

На правах рукописи



Макаренко Максим Станиславович

**ИЗМЕНЧИВОСТЬ ХЛОРОПЛАСТНОГО И
МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМОВ У ОДНОЛЕТНИХ И
МНОГОЛЕТНИХ ВИДОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА (*HELIANTHUS L.*)**

03.02.07 – Генетика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2019

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Южный федеральный университет»

**Научный
руководитель:**

Усатов Александр Вячеславович
доктор биологических наук, профессор
профессор кафедры генетики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет»

**Официальные
оппоненты:**

Матвеева Татьяна Валерьевна
доктор биологических наук, доцент
профессор кафедры генетики и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Жуков Владимир Александрович
кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник, и.о. заведующего лабораторией генетики растительно-микробных взаимодействий
Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии»

**Ведущее
учреждение:**


Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Защита диссертации состоится «27» марта 2019 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 006.041.02. при Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова по адресу: 190121, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 44.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова и на сайте института: <https://www.vir.nw.ru/dissertatsionnyj-sovet/>

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Елена Вячеславовна Рогозина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Доминирующая роль ядра в растительной клетке неопровержимо доказана многочисленными генетическими исследованиями. Однако в пластидах и митохондриях растительных клеток локализованы еще и собственные генетические системы (Stanley et al., 2015). Эти системы функционируют различно, но взаимосвязано. Взаимодействие генетических систем приводит к тому, что каждая из них влияет на другие, что в свою очередь отражается на эволюционных процессах (Woodson, Chory, 2008).

В основном, при рассмотрении механизмов видообразования во внимание принимаются только ядерные гены, в то время как роль цитоплазматических генов, часто недооценивают. Тем не менее, изучение структурно-функциональной организации геномов органелл также актуально с точки зрения современной систематики и филогенетики (Zhang et al., 2012).

Следует заметить, что к настоящему времени в базу данных NCBI включены полные последовательности хлоропластной ДНК (хлДНК) 3 однолетних и 8 многолетних видов подсолнечника, а митохондриальной ДНК (мтДНК) только одного вида - *Helianthus annuus* L., что явно недостаточно для корректного анализа межвидовой внеядерной изменчивости в роде *Helianthus* L. В связи с этим исследование изменчивости хлоропластных и митохондриальных генов у однолетних и многолетних видов подсолнечника достаточно актуально.

В настоящее время в коммерческом производстве семян подсолнечника доминируют гетерозисные гибриды, полученные на основе цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) только одного типа РЕТ1, открытого П. Леклерком еще в 1966 году у межвидового гибрида *H. petiolaris* Nutt. × *H. annuus* L. (Leclercq, 1969). Такая генетическая унификация цитоплазмы возделываемых гибридов может привести к различным негативным явлениям, например, массовым эпифитотиям (Miller, 1996).

Поскольку ЦМС растений представляет собой не только прекрасную модель, для изучения взаимодействия ядерных и цитоплазматических генетических систем клетки, но и эффективную мутацию для производства гибридных гетерозисных семян (Chen, Liu, 2014; Hu et al., 2014), дальнейший перевод лучших селекционных линий на новые типы ЦМС позволит избежать в будущем рисков, связанных с унификацией цитоплазмона у коммерческих гибридов подсолнечника.

Степень разработанности темы. Полиморфный род *Helianthus* L., по оценкам разных систематиков, включает от 10 до 254 видов (Анащенко, 1979; Schilling, Heiser, 1981; Rieseberg, 1991; Гаврилова, Анисимова, 2003). Эти классификации в основном базируются на анализе морфологических признаков растений, ареалах видов, кариотипах и результатах скрещиваний. В последнее время для вопросов систематики, включая и род *Helianthus* L., все шире внедряются молекулярные методы анализа, в том числе высокопроизводительное секвенирование ДНК органелл (Bock et al., 2014; Stephens et al. 2015). Однако полные нуклеотидные последовательности хлДНК и мтДНК определены только у небольшого числа видов подсолнечника, что явно недостаточно для корректного анализа межвидовой внеядерной изменчивости в данном таксоне.

Цитоплазматическая мужская стерильность растений, как правило, вызвана нарушениями в структуре мтДНК (Horn et al., 2014). На сегодняшний день у подсолнечника выделено более 70 типов ЦМС (Ardila et al., 2010; Reddemann, Horn, 2018). Однако только для двух из них: PET1 (Kohler et al. 1991, Horn et al., 1996) и PET2 (Reddemann, Horn, 2018; Makarenko et al., 2018) выявлены специфичные реорганизации структуры митохондриальных геномов, связанные с ЦМС фенотипом.

Цель и задачи исследования. Целью работы является определение уровня изменчивости хлДНК и мтДНК у однолетних и многолетних видов подсолнечника (*Helianthus* L.) и изучение особенностей структурно-функциональной организации хлоропластных и митохондриальных геномов у фертильной линии HA89 и ее ЦМС аналогов на основе однолетних (PET1, PET2 - *H. petiolaris*, ANN2 - *H. annuus*) и многолетнего (MAX1 - *H. maximilliani*) видов рода *Helianthus* L.

Исходя из поставленной цели, были сформулированы следующие задачи:

1. Исследовать полиморфизм хлоропластных и митохондриальных генов у образцов пяти однолетних и 16-и многолетних видов подсолнечника из коллекции ВИР.

2. Провести высокопроизводительное секвенирование и определить уровень изменчивости хлДНК и мтДНК у линий культурной и дикорастущей форм *H. annuus* L.

3. Провести секвенирование, сборку и аннотацию хлоропластных и митохондриальных геномов у фертильной линии HA89 и ее стерильных аналогов HA89(PET1), HA89(PET2), HA89(ANN2) и HA89(MAX1).

