в кластеры тандемно организованных последовательностей ДНК или диспергированы по всему геному. Значительная часть диспергированных повторов представляют собой мобильные генетические элементы. Информация о локализации ретротранспозонов на хромосомах позволит судить о том, какая часть генома может быть замаркирована с помощью молекулярных маркеров, полученных на основе последовательностей ДНК ретротранспозонов.

Нами проведена амплификация пула фрагментов гена обратной транскриптазы *Ty1-copia*-подобных ретротранспозонов томата, тюльпана, лука и ирисов.

С использованием метода флуоресцентной *in situ* гибридизации у растений с крупными геномами (тюльпан, лук, ирисы) нами выявлено относительно равномерное распределение сигнала по всей длине хромосом, за исключением сайтов ядрышкообразующих регионов и тандемноорганизованных последовательностей ДНК. В отличие от вышеуказанных растений при флуоресцентной гибридизации *in situ* ретротранспозонов на пахитенные хромосомы томата выявлена их локализация в перицентромерном гетерохроматине (Рис. 9). Методом Саузерн-гибридизации показана локализация *Ty1-copia* подобных ретротранспозонов в высокометилированных областях генома томата.

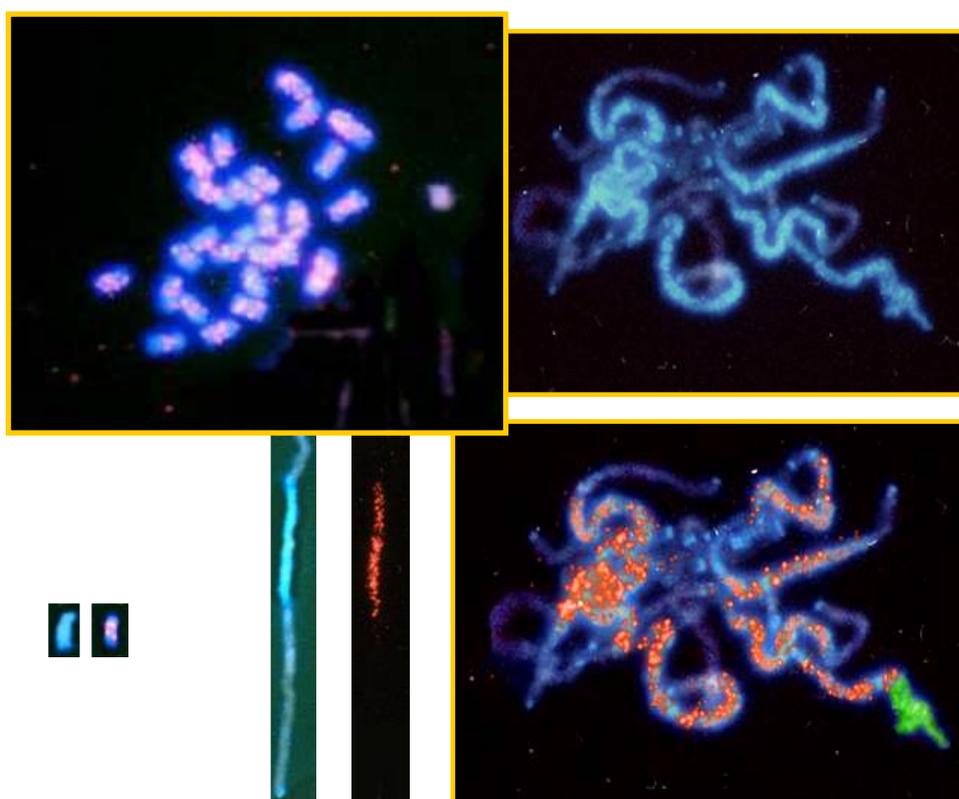


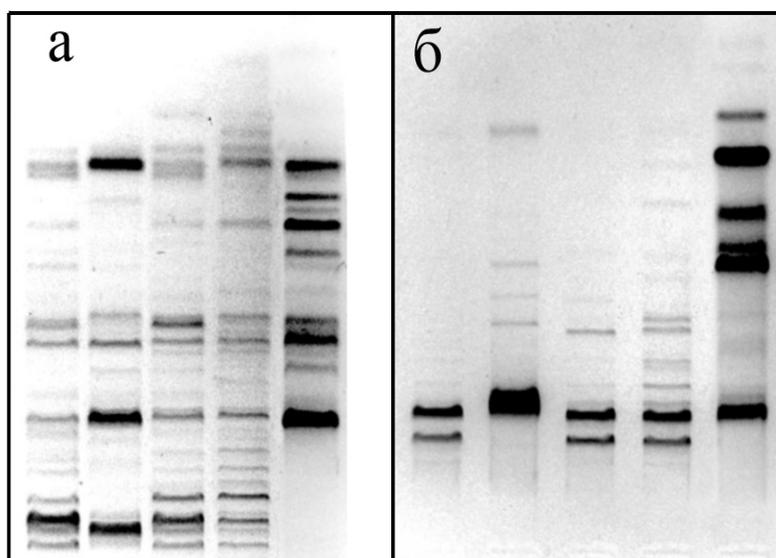
Рис. 9. Результат флуоресцентной *in situ* гибридизации на хромосомы *S. lycopersicum* меченым продуктом реакции ПЦР с вырожденными праймерами на участок обратной транскриптазы ретротранспозона *Ty1-copia* (красный) и 45S рДНК (зеленый). А – сигнал на метафазных хромосомах; Б – пахитенные хромосомы томата; В – сигнал на митотической и пахитенной 6 хромосоме томата; Г – сигнал на пахитенных хромосомах томата

1.4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ГЕНОМОВ РАСТЕНИЙ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА У ОТДАЛЕННЫХ ГИБРИДОВ.

1.4.1. Использование ISSR-PCR. Молекулярно-генетические методы анализа, основанные на проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР), за последние 20 лет стали одними из самых популярных и используются в

настоящее время для изучения многих видов организмов. Они отличаются высокой эффективностью, производительностью, хорошей воспроизводимостью и относительной экономичностью. Позволяют выявлять молекулярные маркеры на хозяйственно-ценные признаки. Все вышеперечисленные достоинства в полной мере относятся к методу ISSR-PCR, основанному на амплификации межмикросателлитных последовательностей геномной ДНК с помощью праймеров, созданных на основе того или иного микросателлита. К достоинствам этого метода можно отнести и его универсальность, возможность использования на различных организмах, в том числе и на видах с мало изученными геномами.

В качестве модельного объекта в этом исследовании был использован томат. Для изучения полиморфизма межмикросателлитных последовательностей ДНК видов рода *Solanum* было использовано 14 ISSR-праймеров. Каждый из 14 праймеров был использован для проведения ISSR-PCR геномной ДНК каждого из пяти видов: *S. cheesmanii*, *S. habrochaites*, *S. humboldtii*, *S. lycopersicum*, *S. pennellii* в трёх повторностях, с трехкратным повторением. С помощью 9 из 14 ISSR-праймеров были получены четкие электрофоретические профили для каждого из пяти видов томата. Пример, полученных профилей с использованием праймеров K13 и K15, представлен на рис.10. При сравнении ISSR-профилей видов томата был выявлен высокий полиморфизм межмикросателлитных последовательностей ДНК



исследованных видов томата. Наибольшее количество ISSR-фрагментов было получено при использовании праймеров K16 и K17, основанных на динуклеотидном повторе [CA], а наименьшее – при использовании праймера K15 – [GT]8YC.

Рис. 10. ISSR-профили пяти видов томата - а-б, справа налево: *S. cheesmanii*, *S. hirsutum*, *S. humboldtii*, *S. lycopersicum*, *S. pennellii*, полученные с использованием двух праймеров: а – K13, б – K15.

Проведение ISSR-PCR с праймером K10 на растении F1 межвидового гибрида *S. lycopersicum* X *S. hirsutum*, позволило получить электрофоретический профиль ISSR-фрагментов геномной ДНК данного гибрида, в котором присутствовали все ISSR-фрагменты, характерные для обеих родительских форм (рис.11). Однако не все ISSR-праймеры обладали

способностью идентифицировать данный гибрид. ISSR-фрагменты, типичные для *S. hirsutum*, не всегда выявлялись в профилях проанализированного гибрида. Также наблюдалось появление фрагментов не свойственных ни для одной из родительских форм.

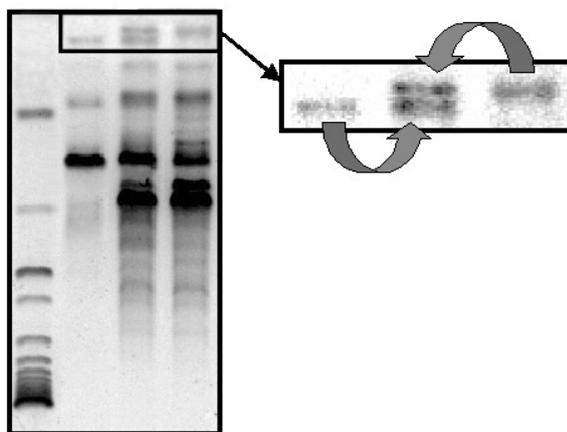


Рис.11. Идентификация межвидового гибрида *S.lycopersicum* (Mo504) X *S. hirsutum* с помощью ISSR-праймера K10. Справа налево: Маркер размеров, *S. hirsutum*, F1 *L. esculentum* (Mo504) X *S. hirsutum*, *S. esculentum* (Mo504).

Таким образом, с помощью ISSR-PCR была выявлена высокая степень полиморфизма межмикросателлитных последовательностей у пяти видов рода *Solanum*, выбранных в качестве объектов исследования в данной работе. Это позволило провести четкое генотипическое маркирование проанализированных видов томата. Так же была проведена идентификация растения, полученного при проведении межвидовой гибридизации *S.lycopersicum* X *S. hirsutum*.

Использование ISSR-PCR для мониторинга интрогрессии чужеродного хроматина на примере линий томата *S.lycopersicum* WSL6 и IL 6-3 с интрогрессиями в хромосоме 6. Для проверки возможности использования метода ISSR-PCR для выявления интрогрессии и создания генетических карт были использованы две линии *S.lycopersicum* WSL6 и IL 6-3 с интрогрессиями в хромосоме 6. Используя карту интрогрессий в хромосоме 6 линий WSL6 и IL 6-3 (Weide et al., 1993), мы смогли провести физическую локализацию 13 ISSR-маркеров на хромосоме 6 *S.lycopersicum* в соответствии с регионами интрогрессий (рис. 12).

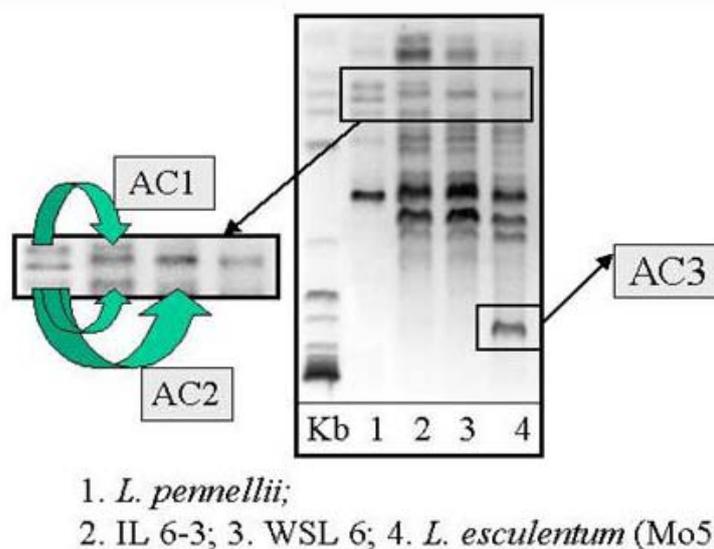


Рис. 12 Физическое картирование ISSR-маркеров на линиях *L. esculentum* WSL6 и IL 6-3 с интрогрессиями

Пять из 13 маркеров расположены в самом протяжённом регионе хромосомы, который соответствует участку интрогрессии линии WSL6, включая короткое плечо, большую часть длинного плеча и исключая только область перекрытия интрогрессии WSL6 с участком интрогрессии IL6-3 (Рис.13). В этой области также локализованы морфологические маркеры *yv* и *m-2*. Четыре маркера расположены в регионе длинного плеча хромосомы 6, который соответствует интрогрессии IL6-3, не включая область его перекрытия с интрогрессией WSL6. В данном участке также расположен ген *gib-1*. Ещё 4 ISSR-маркера локализованы в самой узкой области, которая расположена вокруг морфологического маркера *c* и соответствует участку перекрытия интрогрессий линий WSL6 и IL6-3.

