

На правах рукописи

ПИКУНОВА АННА ВИКТОРОВНА

**ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ
ИСХОДНОГО И СЕЛЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА
ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР
С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ**

Специальности:

06.01.05 – селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2011

Диссертационная работа выполнена на кафедре растениеводства факультета агробизнеса и экологии ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный университет».

Научные руководители:	доктор сельскохозяйственных наук Князев Сергей Дмитриевич доктор биологических наук Павловская Нинель Ефимовна
Официальные оппоненты:	доктор биологических наук, Юшев Анатолий Андреевич доктор биологических наук Шнеер Виктория Семеновна
Ведущая организация:	ФГОУ ВПО Брянская сельскохозяйственная академия

Защита состоится «**14**» **декабря** 2011 года в **14** часов на заседании диссертационного совета Д 006.041.01 при Всероссийском научно-исследовательском институте растениеводства им. Н.И. Вавилова по адресу: 190000, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 44.

Факс: (812) 571-87-28; e-mail: v.gavrilova@vir.nw.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства им. Н.И. Вавилова

Автореферат размещен на сайте <http://www.vir.nw.ru> и направлен в Министерство образования и науки РФ для размещения в сети интернет «14» ноября 2011 г.

Автореферат разослан 14 ноября 2011 г.

Отзывы на автореферат в двух экземплярах, заверенные гербовой печатью, просим направлять ученому секретарю диссертационного совета.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

В.А. Гаврилова

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследований. Существенным недостатком ягодных культур, в том числе смородины черной и земляники садовой, является высокая восприимчивость к болезням и вредителям. Одним из основных, экологически безопасных, путей борьбы с болезнями и вредителями является селекция, направленная на создание невосприимчивых к ним сортов (Князев, 1995).

Важной задачей в селекции смородины черной (*Ribes nigrum* L.) является создание сортов устойчивых к почковому клещу (*Cecidophyopsis ribis*) (Огольцова, 1992; Копань и др., 1998; Князев и др., 2004), а в селекции земляники садовой (*Fragaria ananassa* Duch.) - выведение сортов, устойчивых к фитофторозному увяданию (возбудитель *Phytophthora fragariae* Hick. subsp. *fragariae*) (Parikka, 2004; Ellis, 2008).

Успех селекционных исследований в данном направлении во многом зависит от изучения, подбора и систематизации исходного материала, мобилизации в селекционных программах диких сородичей, создания эффективных доноров (Вавилов, 1987; Жученко, 2001), а также применения современных методов исследований, позволяющих на ранних стадиях идентифицировать устойчивые генотипы (Чесноков, 2005; Francia et al., 2005).

Род смородина *Ribes*L. включает более 150 видов, к нему принадлежат такие сельскохозяйственные культуры как красная и черная смородины, крыжовник. Однако филогения и таксономия рода окончательно не определены.

Одним из направлений, позволяющих существенно расширить возможности традиционной селекции растений, оценить полиморфизм селекционного материала, уточнить филогенетические связи является применение молекулярных маркеров (Гречко, 2002; Collard and Mackill, 2007). В селекционных исследованиях земляники и особенно смородины черной молекулярные маркеры используются ограниченно и, преимущественно, в зарубежных исследованиях (Brennan et al., 1997, 1998, 2002, 2009; Naumes et al., 1997; Weg et al., 1997, 2006; Sargent et al., 2008).

В этой связи применение методов ДНК-генотипирования культурных растений и их дикорастущих сородичей, создание карт сцепления и физических карт генома с помощью ДНК-маркеров будет способствовать увеличению генетического разнообразия и вовлечению новых генов и аллелей в селекционный процесс (Хавкин, 2003).

Цель и задачи исследований. Цель исследований – изучить возможность использования молекулярных ДНК-маркеров и

полиморфизма спектров запасных белков семян для первичной оценки исходного и селекционного материала смородины черной и земляники садовой.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

- 1) изучить генетическое разнообразие рода *Ribes* с помощью RAPD анализа;
- 2) рассмотреть филогенетические связи между видами рода *Ribes* на основании данных анализа RAPD маркеров;
- 3) изучить полиморфизм запасных белков семян черной смородины и оценить его возможности для генетического анализа селекционного материала;
- 4) оценить возможность использования SCAR маркера гена *Ce*, амплифицируемого парой праймеров GMgesa, для отбора устойчивых к почковому клещу генотипов;
- 5) составить молекулярно-генетическую карту сцепления ДНК-маркеров и гена *Rpfl* контролирующего устойчивость земляники к фитофторозному увяданию.

Научная новизна. Впервые в России RAPD анализ был использован для оценки генетического полиморфизма и рассмотрения филогенетических отношений коллекции рода *Ribes* (смородина) генбанка Всероссийского научно-исследовательского института селекции плодовых культур, включающего преимущественно сорта отечественной селекции. Впервые с помощью SDS-ПААГ электрофореза запасных белков семян оценён межсортовой и внутрисортовой полиморфизм у чёрной смородины. SCAR маркер гена *Ce* устойчивости смородины черной к почковому клещу протестирован на отечественном материале. Картирован один из основных генов устойчивости земляники к фитофторозному увяданию (*Rpfl*), обнаружены и проверены на различных сортах и формах ДНК маркеры данного гена.

Практическая значимость исследований. Выявлена возможность использования SCAR маркера гена *Ce* для отбора устойчивых к почковому клещу генотипов смородины черной на ранних стадиях селекционного процесса, что значительно ускорит выведение устойчивых сортов. Обнаруженные в настоящей работе ДНК-маркеры гена *Rpfl*, устойчивости земляники к фитофторозному увяданию, могут быть использованы при отборе генотипов, несущих ген. Данные о локализации гена *Rpfl* на генетической карте будут полезны для исследований по клонированию гена.

Установлено, что RAPD анализ выявляет высокий уровень полиморфизма между представителями рода *Ribes* и, таким образом,

предоставляет селекционеру дополнительную информацию о генетическом сходстве и различии селекционного материала, что позволит более обоснованно подбирать пары для скрещивания. Открываются перспективы для использования данного метода в оценке гибридов и различения генотипов смородин и крыжовников в связи с обнаружением целого ряда таксон и генотип специфичных фрагментов.