4. Определить структурные и функциональные особенности митохондриальных геномов у стерильных аналогов линии HA89 с различными типами ЦМС: PET1, PET2, ANN2 и MAX1.

Научная новизна исследования. Впервые определен уровень полиморфизма хлоропластных (*atpB*, *matK*, *rbcL*) и митохондриальных (*atp1*, *matR*, *nad4*) генов у образцов 5 однолетних и 16 многолетних видов рода *Helianthus* L. из коллекции ВИР. Проведено полногеномное секвенирование, сборка, аннотация и сравнительный анализ хлоропластных и митохондриальных геномов культурной и дикорастущей форм *H. annuus* L. Определены специфичные реорганизации митохондриальных геномов у ЦМС линий НА89(РЕТ1), НА89(РЕТ2), НА89(МАХ1), НА89(АНН2).

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные о полиморфизме хлоропластных и митохондриальных генов образцов 21 вида подсолнечника вносят вклад в решение проблемы микроэволюции рода *Helianthus* L. Полиморфные сайты хлДНК и мтДНК, локализованные у культурного и дикорастущего подсолнечника *H. annuus* L. в результате анализа полных нуклеотидных последовательностей внеядерных геномов, являются информативными мишенями для генотипирования селекционных линий и образцов.

Данные об уровне мутационной изменчивости внеядерных геномов у аллоплазматических ЦМС линий подсолнечника вносят вклад в решение фундаментальной проблемы взаимодействия ядерных и цитоплазматических генетических систем растительной клетки, а также в изучение механизмов возникновения ЦМС у цветковых растений. Дальнейший перевод лучших селекционных линий на новые типы ЦМС позволит избежать в будущем рисков, связанных с унификацией цитоплазмона у гибридов подсолнечника.

Аннотированные полногеномные последовательности мтДНК ЦМС линий НА89(РЕТ1), НА89(РЕТ2), НА89(МАХ1) депонированы в международную базу данных NCBI GenBank под номерами MG735191.1, MG770607.2, MN704580.1.

Результаты диссертационной работы включены в учебные курсы для студентов, специализирующихся на кафедре генетики Южного федерального университета.

Методология и методы исследования. В работе были использованы три уникальные генетические модели. Первая представляет собой образцы однолетних и многолетних видов рода *Helianthus* L. из коллекции ВИР. Вторая включает 4 линии культурного и 1 дикорастущего подсолнечника *H. annuus*. Третья представлена фертильным и стерильными аналогами линии НА89 подсолнечника с различными типами ЦМС (РЕТ1, РЕТ2, АНН2, МАХ), полученными на основе однолетних и многолетнего видов рода *Helianthus* L. Используя современные методы молекулярной генетики, сравнительной геномики и биоинформатики были определены и проанализированы последовательности хлоропластных и митохондриальных генов, а также исследован уровень изменчивости внеядерных геномов, что позволило в полной мере реализовать цель и задачи работы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Частота мутаций в хлоропластных генах у представителей однолетних и многолетних видов рода *Helianthus* L. многократно превышает этот показатель в митохондриальных генах.

2. Дикорастущий подсолнечник *H. annuus* L. значительно отличается от селекционных линий по уровню изменчивости как хлДНК, так и мтДНК.

3. У стерильных аналогов линии НА89 с различными типами ЦМС частота точковых мутаций в хлДНК значительно выше, чем в мтДНК, однако только для митохондриальных геномов характерно наличие крупных реорганизаций структуры, уникальных для каждого типа ЦМС.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на II и III Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» (Минск, 2015, 2016); II Международной научно-практической конференции «Наука и образование сегодня: теория, практика и инновации – 2015» (Темрюк, 2015); Всероссийской конференции с международным участием «50 лет ВОГиС: успехи и перспективы» (Москва, 2016); Международной научной конференции, посвященной 90-летию Ботанического сада Южного федерального университета «Современные технологии в изучении биоразнообразия и интродукции растений» (Ростов-на-Дону, 2017); Научно-практической конференции с международным участием «Генетика - фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции» (Ростов-на-Дону, 2017); Международной школе-конференции молодых ученых «Наука и молодежь: фундаментальные и прикладные проблемы в области селекции и генетики сельскохозяйственных культур» (Зерноград, 2017); XXV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2018» (Москва, 2018)

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 17 работ, из них 5 работ в изданиях, индексируемых в библиографических базах данных Scopus и Web of Science; 2 базы данных.

Связь с другими проектами.

Исследование выполнено в рамках государственного задания Минобрнауки России, проект № 6.929.2017/4.6.

Объем и структура диссертации. Работа состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка литературы, приложений. Диссертация изложена на 163 страницах, включает 30 таблиц и 18 рисунков. Список цитируемой литературы содержит 132 источника, из них 123 на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. Обзор литературы

В обзоре литературы кратко охарактеризован род *Helianthus* L. Рассмотрены особенности структурно-функциональной организации хлоропластной и митохондриальной ДНК у цветковых растений. Приведены современные данные о реорганизациях митохондриальных геномов, непосредственно связанные с ЦМС фенотипом у растений.

ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили образцы 5 однолетних (*H. annuus* L., *H. argophyllus* T. & G., *H. debilis* Nutt., *H. petiolaris* Nutt., *H. praecox* Engelm. & Gray) и 16 многолетних (*H. californicus* DC., *H. ciliaris* DC., *H. decapetalus* L., *H. divaricatus* L., *H. giganteus* L., *H. grosseserratus* Mar., *H. hirsutus* Raf., *H. laevigatus* T. & G., *H. maximiliani* Schr., *H. mollis* Lam., *H. occidentalis* Riddell., *H. rigidus* Nutt., *H. simulans* Watson, *H. smithii* Heiser, *H. strumosus* L., *H. tuberosus* L.) видов подсолнечника из коллекции ВИР, а также инбредная линия 3629 культурного и линия 398941 дикорастущего подсолнечника *H. annuus* из коллекции ЮФУ, линия HA89 и ее ЦМС аналоги HA89(PET1), HA89(PET2), HA89(ANN2), HA89(MAX1) из коллекции ВИР. ЦМС линии были получены на основе однолетних *H. petiolaris* (PET1, PET2), *H. annuus* (ANN2) и многолетнего *H. maximilianii* (MAX1) видов рода *Helianthus* L.