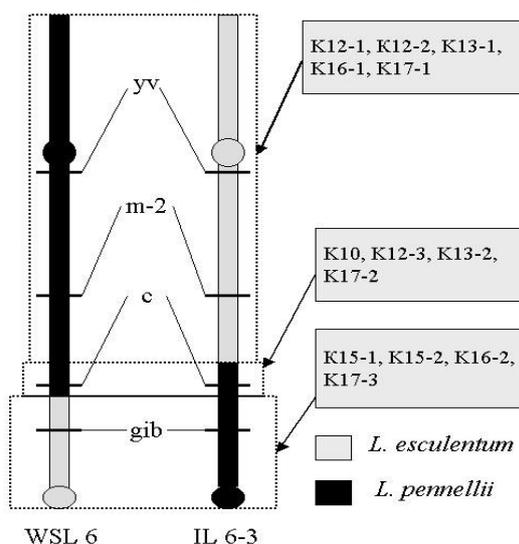


Рис. 13. Физическая карта 6-й хромосомы *S. lycopersicum* с локализованными на ней 13 ISSR-маркерами.

Таким образом, использование карты интрогрессий в хромосоме 6 линий IL6-3 и WSL6 позволило физически локализовать 13 ISSR-

последовательностей на хромосоме 6 томата. 8 из 13 последовательностей потенциально расположены вне прицентромерной области.

Использование ISSR-маркеров для создания интегрированной генетической карты групп сцепления межмикросателлитных последовательностей ДНК томата. Для создания интегрированной карты групп сцепления межмикросателлитных последовательностей ДНК томата нами была проанализирована с помощью ISSR-PCR популяция из 64 растений F₂ межвидового гибрида *S.lycopersicum* X *S. pennellii*, ранее использовавшихся при создании генетической карты, основанной на AFLP маркерах. При этом были использованы праймеры ранее продемонстрировавшие полиморфизм между двумя видами томата. Данные по расщеплению ISSR-маркеров были получены для 14 праймеров. Всего при анализе исследуемо популяции было выявлено 82 ISSR-маркера. Для создания интегрированной генетической карты пригодными из них оказались 48 ISSR-маркеров, которые разделились на 11 групп сцепления, отнесённым к хромосомам 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12. ISSR-маркеров, относящихся к хромосоме 11, выявлено не было (Табл. 2).

Таблица 2

Распределение ISSR-маркеров по хромосомам томата

Хромосомы	ISSR-маркеры
1	K11E1* , K17E2 , K11P2 , K18P1, K24P2, K27P3
2	K12E3 , K19E2 , K27P1, K32P1
3	K11E3 , K12E1 , K18E1 , K27E2 , K18E2 , K18P4, K13P3, K24P3
4	K17E3 , K30E1 , K12P1 , K12P3 , K30E2
5	K15E6 , K13P4 , K24E1 , K26E4 , K17P5
6	K12E4 , K17P1 , K17P3 , K26P2
7	K15E5 , K19E3 , K13P1 , K17P2 , K27P2, K17E1
8	K32E1 , K12P2 , K18P5
9	K10E1, K16E2, K16E4
10	K26E1 , K26E2 , K27E3 , K26P3
11	маркеры не выявлены
12	K15E4

*Жирным шрифтом обозначены маркеры, интегрированные в генетическую карту (рис. 10).

Из 48 ISSR-маркеров, отнесённых к различным группам сцепления, 32 были интегрированы на генетической карте групп сцепления томата относительно уже имеющихся молекулярно-генетических маркеров. 21 маркер показал незначительную степень сцепления, что не позволило отнести их к выявленным группам сцепления и интегрировать в ранее созданную генетическую карту (Рис. 14).

Таким образом, картирование ISSR-маркеров генома томатов показало, что межмикросателлитные последовательности и микросателлиты могут располагаться вне прицентромерной области хромосом томата. Этот результат наряду с тем фактом, что метод ISSR-PCR достаточно прост в использовании и хорошо воспроизводим, свидетельствует о высокой

потенциальной эффективности использования межмикросателлитных маркеров для дальнейшего картирования генома томата и других видов.

Хромосома 3

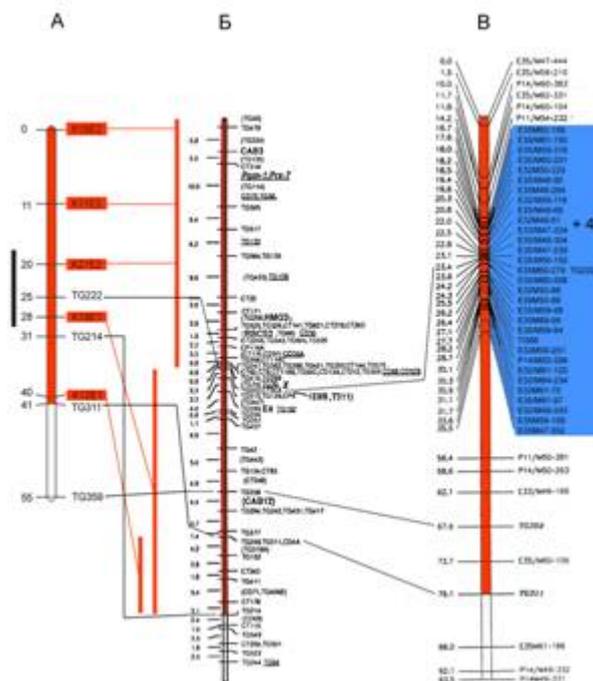


Рис.14 . Пример интегрированной генетической карты по третьей группе сцепления

А – интегрированная генетическая карта групп сцепления межмикросателлитных последовательностей ДНК томата; Б – генетическая карта томата, созданная Tanksley et al. (1992); В – генетическая карта томата созданная Naanstra et al. (1999). Красным цветом на трех картах обозначены области локализации ISSR-маркеров. Синим цветом на карте Naanstra et al. (1999) обозначена область, где AFLP-маркеры располагаются с наибольшей плотностью. Черная вертикальная полоса слева на карте А обозначает приблизительную локализацию прицентромержной области хромосом.

Показанная возможность равномерного покрытия генома томата ISSR-маркерами делает их чрезвычайно привлекательным инструментом для маркирования генов хозяйственно ценных признаков при проведении селекции с помощью маркеров (MAS – Marker Assisted Selection).

2.МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДНК-МАРКЕРЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ И ХАРАКТЕРИСТИКИ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА.

2.1. Межсортовой полиморфизм ISSR-маркеров у хмеля обыкновенного. Структура и организация генома хмеля до настоящего времени мало изучены. Единичные работы посвящены оценке возможности применения некоторых молекулярных маркеров для идентификации сортов хмеля, филогенетических исследований, маркирования пола. Низкий уровень полиморфизма RAPD- и RFLP- маркеров образцов хмеля европейского и североамериканского происхождения выявлен Pillay и Kenny, 1996 и Patzak et al. 1999. В нашей работе проведено исследование межсортового полиморфизма ISSR-маркеров у хмеля обыкновенного. Оценивается возможность применения этого типа маркеров для филогенетических исследований, идентификации сортов хмеля и маркирования хозяйственно-ценных признаков.

Продукты амплификации были получены для 21 из 23 протестированных ISSR-праймеров, 19 праймеров обеспечили амплификацию полиморфных фрагментов ДНК. Их размер варьировал от 120 п.н. до 1900 п.н., а количество (учитывали только хорошо различимые фрагменты) – от 5 до 20 фрагментов на 1 праймер (в среднем 9 фрагментов на 1 праймер). Двадцать один праймер обеспечил амплификацию 183 фрагментов ДНК, из них 106 (57,9%) были полиморфными. Уровень полиморфизма, полученный нами для ISSR-маркеров выше AFLP-полиморфизма выявленного Seefelder et al., 2001 – 43,5% и RAPD-полиморфизма, описанного Sustar-Vozlic и Javornik, 2000 – 38,6%.

Обнаружены ISSR-маркеры, специфичные для отдельных сортообразцов. К 692266 из Японии: праймер K15 – отсутствует фрагмент размером 550 п.н.; K17 – получен фрагмент 250 п.н., отсутствующий у других сортов. Образец из местной популяции Алтая ЧА 89/19: K16 – отсутствуют фрагменты 300 п.н. и 500 п.н. Сорта Михайловский и Аполлон: отсутствуют отрезки размером 250 п.н. (K22) у первого и 450 п.н. (K24A) у второго.

Генетические расстояния и ISSR-группы сортов хмеля. Максимальные значения коэффициентов различия (от 0,45 до 0,53) получены для югославского сорта Аполлон, украинского Сполэчны и российских сортообразцов (Ранний, Чувашский местный, Гуслицкий, Подвязный, Э 88/20, Михайловский, Дружный), японского клона К-692266 и теми же российскими образцами. На основе значений коэффициентов различия был проведен кластерный анализ и построена дендрограмма. Большинство российских сортообразцов, а так же украинский сорт Заклад, Литовский местный и чешский Жатецкий поздний образуют один большой кластер. Европейские сорта, а также небольшая часть российских и украинские сорта образуют второй большой кластер. В нем российские образцы Э 88/20 (Чувашия, образец из местной популяции), Цивильский (НИПТИХ, Чувашия) и Сумерь (РНИСХ) образуют отдельный подкластер. Особняком стоят японский клон К-692266 и образец из местной популяции Алтая ЧА 88/19, которые генетически отдаленны как от российских, так и от европейских сортов. До середины XIX века в России выращивали сорта и сортосмеси хмеля, созданные народной селекцией. К концу XIX века после завоза богемских, баварских и английских сортов хмеля они частично заменили российские. Широко применяли интродукцию иностранных сортов в 70-80-х годах XIX века и на Украине. В результате на хмельниках образовывались смеси отечественных и иностранных сортов. Этим можно объяснить, например то, что полученный в результате клонового отбора из сортосмеси Житомирской области Клон 18, входит в один кластер с европейскими сортами.

Таким образом, в нашей работе выявлен высокий уровень межсортового ISSR-полиморфизма хмеля обыкновенного. Классификация сортов, полученная с помощью ISSR-ПЦР анализа генетического полиморфизма сортов хмеля, отражает существенные генетические различия

между российскими, европейскими и дальневосточными группами сортов, но не согласуется с количественными показателями (средние продолжительность вегетации, масса хмеля с растения, содержание альфа-кислот) исследованных сортов. Данные, полученные в результате ISSR-ПЦР анализа, могут быть использованы в селекционном процессе для классификации и идентификации сортов хмеля, подбора пар для скрещивания с учетом их эколого-географического происхождения.

2.2. Молекулярно-генетические маркеры для исследования генетического разнообразия и маркирования признаков у малины. При выборе метода для молекулярно-генетического анализа малины мы, прежде всего, исходили из того, что структура и организация генома малины мало изучены и, следовательно, необходимо опираться на те методы, которые не требуют предварительного знания о последовательности анализируемой ДНК. Также необходимыми условиями при выборе метода для нас были: простота использования, скорость проведения анализа и низкая стоимость.