SDS-ПААГ электрофорез белков семян выявил межсортовой и внутрисортовой полиморфизм генотипов и может быть использован для оценки генетического разнообразия сортов и популяций смородины черной.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены и доложены на Международной научно-практической конференции «Foodomics» (г.Сезена, Италия 28-29 мая, 2009); на региональной научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов, посвященной 35-летию Орловского государственного аграрного университета «Инновационный потенциал молодых ученых – АПК Орловской области» (г. Орел, 16-19 марта 2010 года); на Международной научно-практической конференции, посвященной 155-летию со дня рождения И. В. Мичурина XXII «Мичуринские чтения» (г. Мичуринск, 26-28 октября, 2010). Первоначальные результаты исследований позволили принять участие в международном проекте IAMONET-RU, реализованном в университете г. Вагенингена, Королевство Нидерландов (23.01.2009-23.01.2010).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 3 в изданиях, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 152 страницах текста, состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, рекомендаций, списка использованной литературы (241 наименование, в том числе 154 на иностранном языке), содержит 19 таблиц и 29 рисунков, 6 приложений.

Автор глубоко благодарен доктору биологических наук Павловской Нинель Ефимовне и доктору сельскохозяйственных наук Князеву Сергею Дмитриевичу за научные и методические консультации, просмотр и редакцию рукописи, ценные замечания и предложения. Автор благодарит Голяеву О.Д. (к.б.н., селекционер красной смородины, ВНИИСПК, Орел) и Курашева О.В. (к.б.н., селекционер крыжовника, ВНИИСПК, Орел) за предоставление растительного материала. Автор выражает благодарность сотрудникам Центра «Биоинженерия» РАН, Москва; лаборатории «Биохимии»,

ВНИИЗБК, Орел; отдела селекции черной смородины ВНИИСПК, Орел; научно-исследовательской группы Эрика Ван де Вега, университет Вагенингена, Королевство Нидерландов, за помощь в проведении анализов. Отдельная благодарность руководителям и ведущим научным сотрудникам вышеперечисленных учреждений: д.б.н. Кочевой Е.З., к.б.н. Корниенко Н.Н. и д.ф.н. Эрику Ван де Вегу за методические и научные консультации.

Основные положения, выносимые на защиту:

- генетический полиморфизм сортов черной смородины на основании анализа запасных белков семян,
- генетический полиморфизм и филогенетические отношения представителей рода *Ribes* L. на основании RAPD анализа,
- возможность использования молекулярных ДНК-маркеров при отборе устойчивых к почковому клещу генотипов,
- генетическая карта сцепления молекулярных маркеров и гена *Rpfl* устойчивости земляники к фитофторозному увяданию,
- ДНК-маркеры гена *Rpfl*.

Все анализы выполнялись соискателем лично и совместно с сотрудниками Центра «Биоинженерия» РАН, Москва; лаборатории «Биохимия», ВНИИЗБК, Орел; научно-исследовательской группы Эрика Ван де Вега, университет Вагенингена, Королевство Нидерландов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2 ОБЪЕКТЫ, МЕТОДИКА И УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

RAPD анализ представителей рода Ribes был проведен в ходе научной стажировки в Центре «Биоинженерия» РАН, Москва, в группе молекулярных методов анализа генома, руководитель группы д.б.н. Кочиева Е.З.

Было проанализировано 47 сортообразцов из коллекции ВНИИСПК подродов *Grossularia* Rich. (крыжовник) и *Ribesia* Berl. (смородина) рода *Ribes*, последний из которых был представлен четырьмя секциями (*Eucoreosma* Jancz., *Calobotrya* Spach, *Symphocalyx* Berl., *Ribesia* Berl.), включающими дикорастущие формы и сорта, имеющие разное происхождение (СССР, Россия, Америка, Европа). Выделение растительной ДНК производили по методике, предложенной Д. Пучоа (D. Puchooa, 2004).

Для PCR анализа использовали праймеры фирмы "Operon Technologies" (США). Реакцию амплификации проводили в термоциклере GeneAmp PCR System 2700 («Applied Biosystems», США). Продукты реакции амплификации разделяли электрофорезом в

1.7 % агарозном геле в 1xTBE буфере, с последующим окрашиванием бромистым этидием.

В статистический анализ включали только четкие, воспроизводимые фрагменты размером от 300 до 2000 п.н. Величины геномного полиморфизма рассчитывались как процент полиморфных фрагментов от общего числа амплифицируемых фрагментов.

Подсчет генетических различий (GD) осуществляли в программе Statistica 6.0, построение дендрограммы в программе TREECON (Van de Peer and de Wachter, 1994).

SDS-ПААГ электрофорез белков семян смородины черной проведен на базе ВНИИ ЗБК, Орел, в лаборатории «Биохимия», возглавляемой д.б.н. Павловской Н.Е.

Для анализа отобрали 7 сортообразцов черной смородины из коллекции ВНИИСПК. Проводили посемянный анализ (по 50 семян, полученных от самоопыления). Использовали водно-солевые экстракты семян. SDS-ПААГ электрофорез проводили в 12,5 % ПААГ (Конарев; Гаврилюк и др., 2000) в камере для вертикального электрофореза. Результаты электрофореза фиксировали путем консервирования пластин или сканирования с последующей записью белковых формул. Позиции компонентов были установлены с помощью скользящей шкалы для идентификации полипептидов семян бобовых (Конарев; Гаврилюк и др., 2000), в качестве эталонного спектра использовали спектр сои. Для проверки различий между сортообразцами на существенность был проведен анализ частот типов белкового спектра при помощи критерия χ^2 квадрат – определение достоверности различия двух распределений с одинаковой системой классов, с одинаковыми границами (Плохинский, 1980)

Маркирование гена Се. Протестировано 37 сортообразцов из коллекции ВНИИСПК, включая сорта черной смородины, смородину кроваво-красную, крыжовник и смородинно-крыжовниковые гибриды. ПЦР анализ проводили по Бреннэну с соав. (Brennan et al., 2009) с модификациями.

Картирование и маркирование гена Rpf1 было проведено в ходе научной стажировки в WUR, Королевство Нидерландов совместно с научно-исследовательской группой Эрика ван де Вега.

Для картирования была использована гибридная популяция (64 семянца), полученная от скрещивания двух сортов земляники садовой Ялова-4 и Зенга Зенгана. Наиболее перспективные маркеры были протестированы на 120 сортах и формах земляники садовой различного происхождения. ДНК выделяли по методике Томас и Тэнксли (Thomas and Tanksley, 1990) с модификациями.