Хлоропласты и митохондрии у подсолнечника фракционировали методом центрифугирования в сахарозном буфере следующего состава: 50 мМ Трис-HCl (pH 7.8), 0,4 М сахароза, 5 мМ ЭДТА, 0,2 % бычий сывороточный альбумин и 0,2 % 2-меркаптоэтанол. Выделение ДНК из фракций органелл или гомогената листьев подсолнечника проводили с использованием коммерческого набора для выделения ДНК из растительных тканей «Сорб-ГМО-Б» (Синтол, Россия). Концентрацию выделенной ДНК измеряли с помощью флуориметра QuantiFluor ST (Promega, США) и набора реактивов QuantiFluor dsDNA System (Promega, США).

Для секвенирования по Сэнгеру были разработаны праймеры (программа Primer BLAST) комплементарные участкам хлоропластных (*atpB*, *matK*, *rbcL*) и митохондриальных (*atp1*, *matR*, *nad5*) генов подсолнечника. ПЦР проводили с помощью набора реактивов Tersus Plus PCR kit (Евроген, Россия) в термоциклере C1000 (Bio-Rad, США). ПЦР продукты очищали и затем, с использованием набора флуоресцентно меченных дидезоксинуклеотидов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США), определяли нуклеотидные последовательности ампликонов на генетическом анализаторе ABIPrism 3130xl (Applied Biosystems, США).

Библиотеки для высокопроизводительного секвенирования были приготовлены с использованием набора реактивов Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina, США). Библиотеки секвенировали на трех платформах фирмы Illumina (США): MiSeq, NextSeq 500 и HiSeq 2000 с использованием наборов для секвенирования – MiSeq Reagent Kit v2 500-cycles, High Output v2 kit и TruSeq SBS Kit v3-HS соответственно. Для каждой из библиотек были получены специфичные по числу и размеру парные короткие чтения (риды): линия 3629 - 5806412 ридов размером 100 п.н.; линия 398941 - 4058566 ридов размером 100 п.н.; фертильная линия НА89 - 13240056 ридов размером 150 п.н.; ЦМС линия НА89(PET1) - 14758068 ридов размером 150 п.н.; ЦМС линия НА89(MAX1) - 10174498 ридов размером 150 п.н.; ЦМС линия НА89(PET2) - 4471774 и 4931318 ридов размером 125 и 250 п.н.; ЦМС линия НА89(ANN2) - 3063836 и 3305268 ридов размером 125 и 250 п.н.

Качество полученных ридов оценивали с помощью программы FastQC. Используя программу Trimmomatic проводили тримминг ридов, содержащих адаптерную последовательность или имеющих качество прочтения (Q-score) ниже 25. Выравнивание коротких чтений на референсные геномы проводили с использованием программы Bowtie 2. В качестве референсных нуклеотидных последовательностей использовали геномы органелл подсолнечника из базы данных NCBI – пластидный геном линии НА383 (NC_007977.1) и митохондриальный геном линии НА412 (NC_023337.1). Поиск вариантных сайтов осуществляли с помощью набора программ samtools/bcftools с последующей валидацией полученных данных с помощью программы визуализации геномных данных IGV. Сборку геномов *de novo* проводили с использованием геномного ассемблера SPAdes v 3.10.1. Контиги объединяли в скафолды путем их выравнивания относительно друг друга, используя программу BLAST. Сборку геномов верифицировали как биоинформатическим методом с помощью программ QUAST и CONTIGuator, так и методом ПЦР-анализа с последующим секвенированием ампликонов по Сэнгеру. Аннотирование и поиск открытых рамок считывания осуществляли с помощью программ ORFfinder, BLAST и MITOFY. Для графического отображения геномных карт использовали программу OGDRAW. Наличие трансмембранных доменов в полипептидах определяли с помощью TMHMM Server v. 2.0.

РНК выделяли из 3-4 пары листьев растений с использованием коммерческого набора Extract RNA (Евроген, Россия). В каждом образце исследовали по 10 растений. РНК обрабатывали ДНКазой I и затем проводили реакции обратной транскрипции с помощью набора реактивов MMLV RT kit (Евроген, Россия). Транскрипционную активность генов анализировали методом количественной ПЦР.

ГЛАВА 3. Результаты и их обсуждение

3.1. Изменчивость генов и некодирующих локусов хлоропластной и митохондриальной ДНК у однолетних и многолетних видов подсолнечника

Для определения уровня изменчивости хлДНК и мтДНК у видов подсолнечника были секвенированы участки трех хлоропластных – *atpB*, *rbcL*, *matK* и трех митохондриальных – *atp1*, *nad5*, *matR* генов у образцов 5 однолетних и 16 многолетних видов подсолнечника (рис. 1). Выбор данных цитогенов был сделан не случайно. Согласно многочисленным данным литературы (Qiu et al., 2006; Mower et al., 2007; Матвеева и др., 2011; Patwardhan et al., 2014) эти гены представляют собой высокоинформативные мишени в хлДНК и мтДНК для проведения молекулярного штрих-кодирования и филогенетического анализа цветковых растений.

