

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

**«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ФГБОУ ВО «КубГУ»)**

**Факультет биологический
Кафедра генетики, микробиологии и биохимии**

Допустить к защите
Заведующий кафедрой
канд. биол. наук, доцент
А. А. Худокормов

«05» июня 2020 г.

Руководитель ООП
д-р биол. наук, профессор
С. Н. Щеглов

«05» июня 2020 г.

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
(МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ)**

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ *PI*, КОНТРОЛИРУЮЩИХ
УСТОЙЧИВОСТЬ К *PLASMOPARA HALSTEDII* (Farl.) berl. et de Toni
У ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ**

Работу выполнил Е. В. Бадьянов
(подпись)

Направление подготовки 06.04.01 Биология
(код, наименование)

Направленность (профиль) Генетика

Научный руководитель
д-р биол. наук, профессор В. В. Тюрин
(подпись)

Нормоконтролёр
д-р биол. наук, профессор С. Н. Щеглов
(подпись)

Краснодар
2020

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа 66 с., 23 рис., 6 табл., 83 источника.

Объектом исследования является подсолнечник масличный (*Helianthus annuus* L.).

ДНК-МАРКЕР, МАС, R-ГЕНЫ, ПРАЙМЕР, P. HALSTEDII, УСТОЙЧИВОСТЬ, ПОДСОЛНЕЧНИК

Цель работы – идентификация и апробация молекулярных маркеров для кластеров генов P15, P16 и P18; конструирование и валидация новых маркеров для локусов P15 и P18.

В процессе работы проводились экспериментальные молекулярно-генетические исследования девяти STS- и трех SSR-маркеров, а также тринадцати SNP-праймеров на линиях-дифференциаторах подсолнечника из международного тест-набора для идентификации рас *Plasmopara halstedii* и линиях селекции ВНИИМК.

По результатам исследования были отобраны три из 13 сконструированных SNP-праймеров 8R2, 5S2 и 5S3 для дальнейшего использования в качестве маркеров локусов P15 и P18 в линиях подсолнечника, а также молекулярный STS-маркер HaP3, пригодный для идентификации локуса P16. Данные маркеры были признаны пригодными для объединения в систему ДНК-маркеров для идентификации тесно сцепленных генов.

По результатам работы были даны рекомендации по использованию отобранных маркеров для проведения маркер-вспомогательной селекции на устойчивость подсолнечника к возбудителю ложной мучнистой росы. Также было рекомендовано продолжить апробацию этих праймеров на других линиях.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 Аналитический обзор	6
1.1 Систематика и ботаническая характеристика рода <i>Helianthus</i>	6
1.2 Болезни подсолнечника	8
1.2.1 Основные болезни подсолнечника	8
1.2.2 Ложная мучнистая роса	9
1.3 Селекция подсолнечника на устойчивость к болезням	10
1.4 Источники генов устойчивости	11
1.5 Гены устойчивости	12
1.6 Молекулярные маркеры	16
1.6.1 Классификация и основные понятия	16
1.6.2 Основные направления и преимущества использования	20
1.6.3 Маркирование генов устойчивости к <i>Plasmopara halstedii</i> у подсолнечника	23
2 Материалы и методы	25
2.1 Цели и задачи исследования	25
2.1.1 Цели исследования	25
2.1.2 Задачи исследования	25
2.1.3 Место проведения исследований	25
2.2 Растительный материал	25
2.3 Выделение ДНК	27
2.4 ПЦР анализ	27
3 Идентификация генов P1, контролирующих устойчивость к <i>Plasmopara halstedii</i> (Farl.) berl. et de Toni у линий подсолнечника, с использованием молекулярных маркеров	30
3.1 ПЦР анализ первой группы праймеров на линиях-дифференциаторах ..	30
3.2. ПЦР анализ первой группы праймеров на линиях селекции ВНИИМК	37
3.3 ПЦР анализ второй группы праймеров на линиях-дифференциаторах ..	42
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	53
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	55

ВВЕДЕНИЕ

Долгое время в селекции сельскохозяйственных культур применяли характеристики фенотипа. Эти признаки оценивались, как правило, при помощи измерений на разных этапах онтогенеза. Проведение таких работ требует значительных затрат труда и времени. Селекционный процесс затягивался на 10-15 лет.