Двадцать четыре микросателлитных локуса и маркер SCAR-R1a (Naumes et al., 2000) были протестированы на гибридной популяции. Визуализация продуктов амплификации микросателлитов проводилась с помощью ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer. Картирование осуществляли в программе JoinMap 3.0. Генетическая карта создавалась для каждого родителя отдельно.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3. RAPD анализ генетического разнообразия и филогенетических связей у представителей рода *Ribes*

Исследование генетического полиморфизма рода *Ribes*

По результатам предварительного тестирования 18 олигонуклеотидных RAPD праймеров было отобрано 9 из них для RAPD анализа всех 47 образцов рода *Ribes* (рис.1). На девяти полученных электрофореграммах всего выявлено 274 фрагмента размером от 330 до 2000 п.н., из которых 270 были полиморфными - выявляли различия между образцами, то есть отсутствовали хотя бы у одного из анализируемых образцов. Число фрагментов, амплифицируемых одним праймером, варьировало от 22 (OPD6) до 41 (OPN14) и в среднем на праймер составило 30.

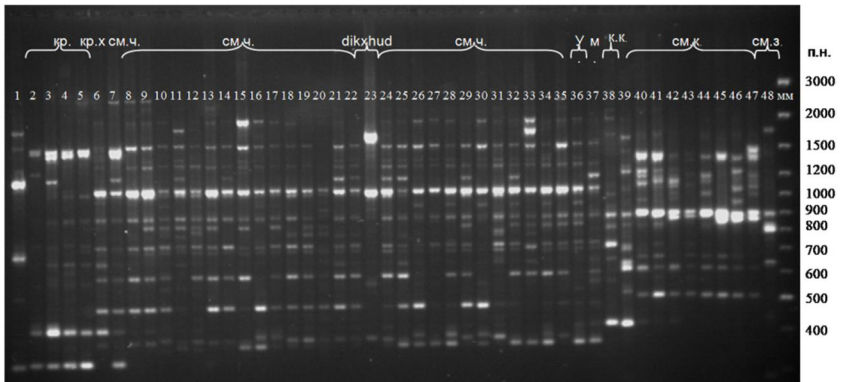


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймером OPN19 (вверху электрофореграммы номера сортообразцов с 1 по 48; мм – маркер молекулярного веса; справа - размеры фрагментов, п.н.; 1-ый образец – чубушник – внешний образец для сравнения, кр. - крыжовник, кр.х см.ч. – смородинно-крыжовниковые гибриды, см.ч. – сортообразцы черной смородины, dikxhud - гибрид смородины дикуши и смородины гудзонской, у. – потомок смородины уссурийской, м. – потомок смородины моховки, см.к. - сортообразцы красной смородины, см.з. – смородина золотистая).

Данные RAPD-анализа были использованы для оценки внутривидовой, межвидовой и межподродовой варибельности и сходства геномов представителей различных таксонов рода *Ribes*. Внутривидовой полиморфизм (63,3%) оказался ниже внутрисекционного (81,4 и 87,4%). Однако межсекционный полиморфизм и полиморфизм между подродами находятся приблизительно на одном уровне (93,2%;95%;97,1%). Данный факт позволяет предположить, что подроды крыжовника, черной смородины и красной смородины являются таксонами одного уровня, и подтверждает достоверность классификаций, выделяющих данные таксоны в отдельные подроды. Например, классификация Элизабет Кип (Keer, 1962), в которой в пределах рода смородина были выделены 9 подродов, включая подроды *Grossularia*, *Symphocalyx*, *Ribesia*, *Calobotrya*, за исключением объединения секции *Eucoreosma* и секции *Calobotrya* в подрод *Calobotrya*.

При анализе электрофореграмм нами были идентифицированы фрагменты специфичные как для отдельных образцов, так и для представителей определенных таксонов. Данный факт свидетельствует в пользу того, что RAPD маркеры могут быть использованы при анализе гибридов и различении генотипов представителей смородин и крыжовников. Всего было отмечено двадцать девять фрагментов, отличающих отдельные сортообразцы. Выявлено от одного до 6 генотип специфичных фрагментов. Три специфичных фрагмента (OPE2-920, OPN14-460, OPD3-400) характерны для всех исследованных представителей рода, и, возможно, являются родоспецифичными. Специфичные фрагменты OPE1-490, OPE3-440 характерны для всех представителей секции *Ribesia* (подвид красных смородин), а специфичные фрагменты OPE2-800, OPD3 -950 - для подрода *Grossularia* (крыжовники).

Пять специфичных фрагментов (OPN8-1100, OPE2-770, OPE2-1100, OPN19-22, OPD3-920) характерны для группы черных смородин, включая смородинно-крыжовниковые гибриды. Ряд фрагментов был амплифицирован только на ДНК крыжовников и смородинно-крыжовниковых гибридов (в том числе фрагменты OPN14-430, OPE5 -710). Были обнаружены фрагменты, характерные для групп сортообразцов, объединяющих сразу несколько таксономических единиц.

Выявленный полиморфизм позволил отличить друг от друга близко родственные сорта, представителей одной сестринской линии, имеющих идентичные родословные (сорта Кипиана, Гамма, Грация).

На основании электрофореграмм были подсчитаны коэффициенты генетических различий, отображающие генетические расстояния между образцами попарно (таблица 1).

Таблица 1. Показатели генетических расстояний представителей рода *Ribes* L., рассчитанные по результатам RAPD данных

Группа образцов	Вариабельность коэффициентов генетических различий (к.г.р.) внутри группы	Среднее значение к.г.р.	Стандартная ошибка среднего значения к.г.р.
Межподродовые расстояния			
<i>Grossularia</i> . и <i>Ribesia</i> , секция <i>Ribesia</i>	0,13-0,19	0,16	0,0024
<i>Grossularia</i> . и <i>Ribesia</i> , секция <i>Eucoeosma</i>	0,12-0,17	0,14	0,0011
<i>Calobotrya</i> - <i>Grossularia</i>	0,15-0,18	0,17	0,0069
<i>Symphocalyx</i> - <i>Grossularia</i>	0,19-0,21	0,2	0,0036
Межсекционные расстояния			
секция <i>Eucoeosma</i> и секция <i>Ribesia</i>	0,14-0,21	0,16	0,0006
<i>Calobotrya</i> - <i>Ribesia</i>	0,14-0,23	0,17	0,0078
<i>Calobotrya</i> - <i>Eucoeosma</i>	0,12-0,16	0,14	0,0020
<i>Symphocalyx</i> - <i>Ribesia</i>	0,15-0,18	0,16	0,0032
<i>Symphocalyx</i> - <i>Eucoeosma</i>	0,17-0,22	0,19	0,0022
<i>Symphocalyx</i> - <i>Calobotrya</i>		0,23	
Межвидовые (виды принадлежат одной секции)			
<i>R. nigrum</i> , <i>R. ussuriense</i> (секция <i>Eucoeosma</i>)	0,04-0,05	0,05	0,0009
Приморская форма, <i>R. petraeum</i> subsp. <i>atropurpureum</i> , <i>R. rubrum</i> , <i>R. sativum</i> , <i>R. warszewiczii</i> , <i>R. palczewskii</i> (секция <i>Ribesia</i>)	0,05-0,13	0,08	0,006
Внутрисекционные			
секция <i>Eucoeosma</i>	0,01-0,08	0,04	0,0006
секция <i>Ribesia</i>	0,04-0,13	0,07	0,0038
секция <i>Eugrossularia</i> Engh.	0,03-0,05	0,04	0,0024
Внутривидовые			
<i>R. nigrum</i> (10-17,19)	0,02-0,05	0,03	0,0012
Межсортовые			
Сорта черной смородины (27 образцов, 8-22, 24-35)	0,01-0,07	0,04	0,0004
Сорта красной смородины (5 образцов, 43-47)	0,04-0,09	0,06	0,005
Смородинно-крыжовниковые гибриды			
<i>Grossularia</i> и см.-кр. гибриды	0,08-0,11	0,1	0,003
секция <i>Eucoeosma</i> и см.-кр. гибриды	0,05-0,09	0,07	0,001