Для изучения полиморфизма межмикросателлитных последовательностей ДНК видов и сортов малины было использовано 15 ISSR-праймеров. Продукты амплификации были получены для одиннадцати из пятнадцати протестированных праймеров. Десять праймеров обеспечили амплификацию полиморфных фрагментов.

В целом эффективными оказались только 8 из 15 ISSR- праймеров. С помощью этих восьми праймеров были получены четкие электрофоретические профили для каждого из генотипов малины.

При сравнении ISSR-профилей образцов малины был выявлен высокий полиморфизм межмикросателлитных последовательностей ДНК. С помощью восьми выбранных праймеров оценили генетическое разнообразие видов и сортов малины. Было проанализировано 223 ампликона, из которых полиморфными оказались 202, что составило 90,6 %. В целом выявлено широкое варьирование генетического полиморфизма в зависимости от праймера и группы анализируемых образцов. Всего учитывали 4 группы образцов: виды малины, ремонтантные сорта, обычные сорта и общая группа, объединяющая все сорта и виды. Самый высокий уровень полиморфизма наблюдался в объединенной группе сортов и видов, где он варьировал от 71,4 до 96,8 %, и в среднем составил 89,2%, что можно объяснить тем, что в данной группе наряду с сортами учитывали данные по отдельным видам, которые имели большое количество уникальных фрагментов, специфичных только для данного вида и повышающих общий уровень полиморфизма. Межвидовой полиморфизм колебался в пределах от 66,7 до 94,7 % и в среднем по восьми праймерам составил 82,75 %. Наименьший же уровень полиморфизма наблюдался в группе неремонтантных сортов, где он составил 45,4 % однако, в среднем он составил 74,6 % и был очень близок к среднему уровню полиморфизма ремонтантных сортов – 74,1 %. В целом, как видно из полученных результатов, геном малины отличается высокой степенью полиморфизма межмикросателлитных последовательностей ДНК.

В дендрограмме, построенной на основании результатов, полученных при использовании всех восьми праймеров, наблюдалась четкая кластеризация по группам исследуемых образцов. В частности, выделились все ремонтантные сорта и сорта с летним типом плодоношения, образовав отдельные кластеры. В кластер неремонтантных сортов также попал стародавний сорт Новость Кузьмина, который в наших исследованиях являлся представителем вида малины красной *Rubus idaeus L.*

Молекулярное маркирование признака ремонтантности у малины с использованием ISSR-PCR. При использовании праймера (AC)8YA был обнаружен специфический маркерный фрагмент длиной около 270 п.н., присутствующий во всех 15 исследуемых сортах ремонтантной малины. Можно предположить, что данный фрагмент является маркером признака ремонтантности малины, так как при проведении PCR-анализа сортов малины с обычным неремонтантным типом плодоношения он не амплифицировался (рисунок 15).

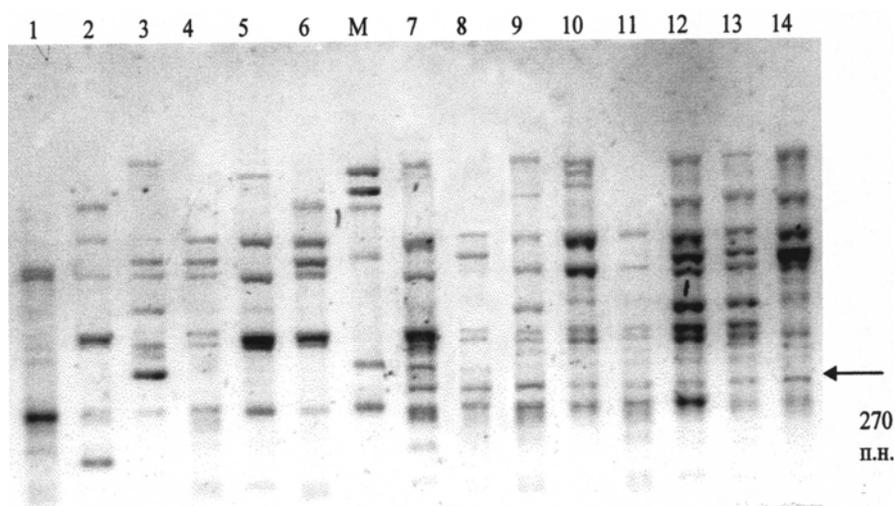


Рис. 15. Молекулярное маркирование ремонтантных сортов малины. Неремонтантные сорта: 1-Новость Кузьмина, 2-Пересвет, 3- Рубин брянский, 4- Брянская, 5- Бальзам, 6- Вольница; Ремонтантные сорта: 7-Элегантная, 8-Надежная, 9-Августина, 10- Заря вечерняя, 11- Абрикосовая, 12-Бабье лето1, 13-Бабье лето2, 14-Геракл, М-маркер размеров (1216,1045, 926,632,313,241).

2.3. Молекулярно-генетические маркеры для исследования генетического разнообразия и маркирования признаков у огурца.

2.3.1. ISSR полиморфизм. Уровень ISSR полиморфизма был изучен на двух сортах, двух коммерческих гибридах F1 и 14 селекционных линиях различного происхождения. Четырнадцать из 19 использованных праймеров выявили различный уровень полиморфизма, который варьировал от 10 до 80%. Несмотря на высокий полиморфизм применение этого метода для маркирования устойчивости огурца к мучнистой росе не выявил маркеров этого признака.

Таким образом, мы изучили полиморфизм межмикросателлитных последовательностей геномной ДНК видов, сортов и линий рода

Lycopersicon, *Humulus*, *Cucumber* и *Rubus* с помощью ISSR-PCR. Метод ISSR-PCR, который позволяет амплифицировать последовательности ДНК расположенные между соседними повторяющимися последовательностями ДНК – микросателлитами, показал себя как простой, эффективный и надёжный метод изучения полиморфизма генома томатов. Проведение экспериментов в ходе исследования часто было разорвано по времени, при этом использовались разные партии реактивов. В таких условиях метод ISSR-PCR проявил высокую воспроизводимость результатов, что является одним из важнейших критериев, определяющих эффективность различных молекулярно-генетических методов. Как и RAPD-PCR, ISSR-PCR не требует знания нуклеотидной последовательности ДНК для создания праймеров, что является преимуществом этих методов молекулярного маркирования. Однако, ISSR-PCR проявляет более высокую воспроизводимость по сравнению с RAPD-PCR. Это связано с тем, что ISSR-праймеры могут быть использованы при гораздо более высоких температурах отжига в ходе амплификации, чем достигается высокая специфичность реакции (Kojima et al., 1998). Кроме того, ISSR-PCR позволяет получить комбинированные фрагменты ДНК, которые состоят из универсальной части, соответствующей какому-либо микросателлиту, и специфической межмикросателлитной последовательности. Данные, полученные с помощью ISSR-PCR, могут отражать как полиморфизм межмикросателлитных последовательностей, так и особенности организации в геномах изучаемых растений самих микросателлитов.

2.4. Анализ гомологов генов устойчивости к фитопатогенам.

Наиболее актуальным на сегодняшний день является создание сортов и линий растений с генетической устойчивостью к фитопатогенам. К настоящему времени клонировано ряд генов устойчивости, проведена их молекулярная характеристика и выявлены их консервативные области (Feuillet et al., 2003, Wisser et al., 2005). Таким образом, с помощью амплификации с праймерами на консервативные домены можно клонировать последовательности гомологичные генам устойчивости к фитопатогенам

2.4.1. Огурец. Нами было использовано 10 пар праймеров на различные домены генов устойчивости. В результате была получена амплификация полиморфизм фрагментов различной длины, хорошо разделяемых в полиакриламидном геле. Полученный полиморфизм был использован для маркирования устойчивости огурца к мучнистой росе. При использовании изогенных линий был получен фрагмент, который маркировал этот признак (Рис. 16).

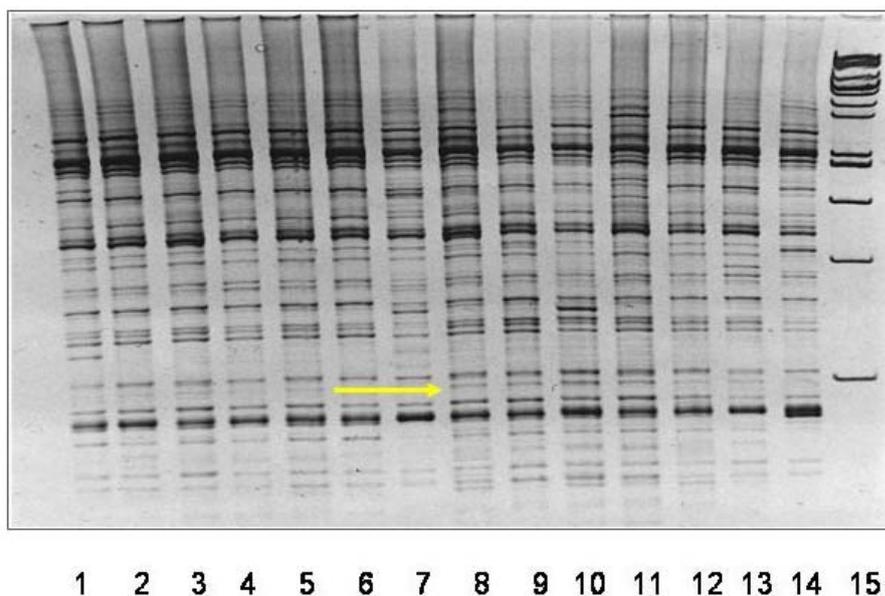


Рис.16. Электрофоретические профили образцов огурца при использовании пары праймеров XLLR. 1-4 – устойчивые образцы; 5 – 8 – образцы с промежуточной устойчивостью; 9 - 12 – неустойчивые образцы; 13 – устойчивый родитель; 14 – неустойчивый родитель; 15 – маркер.

2.4.2. Подсолнечник. С использованием комбинаций вырожденных праймеров, созданных на основе консервативных NBS - доменов генов устойчивости, нами проведена амплификация и последующее клонирование фрагментов аналогов генов устойчивости подсолнечника *Helianthus argophyllus*. Сиквенсы клонированных ПЦР - продуктов различались между собой и имели сродство к отрезкам NBS - доменов уже известных генов устойчивости и аналогов генов устойчивости растений, относящиеся к разным классам. Наибольшее сходство выявлено с участками NBS - доменов культурного подсолнечника и других представителей семейства сложноцветных. Два клонированных фрагмента имеют открытую рамку считывания, остальные последовательности имеют стоп-кодона, являясь, по-видимому, псевдогенами. Проанализированные аминокислотные последовательности *Helianthus argophyllus* включают в себя консервативные участки, свойственные NBS домену продуктов генов устойчивости.

Таким образом, наличие полиморфизма между гомологами генов устойчивости может быть использовано при создании молекулярно-генетических маркеров.

3. РАЗРАБОТКА И СОЗДАНИЕ ДНК МАРКЕРОВ НА ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫЕ ПРИЗНАКИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА И УСКОРЕНИЯ СЕЛЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА.

3.1. Маркеры, связанные с цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС). ЦМС растений широко используется в сельском хозяйстве при производстве гибридных семян. Она позволяет устранить

затраты, связанные с ручной кастрацией, и тем самым снизить себестоимость семян. Растения с ЦМС образуют стерильную пыльцу, которая не способна к оплодотворению. Это явление известно у многих сельскохозяйственных культур. ЦМС является результатом взаимодействия цитоплазматических и ядерных компонентов. Многочисленные исследования сосредоточены на различиях в митохондриальных геномах между линиями с ЦМС и их линиями закрепителями. Однако высокая степень полиморфизма митохондриального генома между линией с ЦМС и ее закрепителями не позволяет идентифицировать митохондриальные факторы, контролирующие мужскую стерильность.