В последнее время, благодаря активному развитию в сфере молекулярной биологии, для селекции хозяйственно-ценных признаков применяют оценку генотипа посредством использования молекулярных маркеров. С их применением значительно сокращаются трудовые затраты и ускоряется селекционный процесс. Также, с помощью молекулярных маркеров можно наиболее точно отслеживать трансгрессию генов между организмами. В итоге, селекционный процесс значительно удешевляется. Такой тип селекции, с использованием молекулярных маркеров, получил название MAS – marker assisted selection.

Характеристику любому организму на молекулярном уровне (на уровне отдельных генов) можно дать с помощью целой группы аналитических методов, составляющих основу молекулярно-генетического маркирования. Данные методы базируются на наших знаниях о структуре и функциях нуклеиновых кислот и механизмах реализации закодированной в них генетической информации. Молекулярные маркеры (также их называют ДНК-маркерами), в отличие от маркеров, основанных на анализе фенотипических проявлений признака или белкового состава, позволяют проводить оценку на уровне ДНК, которая является самой основой и главным источником всех процессов происходящих в живых организмах. В целом, суть молекулярно-генетического маркирования заключается в обнаружении специфических последовательностей ДНК, которые позволяют

охарактеризовать любой организм либо как набор отдельных генов, ответственных за те или иные признаки, либо как целостную генетическую структуру, отличную от других подобных ей на молекулярном уровне. Обнаружение и использование таких маркерных последовательностей открывает широкие перспективы для изучения и реализации генетических ресурсов организмов [Чесноков, Косолапов, 2016, 2019].

Селекция сельскохозяйственных культур на устойчивость к болезням и вредителям проводится на различных искусственно создаваемых инфекционных фонах путем оценки резистентности растений к возбудителям заболеваний. Как правило, в связи с особенностями жизненного цикла многих патогенов, полноценная оценка растения на устойчивость возможна только по прошествии почти всего периода его вегетации. В процессе селекции растений на устойчивость к заболеваниям применение ДНК-маркеров позволит проводить выбраковку нерезистентного материала еще на ранних этапах, что значительно сократит объем работ по созданию инфекционного фона, а дальнейшая работа будет проводиться только с теми растениями, которые были отобраны по молекулярным маркерам.

Подсолнечник является основной масличной культурой в нашей стране, поэтому развитие технологий возделывания и интенсификация селекционного процесса данной культуры являются приоритетными областями сельского хозяйства.

Значительные потери урожая подсолнечника связаны с поражением данной культуры различными заболеваниями. В частности, поражение подсолнечника ложной мучнистой росой (*Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni) вызывает потери урожая до 50-70% [Virányi, Gulya, Tourvierille de Labrouhe, 2015].

Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: user 0 7 genetic@bio.kubsu.ru / ID: 179
 Проверяющий: user 0 7 (genetic@bio.kubsu.ru / ID: 179)
 Организация: Кубанский Государственный университет
 Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://kubsu.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 871
 Начало загрузки: 10.06.2020 12:44:14
 Длительность загрузки: 00:00:12
 Имя исходного файла: Бадьянов Е.В. Финал версия 2.pdf
 Название документа: Бадьянов Е.В.
 Идентификация генов PI, контролирующих устойчивость к *Plasmodium halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni у линий подсолнечника, с использованием молекулярных маркеров
 Размер текста: 1 кБ
 Тип документа: Магистерская диссертация
 Символов в тексте: 84369
 Слов в тексте: 14167
 Число предложений: 1061

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)
 Начало проверки: 10.06.2020 12:44:26
 Длительность проверки: 00:00:29
 Корректировка от 10.06.2020 12:45:14
 Комментарии: [Автосохраненная версия]
 Модули поиска: Коллекция eLIBRARY.RU, Модуль поиска общеупотребительных выражений, Модуль поиска перефразирований Интернет, Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU, Коллекция РГБ, Сводная коллекция ЭБС, Модуль поиска Интернет, Кольцо вузов, Модуль поиска ИПС "Адилет", Модуль выделения библиографических записей, Модуль поиска переводных заимствований, Модуль поиска переводных заимствований по eLibrary (EnRu), Модуль поиска переводных заимствований по интернет (EnRu), Коллекция ГАРАНТ, Модуль поиска "КубГУ", Коллекция Медицина, Коллекция Патенты



ЗАИМСТВОВАНИЯ	САМОЦИТИРОВАНИЯ	ЦИТИРОВАНИЯ	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ
18,09%	0%	0,38%	81,53%

Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.
 Самоцитирование — доля фрагментов текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа, по отношению к общему объему документа.

Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.

Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.

Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.

Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.