Установлено, что у исследованных образцов рода *Ribes* значения коэффициентов генетических различий варьируют в пределах от 0,01 (между двумя сортами черной смородины, представителями европейского подвида - Северянка и Отело) до 0,23 (между *R. aureum* Pursh секции *Symphocalyx* и *R. sanguineum* Pursh секции *Calobotrya*).

В целом, диапазон генетических различий 27 сортов и гибридов черной смородины секции *Eucoreosma*, включая образцы, в происхождении которых участвовали другие виды секции *Eucoreosma* (*R. bracteosum* Dough, *R. pauciflorum* Turcz., *R. dikuscha* Fisch., *R. ussuriense* Jancz. и др.), секции *Calobotrya* (*R. glutinosum* Benth), подрода *Grossularia* (*R. oxyacanthoides* L.) составил 0,01-0,08 и был ниже, чем у пяти образцов красной смородины секции *Ribesia*- 0,04-0,13, в родословных которых присутствуют только виды секции *Ribesia*: *R. rubrum* L., *R. sativum* Syme, *R. warszewiczii* Jancz., *R. palczewskii* (Jancz.) Pojark.

Сравнительно низкие значения генетических различий (0,03-0,05) были выявлены для образцов крыжовника (подрод *Grossularia*), что, однако, может быть связано с малой представленностью этого подрода в анализе (4 образца).

Сортообразцы Йошта и 2030-29-61, полученные от скрещивания видов, относящихся к разным подродам *R. divaricatum* Dougl. (подрод *Grossularia*) и *R. nigrum* (подрод *Ribesia*), показали большее сходство с представителями секции черной смородины (0,05-0,09), чем с представителями крыжовников (0,08-0,11).

Наибольшие генетические различия обнаружены между представителями секции красных смородин (*Ribesia*) и секции черных смородин (*Eucoreosma*) (0,14-0,21); представителем секции *Symphocalyx* *R. aureum* (золотистая смородина) и представителями секции *Eucoreosma* (черная смородина) (0,17-0,22); представителем секции *Symphocalyx* *R. aureum* (смородина золотистая) и представителем секции *Calobotrya* *R. sanguineum* (смородина кроваво-красная) (0,23); представителем секции *Calobotrya* *R. sanguineum* (кроваво-красная смородина) и представителями секции *Ribesia* (красная смородина) (0,14-0,23).

В то же время различия между представителями подродов *Grossularia* и *Ribesia* были на том же уровне, что и вышеперечисленные межсекционные. Между представителями подрода *Grossularia* (крыжовник) и представителями подрода *Ribesia* секции *Eucoreosma* (черная смородина) коэффициенты генетических различий составили 0,12-0,17; между представителями подрода

Grossularia (крыжовник) и представителем подрода *Ribesia* секции *Calobotrya* - *R.sanguineum* (смородина кроваво-красная) 0,15-0,18.

R. sanguineum (смородина кроваво-красная, представитель секции *Calobotrya*, подрод *Ribesia*) имеет большее сходство (0,14) с образцами черной смородины, чем с образцами крыжовника (0,17) и красной смородины (0,17). В целом, согласно коэффициентам генетических различий, среди исследованных представителей рода *Ribes* можно выделить три неформальные группы по степени сходства геномов: 1) представители секций *Eucoreosma* и *Calobotrya* подрода *Ribesia* и представители подрода *Grossularia*, 2) представители секции *Ribesia*, 3) представитель секции *Symphocalyx*.

Исследование таксономических и филогенетических отношений анализируемых представителей рода *Ribes*

На основании полученных RAPD спектров методом кластерного анализа (UPGMA) была построена дендрограмма, наглядно отражающая степень различий исследованных образцов (рис.2).

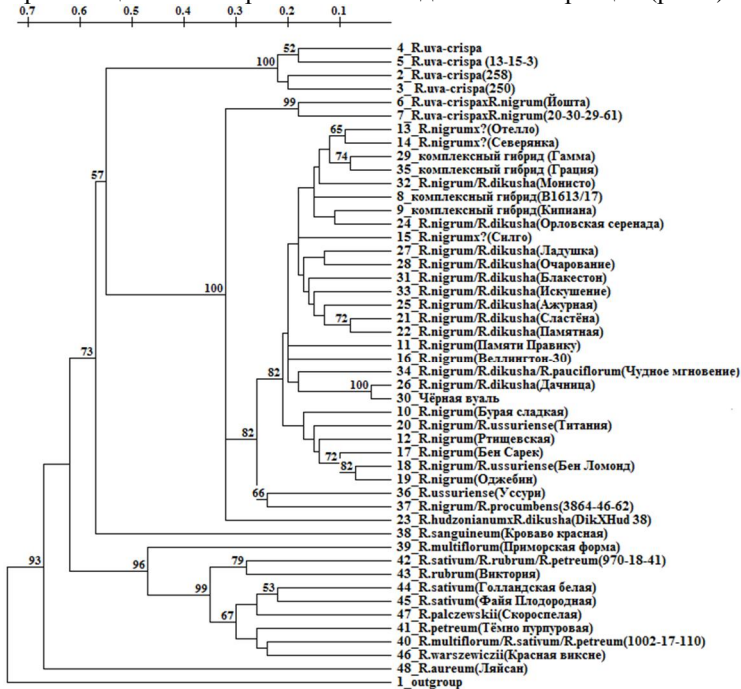


Рисунок 2. Дендрограмма кластеризации 47 образцов рода *Ribes*, построенная на основании RAPD данных.