3.1.1. Рис (*Oryza sativa*). Геномную ДНК ЦМС линий (А линий) и их линий закрепителя (В линий) риса использовали в качестве матрицы для ПЦР анализа.

Аmplification mitochondrial DNA RAPD-method. Для выявления полиморфизма митохондриальной ДНК между ЦМС линиями и их закрепителями ЦМС использовали RAPD метод с применением 34 RAPD-праймеров (Operon Technology, USA). Геномную ДНК ЦМС линии Neda-A (А линии) и ее линии закрепителя Neda-B (В линии) использовали в качестве матрицы для ПЦР с RAPD-праймерами. В RAPD - анализе, 30 из 34 праймеров воспроизводимо амплифицировали ДНК, среди которых четыре выявили полиморфизм между линией ЦМС Neda-A и ее фертильным аналогом закрепителем Neda-B. Праймеры OPA09, OPA14, OPC02 и OPC05, с высокой воспроизводимостью выявляли полиморфные фрагменты между двумя изогенными линиями. OPA09 и OPA14 амплифицировали специфичные фрагменты для стерильной линии, длиной ~200 п.н и ~800 п.н., соответственно. Для идентификации RAPD маркеров и их ассоциации с цитоплазматической мужской стерильностью, ДНК 4-х стерильных линий и их линий закрепителей была амплифицирована с 4 идентифицированными полиморфными RAPD праймерами. Только один RAPD- праймер (OPC05) амплифицировал фрагмент, размером ~500 п.н, специфичный для всех 4-х линий ЦМС (рис.17).

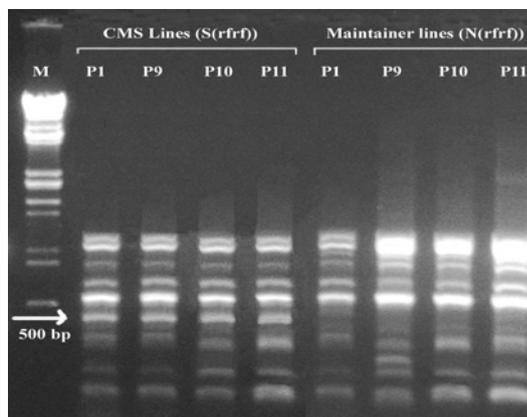


Рис. 17. ПЦР амплификация RAPD-праймером OPC05. P1: Neda-A и B; P9: IR67017-180-2-1-2-A и B; P10: Usen-A и B; P11: IR68897-A и B. Стрелками показан полиморфный бэнд.

При амплификации ДНК 4-х ЦМС линий и линий закрепителей с использованием комбинации RAPD-праймеров серии А (ОРА01-04) и серии В (ОРВ02-04), всего 12 пар, праймеры ОРА01-ОРВ04 выявили полиморфизм между ЦМС линиями и линиями закрепителями. С комбинацией праймеров ОРА01-ОРВ04 амплифицировался полиморфный фрагмент размером ~370 п.н., специфичный для ЦМС линий (рис. 18).

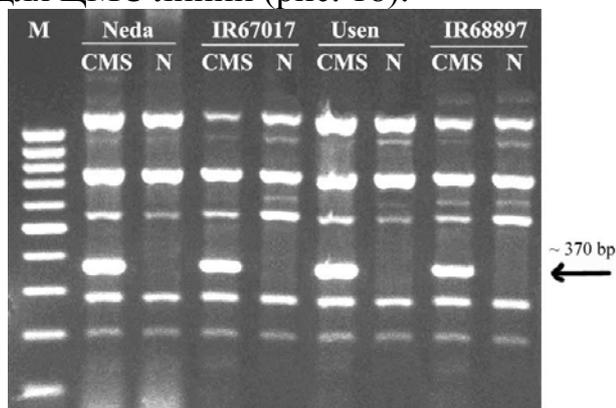


Рис. 18. ПЦР с комбинацией RAPD-праймеров ОРА01-ОРВ04

Эти результаты отражают различие в цитоплазматическом геноме линий с ЦМС и их закрепителей. Обнаруженные RAPD-маркеры могут использоваться для создания линий с ЦМС в селекционных программах гибридного риса, а также в оценке чистоты семян.

SCAR маркеры ЦМС. Для идентификации молекулярных маркеров, различающих генотипы ЦМС линий и линий закрепителей, были разработаны 2 специфичных праймера (SCARmt01F и R) на основе митохондриальной последовательности AY187000 от линий "Zhenshan 97-A" и 2 специфичных праймера (SCARmt02F и R) на основе митохондриальной последовательности AY181205 от линий "Zhenshan 97-B", соответственно (Yang et al., 2002). Одна пара специфичных праймеров SCARmt01F и R при ПЦР дала ко-доминантные фрагменты, различающие генотипы ЦМС линии и линии закрепителя (рис. 17). Амплифицируемый фрагмент у всех линий закрепителей был немного длиннее, чем у ЦМС линий.



Рис. 17. Образцы ПЦР - амплификации праймером SCARmt01. S- ЦМС. N- закрепитель

Результаты секвенирования показали, что фрагмент ДНК у линии закрепителя (IR68897-B) на 6-7 п.н. длиннее, чем у ЦМС линий. Сравнение

секвенированной последовательности локуса SCARmt01 у ЦМС линии “Neda-A” с последовательностями ДНК базы данных ГенБанк показало, что данная последовательность почти полностью (96%) гомологична участку митохондриальной последовательности риса линии 93-11 (подвида *indica*) и линии Nirponbare (подвида *japonica*).

Выявление молекулярных маркеров генов восстановления фертильности риса. С целью выявления полиморфных молекулярных маркеров, сцепленных с *Rf*-генами, первоначально была проведена ПЦР - амплификация ДНК восьми генотипов (Neda-A, IR24, IR28, IR36, IR62030, IR60966, Amol1 и Amol2) с использованием 2-х SSR-праймеров, имеющих сцепление с *Rf3* и *Rf4* генами. SSR маркер RM1 имеет сцепление с *Rf3* геном на коротком плече 1-ой хромосомы (He et al., 2002), а RM171 с *Rf4* на длинном плече 10-ой хромосомы (Jing et. al, 2001). Оба праймера детектировали полиморфизм между ЦМС линией (Neda-A) и 7 фертильными линиями. Для проведения первоначального анализа, индивидуальные растения F₂ разделяли на две группы, состоящие из десяти растений каждая (BSA- анализ). При этом, группы растений различаются между собой по аллелям исследуемого гена, распределение же остальных признаков в пределах группы - случайное. Результат этого первоначального тестирования показал, что SSR- маркер RM1 в популяциях Neda-A/IR36 и Neda-A/IR60966, сцеплен с *Rf3* геном на коротком плече 1-ой хромосомы, а RM171- с *Rf4* в популяциях Neda-A/IR24, Neda-A/IR28, Neda-A/Amol1 и Neda-A/Amol2 на длинном плече 10-ой хромосомы.

Высокоразрешающее картирование региона гена *Rf4*. Так как *Rf4* ген был картирован между двумя маркерами RM171 и RM304, нами выбраны дополнительные SSR- маркеры на генетической карте риса [McCouch et al., 2002] и разработаны новые праймеры на основе последовательностей EST- и RFLP-маркеров в этом регионе. Праймеры (SPRFA01-03), созданные на основе последовательности ранее клонированного гена *Rf1A*, не выявляли полиморфизма между родительскими линиями даже после рестрикции с 14 рестриктазами (CAPS-маркеры). Кроме того, два других RFLP- маркера (S10019 и S12564) не обнаруживали полиморфизм между двумя родительскими линиями. BSA-анализ показал, что один SSR маркер, RM6737, находится в этом регионе и был тесно сцеплен с *Rf4* геном на расстоянии 1.6 сМ. Кроме вышеупомянутых маркеров, два разработанных нами праймера на основе последовательности AB110443 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), AB443 F и R, амплифицировали два полиморфных фрагмента ДНК, специфичных для стерильной линии, размерами ~400 и ~500 п.н., соответственно. Они были тесно сцеплены с рецессивным *rf4*-аллелем (рис. 18) на расстоянии ~0.5 и 1.03 сМ, соответственно. Эти два маркера локализованы на теломерной стороне между RM171 и геном *Rf4*.

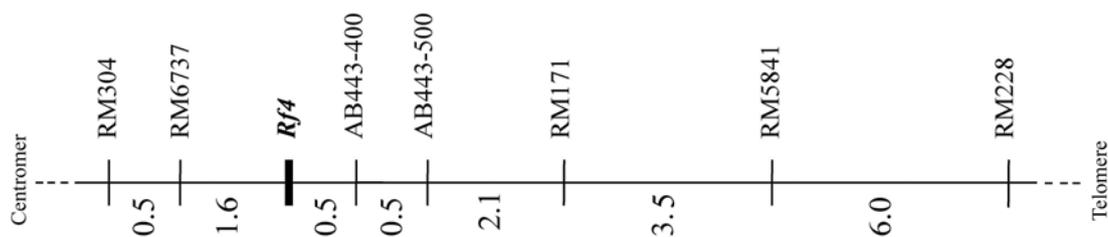


Рис. 18. Высокорастворяющее картирование *Rf4* гена на длинном плече 10-ой хромосомы риса

Физическая локализация гена *Rf4*. Для определения физической локализации *Rf4*- гена и сцепленных с ним маркеров использовали программу BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Genome/PlantBlast.shtml?5>) в базе данных геномной последовательности ДНК сорта 93-11 (<http://rise.genomics.org.cn/rice/index2.jsp>). Этот поиск дал возможность идентификации контигов, несущих сцепленные с *Rf4* маркеры, от SSR-маркера RM6737 на одной стороне (центромерной) до маркера AB443 на другой (теломерной). Сравнение последовательностей праймеров SSR-маркера RM6737 и праймеров AB443 с последовательностью ДНК сорта 93-11 показало, что последовательности праймеров RM6737 находятся в контиге Ctg030205, а последовательности праймеров AB443 - в Ctg030228. Физическая карта, построенная на основе этих данных состояла из 15 контигов, охватывая ~206 т.п.н подвида *indica* риса.

Так как общей характерной особенностью *Rf*-генов растений является кодирование пентатрикопептидного (PPR) белка, имеющего в своём N-конце последовательность, необходимую для транспорта в митохондрию [Bentolila et al., 2002; Akagi et al., 2004], этот регион был проанализирован на наличие таких генов программами MitoProt II ([http:// ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html](http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html)) и Pfam 11.0 ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)). Результаты этого анализа показали, что среди ~45 генов в этом регионе, только пять генов, включая OsIFCC036677, OsIFCC036680, OsIFCC036693, OsIFCC036694 и OsIFCC036695 на контигах Ctg30207, Ctg30216, Ctg30225, Ctg30225 и Ctg30227, соответственно, удовлетворяли критериям характерным для *Rf*-генов (рис. 19).