Заимствования, самоцитирования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Доля в тексте	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска	Блоков в отчете	Блоков в тексте
[01]	0%	24,85%	не указано	не указано	раньше 2011	Модуль выделения библиографических записей	0	1
[02]	4,81%	4,99%	МАРКИРОВАНИЕ ЛОКУСОВ ...	http://elibrary.ru	14 Янв 2020	Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU	3	4
[03]	2,94%	3,65%	МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ...	http://elibrary.ru	25 Дек 2016	Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU	2	3
[04]	0,83%	3,33%	Молекулярно-генетическая ...	http://diplomba.ru	08 Янв 2017	Модуль поиска перефразирований Интернет	2	4
[05]	0%	2,39%	Молекулярно-генетическая ...	http://diplomba.ru	17 Мая 2016	Модуль поиска Интернет	0	14
[06]	0%	2,39%	Молекулярно-генетическая ...	http://fan5.ru	29 Сен 2017	Модуль поиска Интернет	0	14
[07]	0%	2,39%	Молекулярно-генетическая ...	http://diplomba.ru	03 Сен 2019	Модуль поиска Интернет	0	14
[08]	0%	2,39%	Молекулярно-генетическая ...	https://knowledge.allbest.ru	08 Фев 2019	Модуль поиска Интернет	0	14
[09]	0%	2,33%	Скачать	http://ksu.edu.kz	27 Ноя 2018	Модуль поиска Интернет	0	12
[10]	0%	2,28%	Молекулярно-генетическая ...	https://bibliofond.ru	08 Фев 2019	Модуль поиска Интернет	0	13
[11]	0%	2,28%	Молекулярно-генетическая ...	https://bibliofond.ru	17 Мар 2020	Модуль поиска Интернет	0	13
[12]	0%	2,21%	Молекулярные маркеры в г...	https://studbooks.net	17 Мар 2020	Модуль поиска Интернет	0	12

ОТЗЫВ

о выпускной квалификационной работе (магистерской диссертации)

Бадьянова Евгения Витальевича

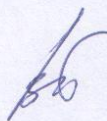
«Идентификация генов PI, контролирующей устойчивость к *Plasmodium halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni у линий подсолнечника, с использованием молекулярных маркеров»

В период учебы на кафедре и в период практики в Федеральном научном центре «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта» Бадьянов Е.В. проявил себя как трудолюбивый, грамотный, способный к научной работе студент. Данные, положенные в основу дипломной работы получены самостоятельно и хорошо проанализированы. В период подготовки диплома, Бадьянов Е.В. проработал большой объем литературы по теме, а также освоил ряд современных молекулярно-генетических методов.

Результаты исследований были получены дипломником как сложившимся научным сотрудником института и нашли отражение в нескольких публикациях. Считаю, что такие студенты как Е.В. Бадьянов будут достойными представителями выпускников – генетиков Кубанского государственного университета.

Дипломная работа удовлетворяет всем необходимым требованиям и может быть представлена к защите.

Научный руководитель,
д-р. биол. наук, доцент



В.В. Тюрин

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу (магистерскую диссертацию) Бадьянова Евгения Витальевича студента 2 курса магистратуры биологического факультета Кубанского государственного университета направления 06.04.01 на тему: «Идентификация генов P1, контролирующих устойчивость к *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni у линий подсолнечника, с использованием молекулярных маркеров»

Цель работы данной работы заключалась в идентификации и апробации молекулярных маркеров для кластеров генов P15, P16 и P18; конструирование и валидация новых маркеров для локусов P15 и P18.

В процессе работы проводились экспериментальные молекулярно-генетические исследования девяти STS- и трех SSR-маркеров, а также тринадцати SNP-праймеров на линиях-дифференциаторах подсолнечника из международного тест-набора для идентификации рас *Plasmopara halstedii* и линиях селекции ВНИИМК.

По результатам исследования были отобраны три из 13 сконструированных SNP-праймеров 8R2, 5S2 и 5S3 для дальнейшего использования в качестве маркеров локусов P15 и P18 в линиях подсолнечника, а также молекулярный STS-маркер HaP3, пригодный для идентификации локуса P16. Данные маркеры были признаны пригодными для объединения в систему ДНК-маркеров для идентификации тесно сцепленных генов.

Результаты выпускной квалификационной работы могут быть использованы в селекционных исследованиях подсолнечника, а сама работа заслуживает положительной оценки.

Доцент кафедры биотехнологии,
биохимии и биофизики ФГБОУ
ВО Кубанский ГАУ, канд. биол. наук



С.А. Волкова