Отдельную ветвь в группе смородин черных формирует гибридная форма *R. dikuscha* x *R. hudsonianum*.

На полученной дендрограмме с высокой бутстреп поддержкой (ИБ 72%) объединяются сорта, имеющие в родословной представителя скандинавского подвида смородины черной (сорт Оджебин 100% по родословной *R. nigrum* subsp. *scandinavicum*, Бен Ломонд 50% скандинавского подвида смородины черной, Бен Сарек -25% скандинавского подвида смородины черной в родословной). Однако, сорт Титания, в родословной которого *R. nigrum* subsp. *scandinavicum* составляет 25 %, в этот кластер не входит, что, вероятно, связано с присутствием в ее родословной также сибирского подвида (25%).

Среди сортов Северянка, Отелло, Ртищевская, Силго, Веллингтон-30, имеющих в родословной представителя подвида *R. nigrum* subsp. *europaeum* со сравнительно высоким значением бутстреп поддержки (65%) объединяются только сорта Отелло и Северянка.

Данные кластерного анализа не всегда отражают данные родословных. Так сорта Гамма, Грация и Кипиана получены из одной гибридной семьи (100 % родства по родословным), но по данным дендрограммы вместе кластеризуются только сорта Гамма и Грация.

На дендрограмме к кластеру черных смородин с высокими значениями индекса бутстрепа (ИБ 100%) примыкают смородинно-крыжовниковые гибриды (Йошта и 2030-29-61), что, вероятно, свидетельствует о преобладании у них генома смородины черной.

Второй и наиболее близкий к представителям черной смородины (секция *Eucoreosma* подрод *Ribesia*) кластер сформировали образцы крыжовника вида *R. grossularia*, относящемуся к подроду *Grossularia*.

Также к черно-смородинно-крыжовниковому кластеру примыкает отдельная ветвь - образец вида *R. sanguineum* (смородина кроваво-красная), секция *Calobotrya*, подрод *Ribesia*.

Третью группу на дендрограмме образуют представители секции *Ribesia* (ИБ 96%), которая подразделяется на ряд отдельных подкластеров. Наиболее крупный подкластер образуют образцы видов *R. sativum* (сорта Файя Плодородная, Голландская белая), *R. palczewskii* (Скороспелая), *R. petraeum* Wulf. (Темно-пурпуровая), *R. warszewiczii* (Красная Виксне), и гибридная форма 1002-17-110, имеющая в родословной генетический материал от *R. multiflorum* Kit., *R. sativum*, *R. petraeum*. С этим подкластером объединяются два образца (ИБ 79%), имеющие в составе своего генома генетический материал вида *R. rubrum* (сорт Виктория, полученный путем отбора из популяции *R. rubrum*, и гибридная форма 970-18-41).

Базальную ветвь в третьей группе формирует приморская форма, являющаяся предположительно образцом вида *R. multiflorum* или вида *R. mandshuricum* (Maxim.) Kom.

По данным проведенного RAPD анализа наиболее отдаленным из анализируемых видов *Ribes* является вид *R. aureum* (смородина золотистая, сорт Лясан), формирующий на дендрограмме отдельную ветвь.

4. Изучение полиморфизма белков семян черной смородины методом SDS-ПААГ электрофореза белков семян

На полученных нами спектрах запасных белков семян черной смородины можно выделить четыре зоны с соответствующими позициями компонентов: 10-40 (зона 4), 43-67 (зона 3), 85-100 (зона 2) и 105-110 (зона 1) (рис.3).

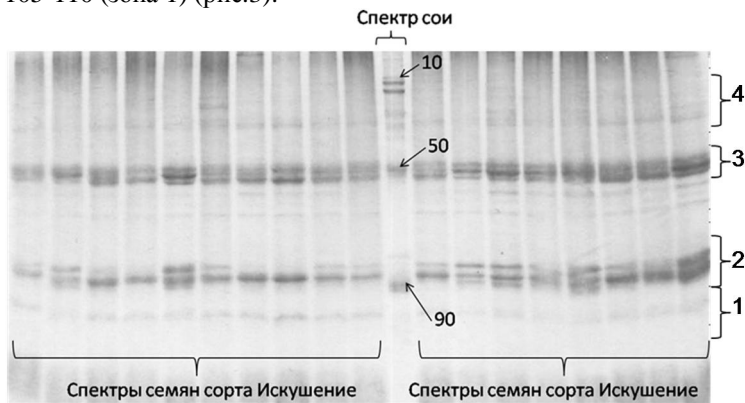


Рисунок 3. Электрофоретические спектры запасных белков семян сортообразца Искушение (справа отмечены зоны спектра, на спектре суммарного белка сои отмечены позиции реперных компонентов).

В зоне 3 (33-39 кДа) выявлено 5 возможных позиций компонентов: 46, 48, 50, 52, 53. В зоне 2 (20-22 кДа) выявлено 5 возможных позиций компонентов: 85, 86, 88, 90, 92.

У большинства исследованных сортообразцов (Искушение, 3268-4-36, Минай Шмырев, 2091-39-32, Кипиана, 3190-44-57) при посевном анализе были обнаружены разные типы спектров, что говорит о различии генотипов проанализированных семян, единообразные типы спектров ото всех семян получены только у одного сортообразца (3122-47-29). Данный факт, видимо, обусловлен гетерозиготностью локусов, контролирующих запасные белки семян у сортообразцов, от которых после самоопыления были получены

семена. Полиморфный характер спектров наблюдался и у разных популяций смородины малоцветковой (Сабитов, 1994), а также большинства исследованных сортов красной смородины (Арсеньева, 1995).

При учете главных компонентов и их интенсивности в зонах 3 и 2 было выявлено соответственно 9 и 4 типа спектров (таблица 2).

Таблица 2. Компонентный состав белков семян исследованных сортообразцов в зонах 2 и 3

Тип спектра	Зона 3					Зона 2				
	Позиция и интенсивность окрашивания полипептидов, балл									
	46	48	50	52	53	85	86	88	90	92
1		1	2	1		1			2	2
2	1	1	1	1	1	1			2	1
3		1	1	1	1				2	1
4	1	1		1			2	2	1	
5	1	1		2	1					
6		1		1	1					
7	2	2	1	1						
8	2		2	2						
9	1		2	1						

Рассчитанные нами частоты встречаемости типов спектров (процент числа семян с данным типом спектра от общего числа протестированных семян), показывают, что число типов спектра в пределах сортообразца колеблется от 1 (3122-47-29) до 6 (Искушение) в зоне 3 и от 1 (Кипиана, 3122-47-29 и др.) до 3 (Искушение и др.) в зоне 2 (таблица 3).