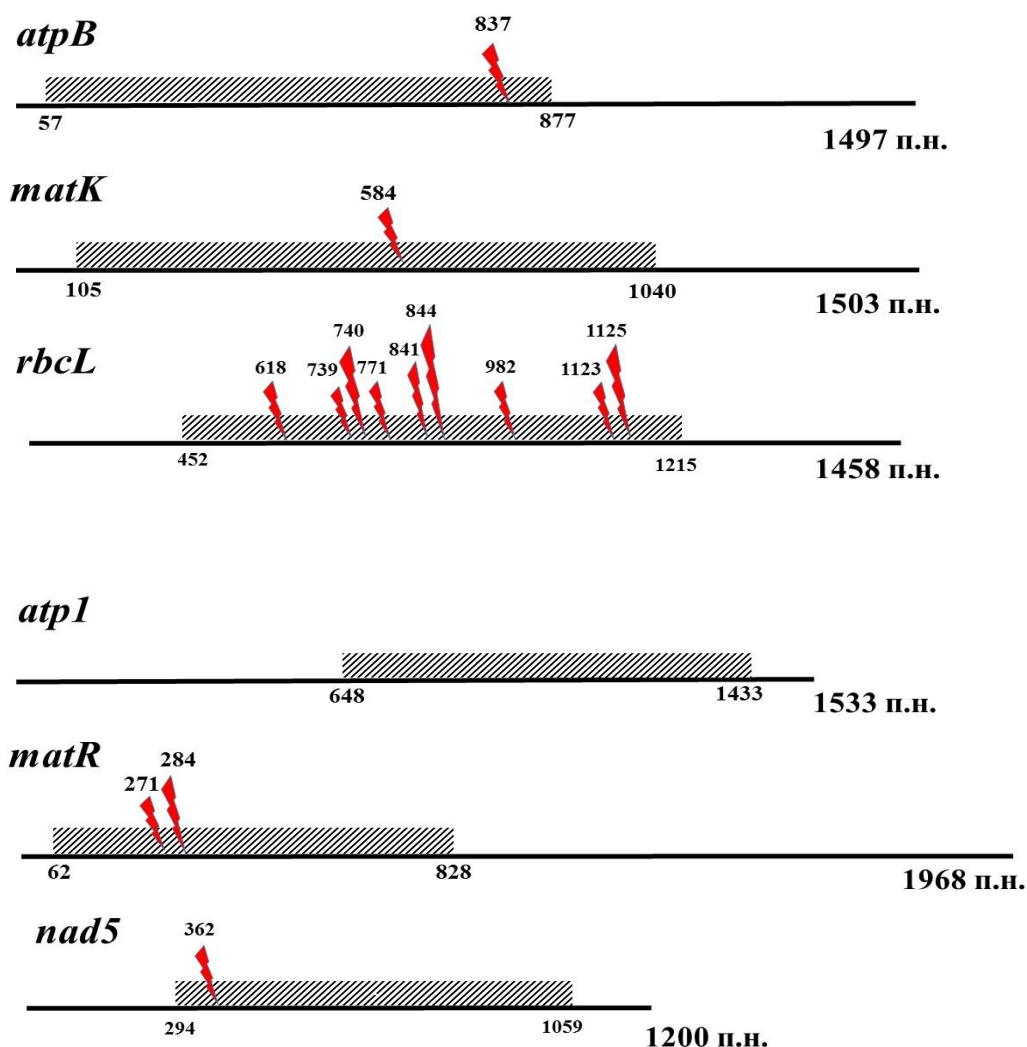


Рисунок 1. Схематичное изображение секвенированных участков (заштрихованная область) хлоропластных генов *atpB*, *matK*, *rbcL*, митохондриальных генов *atp1*, *matR*, *nad5* и позиции локализованных в них точковых мутаций.

В результате анализа хлоропластных генов (*atpB*, *matK*, *rbcL*) были выявлены, две видоспецифичные мутации: одна несинонимичная мутация в 837 позиции гена *atpB* у *H. strumosus* и одна синонимичная мутация в 618 позиции гена *rbcL* у *H. ciliaris*. Также локализованы SNP, позволяющие кластеризовать виды рода *Helianthus* L. на однолетние и многолетние: одна несинонимичная мутация в 584 позиции гена *matK* и восемь мутаций (позиции 739, 740, 771, 841, 844, 982, 1123, 1125) в гене *rbcL*.

Анализ нуклеотидных последовательностей митохондриальных генов - *atp1*, *nad5* и *matR* показал, что уровень их изменчивости значительно ниже по сравнению с хлоропластными генами. Так, например, нуклеотидный состав гена *atp1* был идентичным у всех исследуемых видов. В 362 позиции гена *nad5* был обнаружена несинонимичная мутация у двух образцов многолетних видов подсолнечника - *H. californicus* и *H. maximiliani*. В гене *matR* были обнаружены два SNP, а именно в 271 позиции у *H. strumosus* и в 284 позиции у *H. ciliaris*. При этом обе эти мутации в гене *matR* являются несинонимичными. Таким образом, у образцов 5 однолетних и 16 многолетних видов подсолнечника в исследуемых участках хлоропластных генов *atpB*, *matK*, *rbcL* было обнаружено 11 SNP, а в случае митохондриальных генов *atp1*, *nad5*, *matR* - всего 3 SNP.

В связи с тем, что митохондриальные гены продемонстрировали высокий уровень консерватизма у представителей рода *Helianthus* L., мы провели анализ некодирующих последовательностей (SSR локусов) мтДНК. На основе данных полиморфизма 10 митохондриальных SSR локусов были определены митотипы для каждого вида подсолнечника.

3.2. Сравнительный анализ хлоропластного и митохондриального геномов у культурного и дикорастущего подсолнечника (*Helianthus annuus* L.)