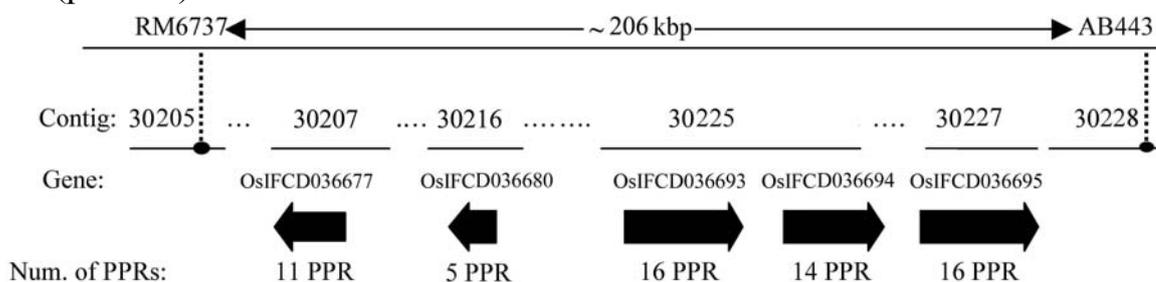


Рис. 19. Структура фрагмента ДНК, несущего маркеры, сцепленные с *Rf4*- геном на 10-ой хромосоме подвида риса *indica*

В нашем исследовании молекулярные маркеры, сцепленные с геном восстановления фертильности ЦМС WA-типа риса, были успешно

идентифицированы и картированы на длинном плече 10-ой хромосомы с использованием SSR-маркеров и разработанных нами праймеров в комбинации с BSA-анализом. Сравнение разных молекулярных карт сцепления маркеров показывает, что три гена восстановления фертильности 3-х ЦМС-типов (BT, HL и WA) тесно сцеплены на длинном плече 10-ой хромосомы риса. Однако, как показано в нашей работе, три пары праймеров, разработанные на основе последовательности гена *RflA* не выявили полиморфизм между исходными родителями даже после обработки с 14 рестриктазами. Поскольку данный ген является функциональным для ЦМС BT-типа, т. е. линии, несущие *RflA* восстанавливают фертильность ЦМС BT, а не ЦМС WA (например, линия MTC-10R, несущая данный ген, восстанавливает фертильность только для ЦМС BT; [Akagi et al., 2004]), можно отметить, что ген восстановления фертильности ЦМС WA отличается от гена *RflA*.

3.1.2. ДНК-маркеры для изучения ЦМС у Brassica.

Для исследований были взяты фертильные и стерильные растения капусты пекинской *B. pekinensis* (Lour.) Rupr., капусты абиссинской (горчицы эфиопской) *B. carinata* A. Braun, турнепса *B. rapa* L. var. *rapa* (L.) Thell., капусты цветной *B. oleracea* convar. *botrytis* (L.) Alef. var. *botrytis* L., капусты белокочанной *B. oleracea* L. convar. *capitata* L. Alef. var. *capitata* L. f. *alba* DC, горчицы сарептской *B. juncea* (L.) Czern., брюквы *B. napus* L. var. *napobrassica* (L.) Rchb., редиса *Raphanus sativus* L. var. *radicula* Pers., рапса *B. napus* L. ssp. *oleifera* (Metzg.) Sinsk. В опыте использовались стерильные растения как с типом ЦМС ogura, так и с неизвестным типом. Для изучения молекулярной структуры митохондриальной ДНК фертильных и стерильных форм растений использовался метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). На основании литературных данных о нуклеотидных последовательностях, специфичных для того или иного типа ЦМС, были синтезированы 12 пар праймеров. Для ПЦР анализа на тип ЦМС Ogura использовали семь пар праймеров, специфичных на данный тип стерильности – Og1 и Og2, ogu-5' и ogu-3', orf138-5' и orf138-3', orf138-F1 и orf138-R, orf138-F2 и orfB-R1, orfB-F и orfB-R2, TRNAFM-F и TRNAFM-R (Motegi et al., 2003; Giancola et al., 2007). При проведении ПЦР с этими праймерами амплифицировались фрагменты ДНК ожидаемых размеров. В результате было выявлено, что у образца с неизвестным типом ЦМС, спонтанно возникшей в результате межвидовой гибридизации, амплифицируется ДНК только с праймерами на Ogura тип ЦМС. Клонирование и секвенирование, полученных продуктов подтвердило их полную гомологию с митохондриальной ДНК специфичной для Ogura типа ЦМС.

3.2. Создание ДНК маркеров генов устойчивости на основе данных сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей устойчивых и неустойчивых генотипов.

Наиболее эффективными молекулярными маркерами являются те,

которые основаны на характерных особенностях нуклеотидных последовательностей самих генов устойчивости. Для разработки таких ДНК-маркеров необходимо выявить различия в структуре локусов генов устойчивости у устойчивых и чувствительных к фитопатогену генотипов. Сравнительный анализ и изучение организации кластеров и локусов генов устойчивости у устойчивых и неустойчивых генотипов в пределах одного вида проливает свет на эволюцию формирования устойчивости к различным фитопатогенам. Информация о структуре локусов у неустойчивых форм растений, аналогичных таковым у устойчивых генотипов, дополнит наши знания о строении и функциях доменов, свойственных генам устойчивости. В нашем исследовании был проведен анализ нуклеотидных последовательностей генов, входящих в состав *I2* и *Ve*, у неустойчивых форм томата.

3.2.1. Создание ДНК маркера на основе данных анализа локуса *I2* у устойчивых и неустойчивых генотипов томата.

Для сравнительного анализа локуса *I2* у устойчивых и неустойчивых к фузариозу генотипов томата были использованы два праймера UP78 и LF79. Праймеры были синтезированы на основании нуклеотидной последовательности ранее клонированного гена *I2C-2* (Ori N. et al., 1997). При проведении ПЦР с данными праймерами синтезировались ПЦР-продукты размером около 1100 п.н. Причем фрагменты одинакового размера синтезировались как на устойчивых, так и на неустойчивых генотипах. Для выявления полиморфизма между устойчивыми и неустойчивыми к фузариозу генотипами томата, ампликон был обработан рестриктазами. При гидролизе ПЦР-продукта рестриктазой *Acc I* были выявлены отличия между устойчивыми и неустойчивыми генотипами. При анализе рестрикционной картины было выявлено, что сумма размеров рестрикционных фрагментов у устойчивого генотипа значительно превышает размер ПЦР-продукта до рестрикции. Нами было сделано предположение, что с помощью данной пары праймеров синтезируются ПЦР-продукты с нескольких генов-гомологов, входящих в состав кластера *I2*, и каждый из них имеет свои сайты рестрикции для рестриктазы *Acc I*. Важно отметить, что структура локуса *I2* у устойчивых генотипов достаточно хорошо изучена, и данный локус перенесен в *S. lycopersicum* из дикого вида *S. pimpinellifolium* (Segal et al., 1992; Ori N. et al., 1997; Simons et al., 1998; Sela-Buurlage et al. 2001; Couch, 2006). С другой стороны, структура аналогичного локуса у *S. lycopersicum* не изучена, и остается неизвестным, какие гены-гомологи входят в его состав у неустойчивых генотипов. Анализ клонированных ПЦР-продуктов показал, что с праймерами UP78-LF79 на гомозиготных устойчивых растениях синтезируются два гена гомолога из локуса *I2*. Один из гомологов имеет два сайта рестрикции для рестриктазы *Acc I*, а второй не имеет сайтов рестрикции для этой рестриктазы. Секвенирование показало, что один из клонированных генов-гомологов имеет высокую степень гомологии к ранее изученному гену *I2C-5* (Simons, G. et al., 1998), входящему в состав локуса *I2* *S. pimpinellifolium* и, также как и ген *I2C-5*, не имеет сайта рестрикции *Acc I* в

исследованном регионе. Второй клонированный ген-гомолог хотя и имеет высокую степень идентичности к ранее клонированным генам из локуса *I2*, является уникальным по наличию одного сайта рестрикции *Acc I*, а также по его положению. Ни один из ранее изученных генов-гомологов локуса *I2* не имел сайта рестрикции в положении, характерном для клонированного нами участка ДНК из локуса, аналогичного *I2*.

Таким образом, нами впервые было показано, что в состав локуса *I2* у *S. lycopersicum* входит, по меньшей мере, два гена-гомолога. Один из них имеет высокую степень сродства к ранее клонированному гену *I2C-5*, и, возможно, данный ген входит в состав кластера у неустойчивой формы. Второй клонированный нами фрагмент ДНК является ранее неизвестной, уникальной последовательностью ДНК, входящей в состав локуса *I2*.

На основании обнаруженных различий в строении локуса *I2* у устойчивых и неустойчивых генотипов томата, нами был разработан ДНК-маркер устойчивости томатов ко 2-й расе фузариоза. Созданный ДНК-маркер является кодоминантным, т.е. позволяет выявлять скрытых носителей неустойчивого аллеля – гетерозиготные по данному признаку генотипы. Еще одной важной особенностью предложенного нами маркера является то, что маркерная последовательность находится внутри локуса *I2*. Таким образом, исключается несцепленное наследование ДНК-маркера и признака.

3.2.2. Создание ДНК маркера на основе данных анализа локуса *Ve* у устойчивых и неустойчивых генотипов томата.

Для сравнительного анализа локуса *Ve* у устойчивых и неустойчивых форм томата, нами были синтезированы две пары праймеров (*VVF1+VVR1*; *VVF2+VVR2*), которые позволяют амплифицировать участок гена *Ve1* (Kawchuk, 2001) протяженностью около 1500 п.н. Данный участок расположен в начале гена. В результате ПЦР с синтезированными праймерами и на устойчивых, и на неустойчивых генотипах были получены ампликоны одинакового размера. Таким образом, можно сделать вывод, что у неустойчивых генотипов томата локус в целом присутствует, однако его функциональность нарушена в результате изменений на молекулярном уровне. Так как явных различий между устойчивыми и неустойчивыми генотипами непосредственно после ПЦР выявить не удалось, было проведено клонирование ПЦР-продуктов, полученных на устойчивой и неустойчивой формах томата.

Анализ нуклеотидных последовательностей клонированных участков гена *Ve* показал высокую степень гомологии по данному локусу между устойчивыми и неустойчивыми генотипами томата. Поиск последовательностей с высокой гомологией к клонированным фрагментам в базе данных GenBank дал схожие результаты на устойчивом и неустойчивом к вертициллезу генотипах. Как и ожидалось, была обнаружена высокая степень гомологии к ранее клонированным генам *Ve1* и *Ve2*. Анализ нуклеотидных последовательностей полученных клонов не выявил никаких крупных (делеций, инсерций, дупликаций) различий между локусами *Ve* устойчивых и неустойчивых форм томата. Следующим шагом нашей работы

был поиск полиморфизма по сайтам рестрикции этом локусе между устойчивым и неустойчивым генотипами. Обнаружение такого полиморфизма позволило бы создать молекулярный маркер непосредственно на ген *Ve*. При анализе ПЦР-продукта, полученного с парой праймеров VVF1+VVR1, полиморфизма по сайтам рестрикции между устойчивым и неустойчивым генотипами нами обнаружено не было. ПЦР-продукты, полученные с парой праймеров VVF2+VVR2, были также проверены на полиморфизм по сайтам рестрикции на устойчивых и неустойчивых генотипах. Одна из рестриктаз – *Xba I* – позволила выявить различия между устойчивыми и неустойчивыми к вертициллезу формами томата. Было выявлено, что в регионе, амплифицируемом с помощью указанной пары праймеров, у неустойчивого генотипа имеется один дополнительный сайт рестрикции для рестриктазы *Xba I* по сравнению с устойчивым генотипом. Такой сайт возникает благодаря однонуклеотидной замене в последовательности ДНК, в результате чего появляется новый стоп-кодон.

Таким образом, нами показано, что в локусе *Ve* у неустойчивых генотипов томата (*S. lycopersicum*) находятся последовательности ДНК, имеющие высокую степень гомологии к ранее изученным генам *Ve1* и *Ve2*, расположенным в аналогичном локусе устойчивых форм. В данном регионе нам удалось выявить полиморфизм по сайту рестрикции *Xba I* между устойчивыми и неустойчивыми формами томата. На основании выявленного полиморфизма был создан эффективный кодоминантный ДНК-маркер (Рис.20).