Таблица 3. Частоты встречаемости типов белкового спектра в сеянном потомстве у сортообразцов черной смородины, %

Сортообразцы	Типы спектров зоны 3									Типы спектров зоны 2			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4
Искушение	55	29	9	2	3	2				54	30	17	
3268-4-36	44	6	15	10	21	4				48	31	21	
Минай Шмырев	98						2			7	91	2	
2091-39-32	25				6			66	3				100
Кипиана								70	30				100
3190-44-57								39	61				100
3122-47-29								100					100

У сортообразца Минай Шмырев более 90% встречающихся типов спектров представлены одним спектром (тип спектра №1 в зоне

3 и №2 в зоне 2). У сортообразца Искушение более 80% приходится на 2 типа спектра (№№ 1 и 2 в зоне 2 и в зоне 3). У сортообразца 3268-4-36 80% составляют 3 типа спектра (№№ 1,3,5 в зоне 3 и №№ 1,2 и 3 в зоне 2). Сортообразцы 2091-39-32, Кипиана, 3190-44-57 характеризуются сочетанием двух типов спектров в зоне 3 (№№ 1и 8, №№ 8 и 9, №№ 8 и 9, соответственно), в то время как в зоне 2 имеют только один тип спектра (№4).

Сортообразцы Кипиана и 3190-44-57 имеют одинаковое сочетание типов спектров в зоне 3, но частота встречаемости данных спектров различна: у Кипианы 70% приходится на тип спектра № 8 и 30% на № 9, в то время как у сортообразца 3190-44-57 тип спектра № 9 преобладает (61%).

Для проверки достоверности различий сочетаний частот типов спектра между сортообразцами был использован анализ частот встречаемости типов белкового спектра зоны 2 и 3 при помощи критерия χ^2 – определение достоверности различия двух распределений с одинаковой системой классов, с одинаковыми границами (Плохинский, 1980).

При анализе различий сочетаний частот типов спектра в зоне 3 была установлена достоверность различий между всеми образцами с вероятностью недостоверности различий менее 0,001. Таким образом, все исследованные сортообразцы характеризуются уникальным соотношением частот типов спектров зоны 3.

Аналогичный анализ частот типов белкового спектра зоны 2 показал наличие достоверных различий между большинством сортообразцов за исключением ряда сортообразцов, имеющих одинаковую (2091-39-32, Кипиана, 3190-44-57, 322-47-39) или близкую (3268-4-36 и Искушение) структуру белкового спектра в зоне 2. Несмотря на наличие очевидных визуальных различий спектров зоны 2 у ряда сортообразцов, использование этой зоны не позволяет различить все исследованные сортообразцы в отличие от зоны 3, характеризующейся более разнообразными спектрами и их сочетанием, индивидуальным для всех сортообразцов.

Большинство изученных сортообразцов характеризуются сочетанием определенных типов спектров с различной частотой, проявляя значительный полиморфизм генотипов, за исключением сортообразца 3122-47-29, у которого белковый спектр состоит из одного типа. По данным Арсеньевой (1995), у 86% изученных сортов смородины красной выявлен значительный полиморфизм генотипов, у оставшихся 4 сортов обнаружили отсутствие гетерогенности.

Таким образом, впервые в России проведен SDS-ПААГ электрофорез белков семян черной смородины. Установлено, что спектры запасных белков семян состоят из 4 зон. У большинства исследованных сортообразцов (за исключением формы 3122-47-29) при посевном анализе были обнаружены различные типы спектров, что говорит о различии генотипов проанализированных семян. В данном случае полиморфность спектров – отражение гетерозиготности сорта, которая проявилась при самоопылении. По наличию очевидных визуальных различий спектров зоны 2 исследованные сортообразцы можно разделить на две группы. Каждый из изученных сортообразцов достоверно характеризуется определенным сочетанием частот типов спектра зоны 3.

5. Маркирование гена *Ce*, контролирующего устойчивость черной смородины (*R. nigrum*) к почковому клещу (*Cecidophyopsis ribis*)

При амплификации на ДНК сортообразцов крыжовника, смородино-крыжовниковых гибридов и смородины (Кипиана, Грация, В1613/17, 1448-14-24), имеющих ген *Ce* по данным анализа родословных и селекционных наблюдений за поражаемостью почковым клещом, был получен фрагмент ожидаемого размера (130 п.н.), что свидетельствует о наличии SCAR маркера (рис. 4). В же время при амплификации на ДНК остальных сортообразцов, не имеющих ген *Ce*, ПЦР продукт не был получен - SCAR маркер отсутствовал.

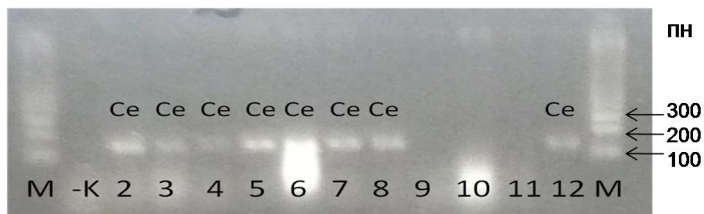


Рисунок 4. Выявление SCAR маркера гена *Ce* на электрофореграммах продуктов, амплифицированных на ДНК образцов черной смородины с парой праймеров Gmresa. (Надпись «Ce» указывает присутствие или отсутствие гена *Ce* у образца черной смородины по данным селекционных наблюдений; М – маркер молекулярного веса; - К – минус контроль; 2-4 – крыжовник: 2- форма 250, 3 – Гроссуляр, 4- форма 13-15-3; 5-Йошта, 6- форма 2030-29-61 - смородинно-крыжовниковый гибрид; 7 – 12 – черная смородина: 7 – В1613/17, 8 – Кипиана, 9 – Монисто, 10 - Искушение, 11 – Чудное мгновение, 12 – Грация).

У смородины кроваво-красная (*R. sanguineum*), являющейся родственной формой смородины клейкой (*R. sanguineum* subsp. *glutinosum*) – донора олигогенной устойчивости к почковому клещу и, предположительно, также гена *Ce* (Князев и Огольцова, 2004), SCAR маркер не выявлен. Данный факт, возможно, свидетельствует о присутствии у смородины кроваво-красной устойчивости, не обусловленной присутствием гена *Ce* или о произошедшей рекомбинации.

Таким образом, SCAR маркер верно определил наличие или отсутствие гена *Ce* у всех 37 сортообразцов.