С целью определения уровня внутривидовой изменчивости внеядерных геномов *H. annuus* L. было проведено полногеномное секвенирование хлДНК и мтДНК у линий HA89 и 3629 культурного и линии 398941 дикорастущего подсолнечника. В качестве примера на рисунке 2 представлен результат сборки и аннотации хлоропластного генома линии HA89. Для повышения информативности результатов в сравнительный анализ хлоропластных геномов мы включили дополнительно данные из базы NCBI полных нуклеотидных последовательностей хлДНК еще двух линий культурного подсолнечника - HA383 (GenBank ID NC_007977.1) и SF193 (GenBank ID CM007907.1). В результате сравнительного анализа хлДНК 4-х линий HA89, 3629, HA383, SF193 культурного подсолнечника и

HA89 только по 2 сайтам – 1 SSR и 1 SNP. Большая часть полиморфных сайтов хлДНК была обнаружена при сравнении культурной и дикорастущей форм подсолнечника. Так, например, хлоропластный геном линии 398941 дикорастущей формы отличается от хлДНК линии HA383 культурной формы по 23 SSR, 21 SNP и 10 INDEL, то есть суммарно по 54 из 62 выявленных вариантных сайтов.

Следующим этапом исследования была оценка внутривидовой изменчивости митохондриального генома *H. annuus* L. На рисунке 3 проиллюстрирован результат сборки и аннотации митохондриального генома линии HA89.

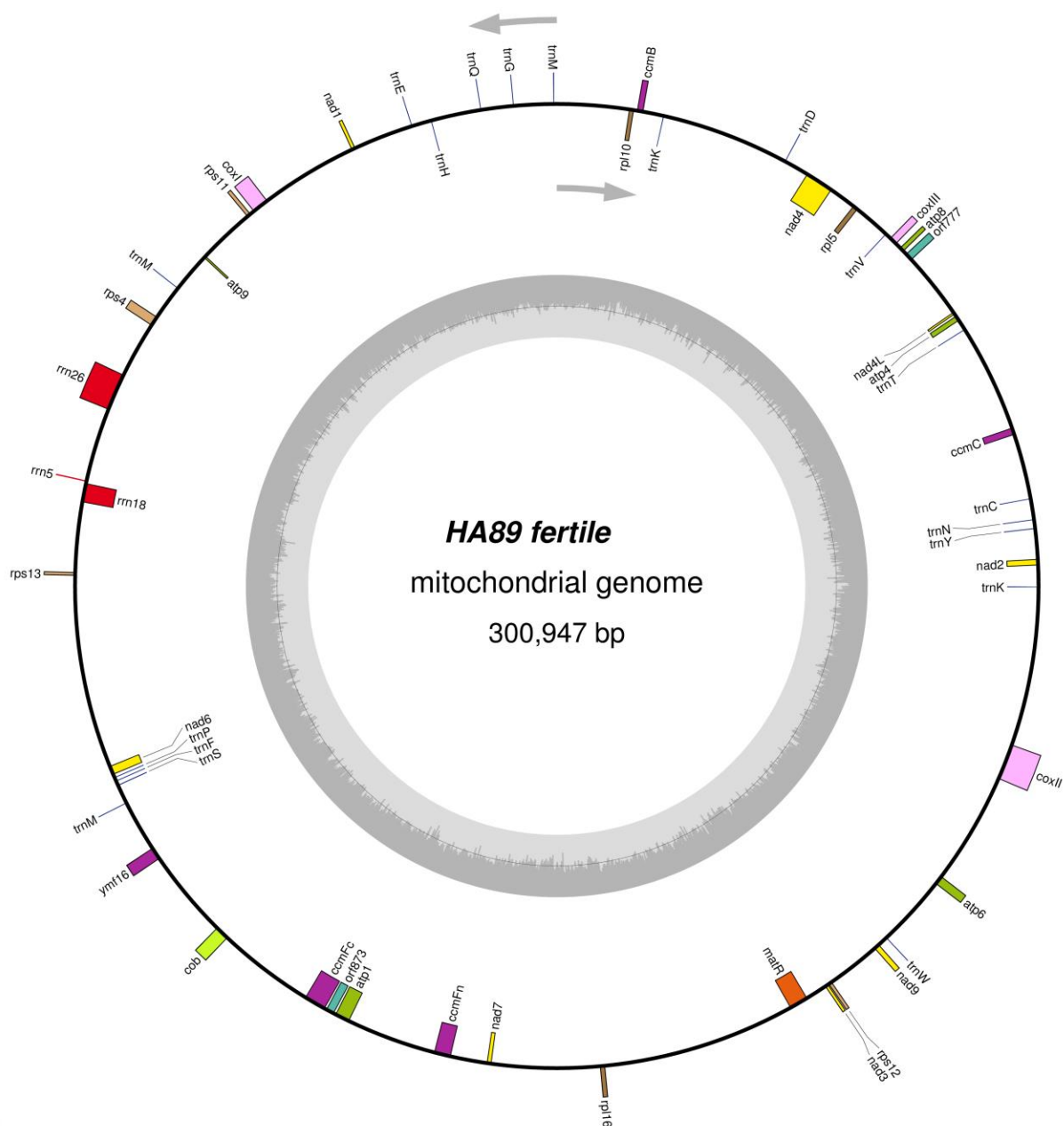


Рисунок 3. Генетическая карта митохондриального генома линии HA89 подсолнечника. Внутреннее кольцо отражает содержание GC-оснований (темно-серая область) и AT-оснований (светло-серая область). Стрелками обозначены направления транскрипции генов.

Для повышения информативности результатов в сравнительный анализ митохондриальных геномов мы включили дополнительно данные из базы NCBI полных нуклеотидных последовательностей мтДНК еще двух линий культурного подсолнечника - HA412 (GenBank ID NC_023337.1) и SF193 (GenBank ID CM007908.1). Сравнительный анализ структуры мтДНК 4-х линий HA89, 3629, HA412, SF193 культурного и линии 398941 дикорастущего подсолнечника позволил локализовать 24 вариантных сайта в том числе: 11 SSR, 9 SNP и 4 INDEL.