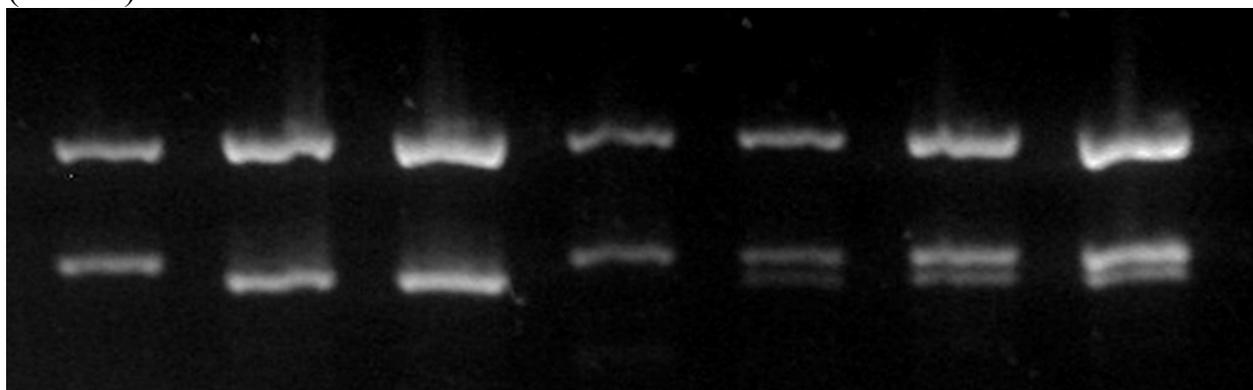


Рис. 20 . Рестрикция ПЦР-продуктов с рестриктазой *Xba I* (1 – Мегана (устойчивый гомозиготный); 2 – Монеумейкер (неустойчивый); 3 – Белый налив (неустойчивый); 4 – Ампаро (устойчивый гомозиготный); 5 – Indiko (гетерозигота); 6 – Durason (гетерозигота); 7 – Pitenza (гетерозигота)).

Примененный нами методологический подход – сравнительный анализ локусов генов устойчивости у устойчивых и неустойчивых к фузариозу и вертициллезу генотипов томата – позволил нам выявить нуклеотидные последовательности новых генов-гомологов у неустойчивых форм томата. Анализ данных локусов у неустойчивых форм томата был проведен впервые. На основании выявленных нами различий между устойчивыми и неустойчивыми генотипами томата по локусам устойчивости

к фузариозу и вертициллезу созданы новые эффективные ДНК-маркеры, а на их основе ДНК-диагностикумы. Эти диагностикумы были испытаны на расщепляющихся популяциях и продемонстрировали высокую эффективность при оценке селекционного материала на наличие генов устойчивости к фитопатогенам. Применение таких диагностикумов позволяет снизить затраты и сократить сроки создания устойчивых форм томата в два раза.

3.3. Использование межмикросателитного полиморфизма для создания ДНК маркеров. Для создания ДНК-маркера на пол хмеля обыкновенного был использован метод анализа межмикросателлитных последовательностей ДНК (ISSR-PCR), который продемонстрировал высокую эффективность в ранее проведенных нами исследованиях на это культуре. Двадцать два ISSR праймера были применены для амплификации ДНК на 53 женских и 33 мужских образцах растений хмеля различного географического происхождения. В результате два праймера после амплификации продемонстрировали специфичные бэнды для мужских растений. Эти бэнды были клонированы и секвенированы. На основе этих сиквенсов были созданы пол-специфичные STS маркеры (Рис. 21).

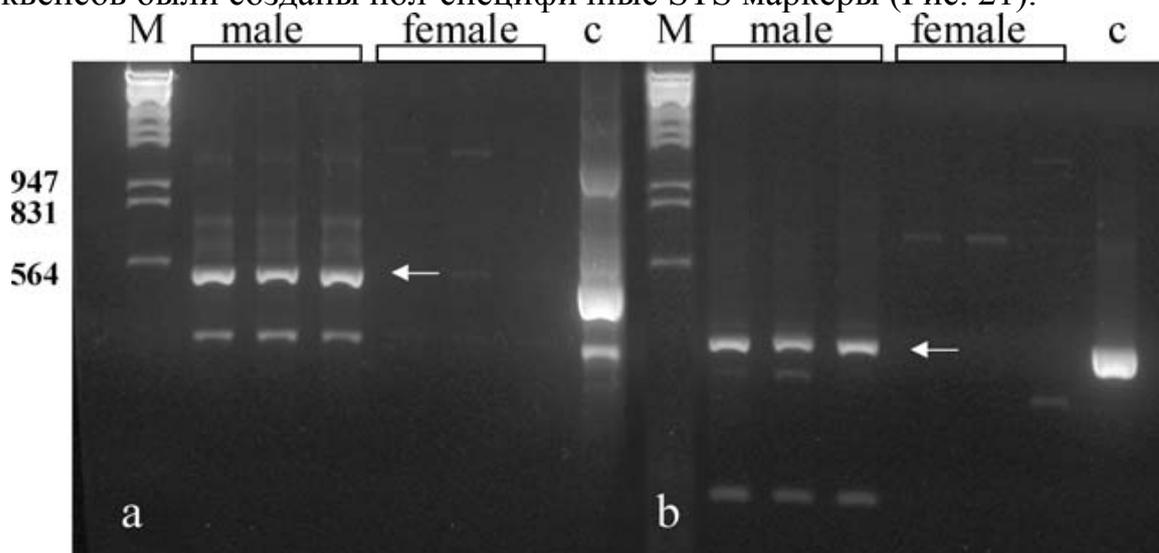


Рис. 21. Результат амплификации STS-маркеров STS-K10 (a) и STS-K22 (b).

4. ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОГО ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК.

Для проведения массового скрининга растительного материала с использованием ДНК-маркеров требуются удобные и высокопроизводительные методики выделения ДНК. Нами были протестированы семь методов выделения ДНК на 8 культурах. В результате часть методик демонстрировала воспроизводимые результаты только на отдельных культурах. В связи с низким содержанием полифенольных соединений и других ингибиторов полимеразной цепной реакции в растительном материале огурца, на этой культуре возможно применение упрощенной методики выделения ДНК, основанной на инкубации материала в слабом растворе щелочи с последующей нейтрализацией его соляной

кислотой. Следует отметить, что на этой культуре амплификацию специфичных продуктов отмечали и при экстракции ДНК кипячением в стерильной воде. Однако в целом для всех культур наилучшие результаты показал экспресс-метод выделения ДНК с наличием в экстракционном буфере SDS.

5. АВТОМАТИЗАЦИЯ АНАЛИЗОВ.

При массовых анализах стадия электрофореза, необходимая для визуализации результатов ПЦР, остается достаточно трудоемкой, занимает до половины времени, необходимого для скрининга популяций, расщепляющихся по маркируемому признаку. Избежать данную стадию, а также автоматизировать детекцию и хранение результатов и предотвратить контаминацию ПЦР-продуктом, позволяет метод флуоресцентного маркирования, основанный на применении молекулярных беконков.

Нами был синтезирован зонд на нуклеотидную последовательность, отсутствующую у неустойчивых форм растений, который используется в комбинации с ранее подобранными праймерами VF+VR (рис. 22). В ходе ПЦР, при наличии устойчивого аллеля, зонд гибридизуется на ДНК-мишени и разрушается Таq-полимеразой, в результате чего флуоресцентная метка освобождается, и мы можем детектировать излучение определенной длины волны.



Рис. 22. Сайты гибридизации праймеров (зеленый) и флуоресцентного зонда (красный) в локусе *Ve* томата.

На рисунке 23 представлены результаты детекции флуоресценции на приборе «Джин». Высокий уровень сигнала по каналу FAM («Специфика») указывает на то, что в исследуемом образце присутствует доминантный аллель гена устойчивости томата к вертициллезу. Уровни сигнала представлены графически в правой части окна программы. Образцы, несущие признак устойчивости к вертициллезному увяданию, отмечаются знаком «+» в колонке «Результат», образцы, чувствительные к заболеванию, отмечаются знаком «НД» («нет детекции») в той же колонке. В качестве фоновых по уровню флуоресценции образцов, используется та же реакционная смесь, что и для других образцов, но без добавления матричной ДНК. Это позволяет избежать ложных результатов, вследствие спонтанного разрушения зонда Таq-полимеразой.

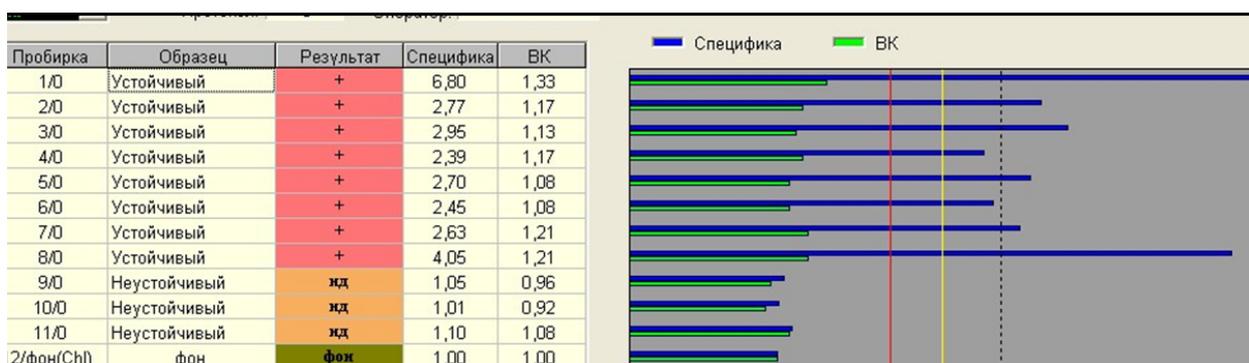


Рис.23. Результаты детекции флуоресценции у устойчивых и неустойчивых к вертициллезу форм томата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Нами продемонстрированы возможности молекулярно-генетических и молекулярно-цитогенетических подходов для создания селекционного материала растений с заданными свойствами. Эффективность применения таких методов зависит от каждого конкретного случая и напрямую связана с возможностью ускорения селекционного процесса. Стратегия применения должна основываться на надежности, эффективности, информативности и взаимодополняемости вышеуказанных подходов, а также базироваться на достижениях в геномике и биоинформатике. При этом в программах с использованием методов отдаленной гибридизации на первых этапах главную роль могут играть современные молекулярно-цитогенетические методы исследований.

ВЫВОДЫ

1. Адаптированная методика геномной *in situ* гибридизации позволяет идентифицировать геномный состав межвидовых гибридов лилий, получаемых с использованием $2n$ -гамет. Установлен механизм формирования $2n$ -гамет основанный на редукции первого деления мейоза (FDR). С использованием разработанного метода многоцветной геномной *in situ* гибридизации для лилий впервые установлена возможность создания трехгеномных гибридов ($2n=36$). Показана возможность преодоления стерильности межвидовых гибридов лилий и получения форм с различным геномным составом при использовании образцов формирующих $2n$ -гаметы.
2. Оптимизированная методика совместного применения дифференциального окрашивания хромосом, геномной гибридизации *in situ* и ДНК-маркирования, позволяет проводить эффективное выявление межгеномных транслокаций у тритикале.
3. Высокоповторяющиеся геномспецифичные последовательности ДНК на примере GenBR-1 (специфичного для генома В) могут быть использованы в качестве молекулярно-цитогенетических маркеров геномов капустных.
4. Высокоповторяющиеся последовательности ДНК *Ty-1-soria*-подобных ретротранспозонов являются эффективными молекулярно-

цитогенетическими маркерами для изучения организации геномов растений. Показано, что у томата ретротранспозоны локализованы в прицентромерных гетерохроматиновых регионах хромосом. Подтверждена эффективность использования пахитенных хромосом томата для такого анализа. Прицентромерная локализация ретротранспозонов указывает на невысокую эффективность ДНК маркеров создаваемых на их основе для маркирования хозяйственно ценных признаков томата. В тоже время для растений с крупными геномами (лилии, крокусы, тюльпаны и лук) показано равномерное распределение *Ty-1-copia*-подобных ретротранспозонов, за исключением С-бэндинг положительных регионов хромосом, где они не выявляются.