В нашей работе SCAR маркер, разработанный в Шотландском Научно-Исследовательском Институте Сельскохозяйственных Культур (SCRI) и предложенный для маркер-вспомогательной селекции сортов черной смородины на устойчивость к почковому клещу, обусловленную присутствием гена *Ce* (Brennan et. al., 2009), был протестирован на ряде сортообразцов (преимущественно отечественной селекции) и верно показал присутствие или отсутствие гена.

6. Картирование гена *Rpf1*, контролирующего устойчивость к фитофторозному увяданию земляники (*P. fragariae*) и идентификация ДНК - маркеров данного гена

Анализ маркера SCAR-R1a и микросателлитных маркеров

Нами были протестированы 24 пары микросателлитных праймеров и SCAR маркер R1a на гибридной семье, полученной от скрещивания сортов Ялова-4 и Зенга Зенгана (64 семян).

В результате ПЦР анализа было амплифицировано от 2 (EMFn 228) до 14 (EMFV104, CFCT05a) фрагментов на пару праймеров, в среднем 7,7 фрагментов на пару праймеров.

В популяции по ряду локусов наблюдалось расщепление 1:1 (89 локусов) и 3:1 (16 локусов).

Картирование гена *Rpf1*.

Восемь микросателлитных маркеров и маркер SCAR-R1a были картированы вместе с геном устойчивости *Rpf1* на хромосоме 6d.

В результате картирования получена карта длиной 29 сантиморганид, которая включает 8 микросателлитных маркеров, SCAR маркер и ген *Rpf1*.

Вокруг гена *Rpf1* обнаружено несколько близко прилежащих маркеров. Некоторые из них занимают одну и ту же позицию. Это, вероятно, связано с ограниченным числом индивидов в картируемой популяции и отсутствием достаточного числа рекомбинантов, что ведет к недостаточному разрешению карты.

Порядок размещения микросателлитных локусов на полученной нами карте повторяет порядок размещения микросателлитных локусов на карте диплоидной земляники (рис. 5).

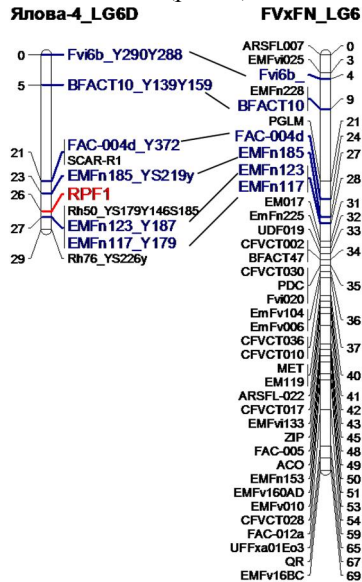


Рисунок 5. Сравнение порядка микросателлитных маркеров на полученной нами карте и карте диплоидной земляники, составленной на основании поколения F_2 от скрещивания *F. vesca* 815 x *F. nubicola* 601 (Sargent et al., 2006).

Таким образом, ген *Rpf1* был картирован в дистальной части хромосомы 6d вместе с 8 микросателлитными маркерами и маркером SCAR-R1a. Были обнаружены близко расположенные к гену маркеры, однако в связи с низким разрешением полученной карты окончательный ответ о порядке маркеров, окружающих ген, дать нельзя.

Тестирование близко расположенных маркеров на сортах и гибридных формах

На сортах и гибридных формах различного происхождения, включая сорта, для которых данные маркера SCAR-R1 и теста на устойчивость расходились (Van de Weg et al., 2000), нами было протестировано несколько близко расположенных маркеров, находящихся с геном *Rpf1* в одной фазе (на одной гомологичной хромосоме), при этом отсутствующие у восприимчивого родителя (таблица 4).

Маркер Emfn117 (аллель размером 179 п.н.) неверно идентифицировал 6 генотипов, верно идентифицировано 116. Rh50 (аллель 146 п.н.) верно идентифицировал все протестированные генотипы. SCAR-R1a неверно идентифицировал 19 генотипов. Fac4d (аллель 372 п.н.) встречается достаточно редко (у 4 из 89 образцов) и ассоциирована с геном *Rpf1* только в двух генотипах (Ялова-4 и форма 88239, унаследовавшая ген *Rpf1* от сорта Ялова-4).

Таблица 4. Результаты тестирования маркеров, картированных вблизи гена *Rpf1*, на сортах и гибридных формах

Локус, размер аллели	Генотип по локусу <i>Rpf1</i> маркером указан:	Число проанализированных генотипов		
		<i>Rpf1</i> *	<i>rpf1</i> *	всего
Emfn117, 179 п.н.	неверно	3	3	6
	верно	40	76	116
Rh50, 146 п.н.	неверно	0	0	0
	верно	41	79	120
SCAR-R1a, 285 п.н.	неверно	13	6	19
	верно	26	68	94
Fac4d, 372 п.н.	неверно	28	0	28
	верно	2	59	61

* - присутствие или отсутствие гена в образцах указано в соответствии с данными теста на устойчивость.

На основании полученных данных, наиболее вероятный порядок протестированных маркеров относительно гена *Rpf1* оказался следующим: Emfn117/ Rh50/ *Rpf1*/ SCAR-R1a.

Использование микросателлитного маркера Rh50 (аллель 146 п.н.) позволило верно идентифицировать генотипы всех исследованных образцов по гену *Rpf1*. Для всех остальных протестированных маркеров были обнаружены образцы, в которых в связи с произошедшей рекомбинацией связь между присутствием гена и маркера нарушилась.

Таким образом, ДНК маркеры SCAR-R1a и Rh50 (аллель размером 146 п.н.) могут быть использованы в качестве фланкирующих маркеров при отборе генотипов, несущих *Rpf1* ген - один из главных генов устойчивости земляники к фитофторозному увяданию.

ВЫВОДЫ

1. Использование RAPD анализа для изучения генетического разнообразия рода *Ribes* выявило высокий уровень полиморфизма (в среднем на праймер 98,5%), позволяющий различать даже близкородственные сорта. При этом коэффициенты генетических различий у группы образцов секции *Ribesia* выше, по сравнению с образцами секции *Eucoreosma*.

2. Идентифицированы RAPD фрагменты, специфичные для отдельных сортообразцов и таксономических групп рода *Ribes*. Полученные данные позволяют рассматривать RAPD анализ как перспективный метод изучения гибридов и различения генотипов в селекционной работе с крыжовником и смородиной.

3. Установлено, что анализ процента полиморфных фрагментов, рассчитанные коэффициенты генетических различий и топология дендрограммы поддерживают классификации, выделяющие красную смородину, черную смородину и крыжовник в отдельные подроды. Вместе с тем, смородино-крыжовниковые гибриды генетически ближе к проанализированным представителям черной смородины, чем к представителям крыжовника.