Все четыре линии культурного подсолнечника различаются по 13 сайтам: 9 SSR, 2 SNP и 2 INDEL. Митохондриальный геном линии HA412 отличается от геномов других линий 1 SNP и 2 INDEL, линии SF193 – 2 SSR и 1 SNP, линии 3629 – 5 SSR. Большая часть полиморфных сайтов мтДНК, как и в случае с хлДНК, была обнаружена при сравнении культурной и дикорастущей форм подсолнечника. Так митохондриальный геном линии 398941 дикорастущей формы отличается от генома линии HA412 по 20 из 24 всех полиморфных сайтов мтДНК: 9 SSR, 7 SNP и 4 INDEL.

Результаты сравнительного анализа внеядерной ДНК 4-х линий HA412, SF191, HA89, 3629 культурной формы и линии 398941 дикорастущей формы подсолнечника суммированы в таблице 1. Необходимо принять во внимание, митохондриальный геном подсолнечника (*H. annuus* L.) содержит почти в два раза больше нуклеотидов, по сравнению с хлоропластным геномом. В связи с этим мы ввели относительный показатель частоты полиморфизма (табл. 1), рассчитанный как отношение числа выявленных полиморфных сайтов к общему числу нуклеотидов генома.

Таблица 1. Количество полиморфных сайтов, выявленных в хлДНК и мтДНК у культурной (КФ) и дикорастущей (ДФ) форм *H. annuus* L.

Тип полиморф изма	Хлоропластный геном						Митохондриальный геном					
	КФ		ДФ		Общее		КФ		ДФ		Общее	
	Абс.	Отн.	Абс.	Отн.	Абс.	Отн.	Абс.	Отн.	Абс.	Отн.	Абс.	Отн.
SSR	9	0,059	23	0,152	29	0,192	9	0,030	9	0,030	11	0,037
SNP	3	0,019	21	0,139	23	0,152	2	0,007	7	0,023	9	0,030
INDEL	7	0,046	10	0,066	10	0,066	2	0,007	4	0,013	4	0,013
Σ	19	0,126	54	0,357	62	0,411	13	0,043	20	0,066	24	0,080

Из результатов, приведенных в таблице 1 можно заключить, что у культурного и дикорастущего подсолнечника (*H. annuus* L.) изменчивость хлоропластного генома в 5,1 раз выше, чем митохондриального, и дикорастущий подсолнечник значительно отличается от селекционных линий, как по уровню изменчивости хлДНК, так и мтДНК.

3.3. Особенности структурно-функциональной организации геномов хлоропластов и митохондрий у фертильного и стерильных аналогов линии НА89 подсолнечника с различными типами ЦМС

Высокопроизводительное секвенирование ДНК оргanelл позволило нам провести сборку *de novo* и аннотацию хлоропластных и митохондриальных геномов 4-х линий аналогов: НА89(РЕТ1), НА89(РЕТ2), НА89(АНН2) и НА89(МАХ1). Хлоропластные и митохондриальные геномы этих стерильных линий сравнивали с фертильным аналогом НА89, особенности структурной организации хлДНК и мтДНК которого были рассмотрены выше.

Размер и GC-состав хлДНК у фертильного и стерильных аналогов линии НА89 подсолнечника отличались в довольно узких пределах (табл. 2).

Таблица 2. Первичная структура хлДНК у фертильного и стерильных аналогов линии НА89 подсолнечника с различными типами ЦМС.

Линия	Размер хлДНК, п.н.	LSC , п.н.	SSC, п.н.	IR (2x), п.н.	GC-состав, %
Фертильная линия НА89	151094	83527	19147	24210x2	37,62
НА89(РЕТ1)	151110	83545	19145	24210x2	37,61
НА89(РЕТ2)	151127	83565	19138	24212x2	37,60
НА89(АНН2)	151147	83605	19118	24212x2	37,61
НА89(МАХ1)	151138	83601	19113	24212x2	37,61

В результате сравнительного анализа последовательностей хлДНК линий на основе различных типов ЦМС и фертильного аналога всего выявлено 447 полиморфных сайтов: 57 SSR, 315 SNP и 75 INDEL. 119 из 315 точковых мутаций были обнаружены в кодирующих участках генов, из них 58 мутаций являются несинонимичными. В таблице 3 суммированы локализованные нами полиморфные сайты хлДНК у исследуемых линий. Среди стерильных аналогов наибольшее число вариантных сайтов (246) в сравнении с фертильной линией идентифицировано у НА89(МАХ1), а наименьшее (49) – у НА89(РЕТ1).

Таблица 3. Число полиморфных сайтов, выявленных в хлДНК у стерильных аналогов линии HA89 подсолнечника с различными типами ЦМС.

Линия	Тип последовательности										
	Кодирующая ДНК		Интроны			Межгенные регионы			Всего		
	SNP	INDEL	SSR	SNP	INDEL	SSR	SNP	INDEL	SSR	SNP	INDEL
HA89(PET1)	9	0	5	4	0	16	10	5	21	23	5
HA89(PET2)	54	1	7	13	5	29	87	33	36	154	38
HA89(ANN2)	52	0	6	10	4	32	80	32	38	142	36
HA89(MAX1)	70	0	5	11	2	35	114	38	40	196	40

В отличие от хлДНК в мтДНК стерильных аналогов линии HA89 были обнаружены не только полиморфные сайты, но и крупные (>100 п.н.) реорганизации структуры, уникальные для каждой из исследуемых линий.