5. Клонирована высокоповторяющаяся последовательность ДНК хмеля – размером 378 п.о., которая является эффективным цитогенетическим маркером для идентификации половых хромосом хмеля. С помощью FISH анализа показана субтеломерная локализация этой последовательности на аутосомах. Для X и Y хромосом выявлено характерное распределение сайтов гибридизации. Поиск в геномных базах данных не выявил гомологий с ранее клонированными последовательностями ДНК.
6. Установлено, что последовательности генов рибосомной РНК (45S и 5S) являются эффективными цитогенетическими маркерами для идентификации трех из 10 хромосом хмеля с использованием флуоресцентной гибридизации *in situ*.
7. Выявлен высокий полиморфизм межмикросателлитных последовательностей ДНК (ISSR) на видовом и межвидовом уровнях у видов *Solanum*, *Humulus lupulus* и *Rubus*. Рекомендован набор ISSR праймеров для анализа исходных родительских и гибридных форм при внутри- и межвидовой гибридизации, а также форм растений с различным уровнем интрогрессии генетического материала. На основе выявленного полиморфизма ISSR-маркеров создана интегрированная генетическая карта межмикросателлитных последовательностей ДНК томата и высокоэффективные ДНК-маркеры для выявления пола у растений хмеля и признака ремонтантности малины.
8. Созданы эффективные ДНК маркеры для выявления пола растений хмеля.
9. Идентифицированные молекулярные маркеры WA-типа ЦМС риса и молекулярные маркеры, тесно сцепленные с геном восстановления фертильности *Rf4*, могут быть использованы в селекционных программах по созданию гибридного риса.
10. Клонированы фрагменты последовательностей генов устойчивости подсолнечника. Установлена их высокая степень гомологии с ранее клонированными генами устойчивости растений.
11. Продемонстрирована высокая эффективность сравнительного анализа локусов генов устойчивости устойчивых и неустойчивых генотипов растений для создания надежных ДНК-маркеров. Сравнительный анализ

ДНК последовательностей показал высокую степень гомологии между нуклеотидными последовательностями локусов *Ve* и *I2* у устойчивых и неустойчивых генотипов томата. У аллеля *i2* неустойчивого генотипа *S.lycopersicum* выявлены последовательность, имеющая высокую степень гомологии к гену *I2C-5*, и ранее неизвестная последовательность ДНК, гомологичная гену *I2* *S. pimpinellifolium*. Создан ДНК маркер гена устойчивости к фузариозному увяданию томата. Выявлен полиморфизм по сайту рестрикции рестриктазы *Xba* I между аллелями гена *Ve* устойчивых и неустойчивых генотипов и на основании данного полиморфизма создан кодоминантный CAPS-маркер.

12. Установлено наличие Ogura-типа ЦМС, возникшей в растениях капусты пекинской *Brassica pekinensis* Jusl, в результате межвидовой гибридизации с турнепсом и капустой абиссинской.
13. Созданные ДНК диагностикумы на гены устойчивости томата - к фузариозу и вертициллезу, хмеля – на определение пола растений, риса – на ЦМС и ген восстановления фертильности, и оптимизированные условия применения ДНК маркеров на гены устойчивости томата к нематоду, ВТМ, кладоспориозу позволяют в значительной мере (в два раза) ускорять селекционный процесс по вышеуказанным генам.
14. Предложенные оптимальные высокопроизводительные методики выделения ДНК позволяют проводить массовый скрининг селекционного материала.
15. Разработанные методы и схемы высокопроизводительной оценки на наличие хозяйственно ценных признаков в исходном селекционном материале с помощью ДНК-технологий дают возможность создавать перспективные формы томата, сочетающие несколько генов устойчивости к болезням и вредителям в одном генотипе, в частности в созданном коммерческом гибриде F_1 Албаши.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Karlov G.I., Khrustaleva L.I., Lim K.B., Tuyl J.M.van. Homoeologous recombination in 2n-gametes producing interspecific hybrids of *Lilium* (Liliaceae) studied by genomic in situ hybridization (GISH).// *Genome*, 1999, Vol.42,N 4. - P. 681-686.
2. Karlov G.I., G.N.Andreeva, I.A. Fesenko, L.I. Khrustaleva Characterization and chromosome location of Ty1-copia group retrotransposons in some Alliaceae, Liliaceae and Iridaceae species.// *Cytogenetics and Cell Genetics*, 1999, v.85, 1-2. P.135.
3. Lim, K.B., van Tuyl, J.M., Khrustaleva, L.I., Karlov, G.I. and de Jong, J.H.. INTROGRESSION OF INTERSPECIFIC HYBRIDS OF LILY USING GENOMIC *IN SITU* HYBRIDIZATION (GISH).// *Acta Hort. (ISHS)* 2000 508:105-112 http://www.actahort.org/books/508/508_13.htm

4. Karlov G. I., Babina D. V., Tikunov Y. M., Khrustaleva L. I. Chromosome organization of Ty1-copia-like retrotransposons in tomato.// Abs. of Fifth International Solanaceae Conference. Botanical Garden of the University of Nijmegen, 2000, p. 40 – 42.
5. Карлов Г.И., Андреева Г.Н., Хрусталева Л.И. Характеристика линии тритикале, несущей пшенично-ржаную транслокацию. С.-х. биотехнология. - М., 2000; Т.1. - С. 39-43.
6. Карлов Г.И., Хрусталева Л.И., van Tuyl J.M. Использование геномной *in situ* гибридизации для изучения гомеологичной рекомбинации в межвидовых гибридах лилий, формирующих 2n-гаметы. С.-х. биотехнология. - М., 2000; Т.1. - С. 44-52.
7. Андреева Г.Н., Карлов Г.И., Семенов О.Г., Мохаммед Резаул Карим Характеристика аллоцитоплазматических форм яровой пшеницы *T. aestivum* на цитоплазме *Secale cereale* с использованием методов геномной *in situ* гибридизации и белковых маркеров. С.-х. биотехнология. - М., 2000; Т.1. - С. 53-58.
8. Тикунов Ю.М., Андреева Г.Н., Карлов Г.И. Использование межмикросателлитного полиморфизма ДНК для идентификации сортов и видов томата. Междунар.науч.-практ.конф."Селекция и семеноводство овощных культур в XXI в.":[Материалы]. - М., 2000; Т.2. - С. 238.
9. **Иванова С.В., Долгодворова Л.И., Карлов Г.И., Кучковская Е.В. Морфометрическая и цитогенетическая характеристика гаплоидов томата// Генетика, 2000, т.36, № 1. - с. 52-61.**
10. Данилова Т.В., Карлов Г.И. Физическая локализация 45S- и 5S-рибосомной ДНК на хромосомах хмеля обыкновенного (*Humulus lupulus* L.). Материалы конференции Памяти Грегора Менделя. - М., 2001. - С. 32.
11. Тикунов Ю.М., Хрусталева Л.И., Андреева Г.Н., Карлов Г.И. Полиморфизм межмикросателлитных последовательностей ДНК культурного и диких видов томата. С.-х. биотехнология. - М., 2001; Т.2. - С. 27-40.
12. Данилова Т.В., Тикунов Ю.М., Weber G., Карлов Г.И. Молекулярное маркирование пола у хмеля (*Humulus lupulus* L.) с использованием ISSR-ПЦР. С.-х. биотехнология. - М., 2001; Т.2. - С. 47-54.
13. Тикунов Ю.М., Хрусталева Л.И., Андреева Г.Н., Карлов Г.И. Изучение межмикросателлитного полиморфизма ДНК видов томата. Материалы конференции Памяти Грегора Менделя. - М., 2001. - С. 136.
14. Соловьев А.А., Кирюхова О.Б., Карлов Г.И., Андреева Г.Н., Комахин Р.А., Бабина Д.В. Выделение и цитологическая характеристика моносомно дополненной линии культурного томата со 2-й гомеологичной хромосомой *Solanum lycopersicoides*. С.-х. биотехнология. - М., 2001; Т.2. - С. 61-67.
15. **Фесенко И.А., Хрусталева Л.И., Карлов Г.И. Изучение организации сателлитного повтора 378 пн в терминальном гетерохроматине *Allium fistulosum*. Генетика, 2002, т.38, № 7. - с. 894-903.**

16. Тикунов Ю.М., Данилова Т.В., Хрусталева Л.И., Андреева Г.Н., Карлов Г.И. Изучение полиморфизма межмикросателлитных последовательностей (ISSR) геномной ДНК различных организмов. Материалы науч.генет.конф., посвящ.100-летию со дня рождения А.Р.Жебрака и 70-летию образования кафедр генетики в Моск.с.-х.акад.им.К.А.Тимирязева. - М., 2002. - С. 316-317.
17. Фесенко И.А., Хрусталева Л.И., Карлов Г.И. Использование оптического картирования для изучения структуры генома лука-батуна. Материалы науч.генет.конф., посвящ.100-летию со дня рождения А.Р.Жебрака и 70-летию образования кафедр генетики в Моск.с.-х.акад.им.К.А.Тимирязева. - М., 2002. - С. 336-337.
18. Карлов Г.И., Фесенко И.А., Андреева Г.Н., Тикунов Ю.М., Хрусталева Л.И. Изучение физической организации *Ty1-copia* и *Ty3-gypsy* подобных ретротранспозонов в геноме томата, лука, тюльпана и крокуса Материалы науч.генет.конф., посвящ.100-летию со дня рождения А.Р.Жебрака и 70-летию образования кафедр генетики в Моск.с.-х.акад.им.К.А.Тимирязева. - М., 2002. - С. 136.
19. Shevelukha V.S., Kuklev M.Y., Karlov G.I. Cloning and characterization of Nbs-Lrr class resistance-gene analogs sequences in sunflower.// *Acta agriculturae Serbica*, 2003, vol. 8, iss. 15, pp. 3-9.
20. Tikunov Yu. M., Khrustaleva L. I., Karlov G. I. Application of ISSR markers in the genus *Lycopersicon*.// *Euphytica*. 2003, v.131, № 1, pp. 71-81.
21. Karlov G.I., Danilova T.V., Horlemann C., Weber G. Molecular cytogenetics in hop (*Humulus lupulus L.*) and identification of sex chromosomes by DAPI-banding.// *Euphytica*, 2003, v. 132, № 2, pp.185-190.
22. Данилова Т.В., Карлов Г.И. Возможности использования ISSR-ПЦР-анализа в селекции хмеля обыкновенного (*Humulus lupulus L.*). Актуал.пробл.генетики. - М., 2003; Т.2. - С. 115-117.
23. Danilova T.V., G.I. Karlov ISSR polymorphism in hop.// Proceedings of the Scientific Commission International Hop Growers` Convention I.H.G.C. Ed. Elisabeth Seigner. 2003. P.87-91.123с.
24. Данилова Т.В., Данилов С.С., Карлов Г.И. Исследование молекулярно-генетического полиморфизма сортов хмеля обыкновенного (*Humulus lupulus L.*) с использованием ISSR-ПЦР-анализа.// *Генетика*, 2003, т.39, № 11. - с. 1484-1489.
25. Тикунов Ю.М., Хрусталева Л.И., Карлов Г.И., van Heusden A.W. Изучение генетической и физической организации микросателлитов (SSRs) и межмикросателлитных последовательностей (ISSRs) в геноме томата Актуал. пробл. генетики. - М., 2003; Т.2. - С. 230-231.
26. Kuklev M.Y., I.A. Fesenko, G.I. Karlov Fluorescence targeting of *Verticillium dahliae* resistance gene (*Ve*) in tomato with molecular beacons. Abstracts of Proceedings of the 4th International Iran and Russian Conference in Agriculture and Natural Resources. 2004, P. 94-95.