4. По данным топологии филогенетического дерева, исследованные образцы крыжовника генетически ближе к образцам секции черных смородин, нежели к образцам красной смородины; смородина кроваво красная ближе к кластеру образцов смородины и крыжовника, нежели к образцам красной смородины; а смородина золотистая является наиболее генетически отдаленной от всех исследованных представителей рода. При этом данные кластерного анализа не всегда отражают данные родословных на уровне сортов.

7. SDS-ПААГ спектры запасных белков семян черной смородины состоят из 4 зон. Для большинства сортообразцов (за исключением формы 3122-47-29) выявлен значительный полиморфизм генотипов семенного потомства, что свидетельствует о высокой степени гетерозиготности локусов, кодирующих белки семян. Выборки семян, полученных от самоопыления образцов, характеризуются определенными сочетаниями типов спектров зоны 3. По наличию очевидных визуальных различий спектров зоны 2 исследованные сортообразцы делятся на две группы (Искушение, Минай Шмырёв, 3268-4-36 входят в одну группу; Кипиана, 2091-39-32, 3190-44-57, 3122-47-29 – в другую).

8. SCAR маркер, амплифицируемый парой праймеров GMresa, был обнаружен у сортообразцов крыжовника, смородино-

крыжовниковых гибридов и смородины (Кипиана, Грация, В1613/17, 1448-14-24), имеющих ген *Se* по данным анализа родословных и селекционных наблюдений за поражаемостью почковым клещом. Данный маркер может быть использован для отбора генотипов, устойчивых к почковому клещу.

9. На хромосоме 6d картирован один из главных генов (*Rpf1*) устойчивости к фитофторозному увяданию земляники садовой (*P.fragariae*) и идентифицированы фланкирующие этот ген молекулярные ДНК маркеры.

Рекомендации для ботаники, биохимической генетики, популяционной генетики, молекулярной генетики, маркер-вспомогательной селекции.

1. Использовать RAPD анализ для изучения полиморфизма и филогении рода *Ribes* в связи с высоким уровнем выявленного полиморфизма. Продолжить исследования по использованию RAPD маркеров для идентификации сортов.

2. SDS-ПААГ электрофорез белков семян, полученных от самоопыления, выявляет меж- и внутрисортовой полиморфизм локусов запасных белков семян черной смородины. SDS-ПААГ электрофорез белков семян может быть использован в качестве дополнительного метода для генетической характеристики черной смородины.

3. Использовать SCAR маркер, амплифицируемый парой праймеров GMresa, для отбора генотипов черной смородины иммунных к почковому клещу.

4. SCAR-маркер R1a и микросателлитный маркер Rh50 могут быть использованы в качестве фланкирующих маркеров для маркер-вспомогательного отбора генотипов, несущих ген *Rpf1*, контролирующей устойчивость к фитофторозному увяданию.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК

1. **Пикунова, А.В.** Использование молекулярных маркеров для оценки исходного селекционного материала ягодных культур / А.В. Пикунова // Вестник Орел ГАУ, 2011. – №3 (30). – С.29-32.
2. **Пикунова, А.В.** Применение RAPD-анализа для изучения генетического полиморфизма и филогенетических связей у представителей рода *Ribes* L / А.В. Пикунова, Е.В. Мартиросян, С.Д. Князев, Н.Н. Рыжова // Экологическая генетика, 2011. – Том IX. – № 2. – С.34-44.
3. **Пикунова, А.В.** SDS-ПААГ электрофорез запасных белков семян смородины черной / А.В. Пикунова, Н.Н. Корниенко, Н.Е. Павловская, С.Д. Князев // Вестник Орел ГАУ, 2010. – №3(24). – С.5-8.

Публикации в других изданиях

1. **Пикунова, А.В.** Маркерная помощь селекции смородины черной (*R.nigrum*) на устойчивость к почковому клещу (*Cecidophiopsisribes*) / А.В. Пикунова, С.Д. Князев, Н.Е. Павловская // «Инновационный потенциал молодых ученых – АПК Орловской области»: сборник материалов региональной научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов, посвященной 35-летию Орел ГАУ – Орел: Изд-во Орел ГАУ, 2010. – С.252-256.
2. **Пикунова, А.В.** Оценка генетического полиморфизма смородины черной с помощью ДНК RAPD анализа и SDS-ПААГ электрофореза запасных белков семян / А.В. Пикунова, Н.Е. Павловская, С.Д. Князев, Е.З. Кочиева // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегиональный сборник научных работ. Выпуск 12 – ВГУ: 2010г. – С.161-165.
3. **Пикунова, А.В.** Методическое обеспечение изучения и идентификации сортов смородины черной по белковым и ДНК маркерам. / **А.В. Пикунова** // «Вклад молодых ученых в реализацию приоритетных направлений развития АПК»: сборник материалов региональной научно-практической конференции (Орел, 19-23 марта 2007) – Орел: Изд-во Орел ГАУ, 2007. – С. 32-33.
4. **Pikunova, Anna.** Phylogenetic relationships and genetic diversity in *Ribes* species revealed by RAPD markers / **Anna Pikunova**, Natalia Ryzhova, Elena Martirosyan, Ninel Pavlovckaya, Sergey Knyazev, Elena

Kochieva //International conference on foodomics, 28-29 May, 2009. Cesena, Italy. – Abstract book. – P.95.

5. Dijk Thijs van, **Pikunova Anna**, Yilmaz Hulya, Meulenbroek Bert et al. Towards QTL mapping in the cultivated, octoploid strawberry: the development of a public SSR marker linkage map / **Anna Pikunova** //International conference on foodomics, 28-29 May, 2009, Cesena, Italy. – Abstractbook. – P.118.

6. Князев, С.Д. Использование генетических ресурсов рода *Ribes* L. в селекции смородины черной / С.Д. Князев, **А.В. Пикунова**, А.Ю. Андрианова // Развитие научного наследия И.В. Мичурина по генетике и селекции плодовых культур: материалы междунар. науч.-практ. конф., посвященной 155-летию со дня рождения И.В. Мичурина – Изд-во ГНУ ВНИИГ и СПК имени И.В. Мичурина, 2010. – С.166-170.

Подписано в печать 10.11.2011 г.

Формат 60x90/16. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс.

Усл. печ. л. 1,0. Заказ 164. Тираж 100 экз.

Отпечатано в издательстве Орел ГАУ, 2011, Орел, Бульвар Победы, 19