Размер митохондриального генома ЦМС линии HA89(PET1) составил 305217 п.н., что превышает на 4270 п.н. соответствующий показатель фертильной линии HA89. В межгенном регионе *cob-atp1* мтДНК HA89(PET1) локализованы 3 крупные перестройки, представленные инверсией размером 11852 п.н., инсерцией размером 4732 п.н. и делецией размером 451 п.н. Эти изменения структуры мтДНК привели к возникновению 2-х открытых рамок считывания *orf306* и *orfH522*. Кроме крупных перестроек также выявлены полиморфные сайты: 8 SSR, 7 SNP и 2 INDEL.

Размер митохондриального генома ЦМС линии HA89(PET2) составил 316582 п.н., что превышает на 15635 п.н. соответствующий показатель фертильной линии HA89. В мтДНК HA89(PET2) обнаружено 6 крупных реорганизаций митохондриального генома: 2 транспозиции, 2 делеции и 2 инсерции. Также в мтДНК HA89(PET2) выявлены полиморфные сайты: 14 SSR, 55 SNP и 13 INDEL. Две транспозиции размером около 27,5 т.п.н. (фланкирована генами *atp8* и *trnD*) и 106,5 т.п.н. (фланкирована генами *ccmFc* и *trnK*) и одна делеция размером 3780 п.н. (фланкирована генами *cob* и *ccmFc*) не затрагивали кодирующих областей мтДНК. Делеция размером 711 п.н., напротив, приводит к потере гена с неизвестной функцией – *orf777*. В мтДНК HA89(PET2) обнаружены две инсерции размером 5050 п.н. (фланкирована генами *atp6* и *coxII*) и 15885 п.н. (фланкирована генами *nad4L* и *ccmFc*). Инсерция 5050 п.н. привела к возникновению новой открытой рамки считывания *orf645*, а инсерция размером 15885 п.н. – трех ОРС: *orf228* и *orf285*, *orf2565* и дупликации гена *atp6*.

Размер митохондриального генома ЦМС линии HA89(MAX1) составил 295586 п.н., что на 5361 п.н. меньше, чем соответствующий показатель фертильной линии HA89. В мтДНК HA89(MAX1) обнаружено 8 крупных реорганизаций, в том числе 1 инвертированная транспозиция, 4 делеции и 3 инсерции. Также в мтДНК HA89(MAX1) локализованы полиморфные сайты: 18 SSR, 230 SNP и 29 INDEL. Инвертированная транспозиция участка размером около 110 т.п.н. (фланкированного генами *orf873* и *atp8*), затрагивает более трети всего митохондриального генома, изменяя направления транскрипции целого ряда генов. Три делеции размером 439 п.н. (фланкирована генами *nad4* и *ccmB*), 3183 п.н. (фланкирована генами *nad9* и *coxII*), 14296 п.н. (фланкирована генами *coxII* и *nad2*) не затрагивали кодирующих областей мтДНК. А одна делеция размером 978 п.н., приводит к потере гена *orf777*. Инсерция 1999 п.н., расположенная в межгенном регионе *nad4-ccmB*, интересна тем, что представляет собой вставку нуклеотидов идентичных области инвертированного повтора (IR) хлоропластного генома HA89(MAX1), включающую часть гена хлоропластной рибосомальной РНК – *rnr23*. В мтДНК HA89(MAX1) выявлены еще две инсерции размером 5272 п.н. (фланкирована генами *atp5* и *coxII*) и 6583 п.н. (фланкирована генами *orf873* и *nad4L*). Инсерция 5272 п.н. привела к возникновению ОРС *orf645*, а инсерция размером 15885 п.н. – трех ОРС: *orf306*, *orf480* и *orf1287*.

Размер митохондриального генома ЦМС линии HA89(ANN2) составил 306018 п.н., что на 5071 п.н. превышает соответствующий показатель фертильной линии HA89. В мтДНК HA89(ANN2) обнаружено 28 крупных реорганизаций, в том числе: 12 транспозиций, 9 делеций и 7 инсерций. Также в мтДНК HA89(ANN2) выявлены полиморфные сайты: 17 SSR, 288 SNP и 35 INDEL. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей мтДНК HA89(ANN2) и ее фертильного аналога показал наличие 14 гомологичных областей (табл. 4).

Таблица 4. Гомологичные области мтДНК у фертильной линии НА89 и ЦМС линии НА89(ANN2).

№ участка	Размер участка, п.н.	Позиции в мтДНК фертильной линии НА89	Позиции в мтДНК ЦМС линии НА89(ANN2)	Ориентация	Сходство, %	Локализованные гены
1	29196	1-29196	1-29204	Прямая	99	<i>nad2, trnY, trnN, trnC, ccmC, trnT, atp4, nad4L</i>
2	557	33772-34328	78343-78899	Прямая	99	-
3	1245	34329-35573	148163-149411	Инверт.	98	-
4	77441	36739-114179	217575-295553	Прямая	95	<i>atp8, coxIII, trnV, rpl5, nad4, trnD, trnK, ccmB, rpl10, trnM, trnG, trnQ, trnH, trnE, nad1, coxI, nad5</i>
5	41702	114180-155882	35657-77315	Инверт.	99	<i>atp9, trnM, rps4, rrn26, rrn5, rrn18, rps13</i>
6	4150	155883-160032	300892-305041	Прямая	99	-
7	8584	160320-168903	129358-137946	Прямая	99	<i>nad6*</i>
8	21433	168906-190275	171388-192871	Инверт.	98	<i>nad6*, trnP, trnF, trnS, trnM, ymf16, cob</i>
9	8158	194543-202700	163232-171387	Прямая	99	<i>ccmFc, orf873</i>
10	24687	202701-227387	192915-217574	Инверт.	99	<i>atp1, ccmFn, nad7</i>
11	41505	227396-268900	87945-129446	Прямая	99	<i>rps3, rpl16, trnM, matR, nad3, rps12, nad9, trnW</i>
12	6029	269217-275245	141704-147732	Инверт.	99	<i>atp6*</i>
13	12520	275536-288055	150723-163231	Прямая	99	<i>coxII</i>
14	977	299971-300947	305042-306018	Прямая	99	<i>trnK</i>