27. Ahmadikhah A., V.S. Shevelukha, G.I. Karlov The study of inheritance of fertility restoration in CMS-WA system. Abstracts of Proceedings of the 4th International Iran and Russian Conference in Agriculture and Natural Resources. 2004, P. 95-96.
28. Amini J, I.A. Fesenko, G.I. Karlov Comparison of SCAR PCR and artificial inoculation with the disease-causing agent for determination resistance to Fusarium wilt of tomato. Abstracts of Proceedings of the 4th International Iran and Russian Conference in Agriculture and Natural Resources. 2004, P. 4.
29. Soloviev A.A., Karlov G.I., Divashuk M.G., Bazaleev N.A. Morphological and cytogenetic characterization of translocated spring triticale line 131/7. *Acta agriculturae Serbica*, 2005, vol. 10, iss. 19, pp. 17-23.
30. Ahmadikhah A., Karlov G. I. Molecular mapping of the fertility-restoration gene Rf4 for WA-cytoplasmic male sterility in rice. *Plant Breeding*, 2006, Vol. 125, Issue 4. - P. 363-367.
31. Куклев М.Ю., Фесенко И.А., Карлов Г.И. Разработка флуоресцентной тест-системы для выявления устойчивых к вертициллезу форм томата. / *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*, 2006; №4. - С. 115-119.
32. Соболев В.В., Карлов Г.И., Соболева А.Г., Озеровский А.В., Казаков И.В., Феськов А.А. Использование ISSR-маркеров для молекулярно-генетической идентификации и паспортизации сортов малины. // *С.-х.биология. Сер. Биология растений*, 2006, №5. - С. 48-52.
33. Danilova T. V., Karlov G. I. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism for detection of sex-specific molecular markers in hop (*Humulus lupulus* L.). // *Euphytica*, 2006, vol. 151, Issue 1, p. 15 – 21.
34. Ахмадихах А., Шевелуха В.С., Карлов Г.И. Картирование локусов количественных признаков (QTL), контролирующих восстановление фертильности у риса в стрессовых условиях внешней среды. // *Докл. ТСХА / Рос. гос. аграр. ун-т - МСХА им. К.А. Тимирязева. Москва*, 2006; Вып. 278. - С. 57-65.
35. Pankin A.A., Chèvre A.M., Karlov G.I., Khavkin E.E. A suite of DNA markers for *Brassica* genome B. XV Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB) Congress. 2006. Lyon, France.
36. Данилова Т.В., Куклев М.Ю., Андреева Г.Н., Шевелуха В.С., Карлов Г.И. Клонирование и анализ фрагментов последовательностей генов устойчивости подсолнечника остролистного *Helianthus argophyllus*. // *Генетика*, 2007, т.43, № 4. - с. 482-488.
37. Дивашук М.Г., Карлов Г.И., Соловьев А.А. Использование микросателлитных маркеров для идентификации пшенично-ржаной транслокации у гексаплоидной тритикале. // *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*, 2007, № 1. - С. 61-65.
38. Фесенко И.А., Куклев М.Ю., Карлов Г.И. Создание ДНК-маркера гена устойчивости томата к фузариозному увяданию. // *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*, 2007, № 1. - С. 66-72.

39. Байназарова А.Н., Карлов Г.И., Хрусталева Л.И. Изучение полиморфизма генома огурца посевного (*Cucumis sativus* L.) с помощью ISSR-маркеров. / Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии, 2007, № 1. - С. 56-60.
40. Ahmadikhah A., Karlov G.I., Nematzadeh Gh., Ghasemi Bezdi K. Inheritance of the fertility restoration and genotyping of rice lines at the restoring fertility (*Rf*) loci using molecular markers. // International Journal of Plant Production, 2007, Vol.1, Issue1, P.13-21.
41. Баназарова А.Н., Карлов Г.И., Хрусталева Л.И. Маркирование гена устойчивости огурца к мучнисто росе. Материалы Международной конференции «Научное наследие Н.И. Вавилова – фундамент развития отечественного и мирового сельского хозяйства», 27 – 28 ноября 2007 г. М.: ФГОУ ВПО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, 2007. - С. 138 – 139.
42. Карлов Г.И. ДНК-маркеры в селекции овощных культур. Материалы Международной конференции «Научное наследие Н.И. Вавилова – фундамент развития отечественного и мирового сельского хозяйства», 27 – 28 ноября 2007 г. М.: ФГОУ ВПО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, 2007. - С.140 – 141.
43. Дивашук М.Г., Александров О.С., Карлов Г.И. Клонирование и анализ субтеломерного повтора ДНК хмеля (*Humulus lupulus*). Материалы Международной конференции «Научное наследие Н.И. Вавилова – фундамент развития отечественного и мирового сельского хозяйства», 27 – 28 ноября 2007 г. М.: ФГОУ ВПО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, 2007. - С.163 – 164.
44. Дивашук М.Г., Крупин П.Ю., Соловьев А.А., Карлов Г.И. Оптимизация метода последовательного применения дифференциального окрашивания и геномной *in situ* гибридизации для идентификации транслокаций в геноме тритикале. Материалы Международной конференции «Научное наследие Н.И. Вавилова – фундамент развития отечественного и мирового сельского хозяйства», 27 – 28 ноября 2007 г. М.: ФГОУ ВПО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, 2007. - С. 164 – 166.
45. Панкин А.А., Шевре А.М., Дивашук М.Г., Карлов Г.И., Хавкин Э.Е. ДНК маркеры генома В в растениях *Brassica*. Вторая Вавиловская международная конференция «Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке: состояние, проблемы, перспективы». 2007. Санкт-Петербург, Россия.
46. Pankin A.A., Khavkin E.E., Chèvre A.M., Divashuk M.G., Karlov G.I. A Suite of SCAR Markers for *Brassica* Genomes and Its Individual Chromosomes. International Conference “Molecular Mapping and Marker Assisted Selection in Plants”. 2008. Vienna, Austria.
47. Куклев М.Ю., Фесенко И.А., Карлов Г.И. ДНК-маркирование локуса устойчивости томата к вертициллезному увяданию. // Труды Института биоресурсов и прикладной экологии / Оренб. гос. пед. ун-т, 2008; в.7. - С. 139-140

48. Фесенко И.А., Хрусталева Л.И., Карлов Г.И. Анализ генома лука батуна (*Allium fistulosum*) на наличие теломерного повтора (TTAGGG)_n // ВЕСТНИК Оренбургского государственного университета, 2008, №87, с. 145-152.
49. Соболев В.В., Соболева А.Г., Андреева Г.Н., Карлов Г.И. Оценка межвидового и межсортового полиморфизма малины и маркирование признака ремонтантности с использованием ISSR-ПЦР анализа. / Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии 2009, №. 2, с. 103-109.
50. Климущина М.В., Дивашук М.Г., Карлов Г.И. Молекулярно-генетическая характеристика коллекции мягкой пшеницы по генам, отвечающим за хлебопекарные и технологические качества муки. / Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии 2009, №3, с.81-88.
51. Крупин П.Ю., Дивашук М.Г., Хомякова О.В., Дьячук Т.И., Карлов Г.И. Молекулярно-цитогенетическая характеристика первичных тритикале, межамфилоидного гибрида и перспективных линий селекции НИИСХ Юго-Востока/ Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии, 2009, №3, с. 74-88.
52. Куклев М.Ю., Фесенко И.А., Карлов Г.И. Разработка CAPS-маркера локуса устойчивости томата к вертициллезному увяданию.// Генетика, 2009, т.45, №5, с.656-661.

Патенты и авторские свидетельства

53. Патент на изобретение №2272840: «Способ молекулярного маркирования пола хмеля обыкновенного (*Humulus lupulus* L.). Авторы: Данилова Т.В., Карлов Г.И. / 2006 г.
54. Авторское свидетельство №41985: Томат Албаши. Авторы Амчевская Е.В., Волок О.А., Гавриш С.Ф., Карлов Г.И., Морев В.В., Нестерович А.Н. / 2007 г.

Публикации в глобальной электронной базе данных генбанков

55. EMBL-European Bioinformatics Institute [Электронный ресурс]: EMBL Nucleotide Sequence Database (A/N: AJ964871-86 – “Identification of resistance gene analogues using PCR with degenerate oligonucleotide primers in *Helianthus argophyllus*”)/ Danilova, T.V.; Andreeva, G.N.; Kuklev, M.U.; Karlov, G.I. .; – Электрон. дан. – EMBL Nucleotide Sequence Database (EBI), Hinxton, UK, 2005. – Режим доступа: <http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/sva/sva.pl?query=AJ964886&search=Go&snapshot=>, свободный.
56. EMBL-European Bioinformatics Institute [Электронный ресурс]: EMBL Nucleotide Sequence Database (A/N: DQ781408 – "Gene fragment of the candidate fertility restoring gene Rf1B") /Ahmadikhah A., Karlov G.I.; – Электрон. дан. – EMBL Nucleotide Sequence Database (EBI), Hinxton, UK, 2006. – Режим доступа: [http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+\[EMBL:DQ781408\]+-newId](http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[EMBL:DQ781408]+-newId), свободный.

57. EMBL-European Bioinformatics Institute [Электронный ресурс]: EMBL Nucleotide Sequence Database (A/N: DQ781409 – "Gene fragment of the candidate fertility restoring gene Rf1B") /Ahmadikhah A., Karlov G.I.;. – Электрон. дан. – EMBL Nucleotide Sequence Database (EBI), Hinxton, UK, 2006. – Режим доступа: [http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+\[EMBL:DQ781409\]+-newId](http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[EMBL:DQ781409]+-newId), свободный
58. EMBL-European Bioinformatics Institute [Электронный ресурс]: EMBL Nucleotide Sequence Database (A/N: DQ781410 – "Gene fragment of the candidate fertility restoring gene Rf1B") /Ahmadikhah A., Karlov G.I.;. – Электрон. дан. – EMBL Nucleotide Sequence Database (EBI), Hinxton, UK, 2006. – Режим доступа: [http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+\[EMBL:DQ781410\]+-newId](http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[EMBL:DQ781410]+-newId), свободный
59. EMBL-European Bioinformatics Institute [Электронный ресурс]: EMBL Nucleotide Sequence Database (A/N: DQ778740 – "Development of SCAR markers for identification of CMS and maintainer lines RT in rice") /Ahmadikhah A., Karlov G.I.;. – Электрон. дан. – EMBL Nucleotide Sequence Database (EBI), Hinxton, UK, 2006. – Режим доступа: [http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+\[EMBL:DQ778740\]+-newId](http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[EMBL:DQ778740]+-newId), свободный.
60. EMBL-European Bioinformatics Institute [Электронный ресурс]: EMBL Nucleotide Sequence Database (A/N: DQ858156– " The candidate gene for the fertility restoration of WA CMS in rice") /Ahmadikhah A., Karlov G.I.;. – Электрон. дан. – EMBL Nucleotide Sequence Database (EBI), Hinxton, UK, 2006. – Режим доступа: [http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+\[EMBL:DQ858156\]+-newId](http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[EMBL:DQ858156]+-newId), свободный.
61. EMBL-European Bioinformatics Institute [Электронный ресурс]: EMBL Nucleotide Sequence Database (A/N: DQ683439-41 " Identification and sequencing of RAPD markers linked with CMS in rice") /Ahmadikhah A., Karlov G.I.;. – Электрон. дан. – EMBL Nucleotide Sequence Database (EBI), Hinxton, UK, 2006. – Режим доступа: [http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+\[EMBL:DQ683439-41\]+-newId](http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[EMBL:DQ683439-41]+-newId), свободный.