*гены, у которых в результате транспозиции изменена структура по сравнению с фертильным аналогом

В результате многочисленных перестроек в мтДНК линии НА89(ANN2) за исключением участков № 1 и № 14, которые представляют фактически одну область кольцевой молекулы мтДНК, все другие участки (№ 2 - № 13) изменили свое

расположение в митохондриальном геноме (рис. 5). В связи с этим участки № 2 - № 13 в мтДНК НА89(ANN2) мы определили, как транспозиции.

Фертильная линия НА89

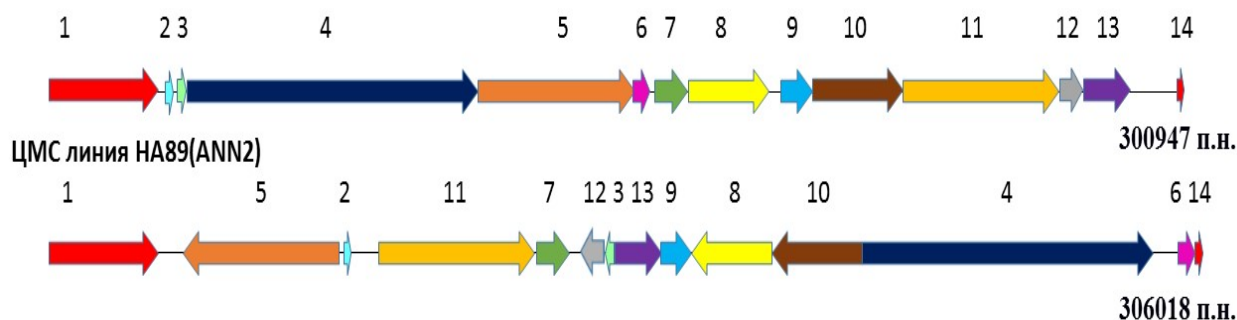


Рисунок 5. Схематичное изображение гомологичных участков мтДНК у фертильной линии НА89 и ЦМС линии НА89(ANN2). 1 – 29196 п.н; 2 – 557 п.н.; 3 – 1245 п.н.; 4 – 77441 п.н.; 5 – 41702 п.н.; 6 – 4150 п.н.; 7 – 8584 п.н.; 8 – 21433 п.н. 9 – 8158 п.н.; 10 – 24687 п.н.; 11 – 41505 п.н.; 12 – 6029 п.н.; 13 – 12520 п.н.; 14 – 977 п.н.

Среди 9 обнаруженных делеций, 7 размером 287 п.н. (*rps13-nad6*), 290 п.н. (*atp6-coxII*), 299 п.н. (*nad4-ccmB*), 583 п.н. (*rpl10-nad1*), 4204 п.н. (*cob-ccmFc*), 4575 п.н. (*nad4L-orf777*) и 11901 п.н. (*coxII-nad2*) не затрагивают кодирующих областей мтДНК. Остальные 2 делеции размером 316 п.н. и 1165 п.н. привели к элиминации части гена *atp6* и полностью гена *orf777*. Наряду с транспозициями и делециями в мтДНК НА89(ANN2) были локализованы 7 инсерций размером 430 п.н., 1027 п.н., 1310 п.н., 3757 п.н., 5338 п.н., 6452 п.н., 9045 п.н.

В результате всех реорганизаций структуры мтДНК НА89(ANN2) возникли 7 новых ОРС, 5 из которых *orf324*, *orf327*, *orf345*, *orf558*, *orf933* являются следствием инсерций, еще одна *orf891* - двух транспозиций размером 21433 п.н. и 24687 п.н. и последняя *orf1197* – одновременно трех перестроек: делеции размером 316 п.н., инсерции размером 430 п.н. и транспозиции размером 6029 п.н.

Результаты всех локализованных нами мутаций у ЦМС линий подсолнечника суммированы в таблице 5.

Таблица 5. Мутации в мтДНК у стерильных аналогов линии НА89 подсолнечника с различными типами ЦМС.

Тип мутаций	ЦМС линии			
	НА89(РЕТ1)	НА89(РЕТ2)	НА89(МАХ1)	НА89(АНН2)
Крупные (>100 п.н.) реорганизации, не изменяющие кодирующую область (экзом) митохондриального генома				
Инверсии	11852 п.н.	-	-	-
Транспозиции	-	27,5 т.п.н., 106,5 т.п.н.	110 т.п.н.	557 п.н., 1245 п.н., 4150 п.н., 8158 п.н., 12520 п.н., 21433 п.н., 24687 п.н., 41505 п.н., 41702 п.н., 77441 п.н.;
Делеции	451 п.н.	3780 п.н.	439 п.н., 3183 п.н., 14296 п.н.	287 п.н., 290 п.н., 299 п.н., 583 п.н., 4204 п.н., 4575 п.н., 11901 п.н.
Инсерции	-	-	1999 п.н.	3757 п.н. 6452 п.н.
Крупные (>100 п.н.) реорганизации, изменяющие кодирующую область (экзом) митохондриального генома				
Транспозиции	-	-	-	6029 п.н., 8584 п.н.
Делеции	-	711 п.н.	978 п.н.	316 п.н., 1165 п.н.,
Инсерции	4732 п.н.	5050 п.н., 15885 п.н.	5272 п.н., 6583 п.н.	430 п.н., 1027 п.н., 1310 п.н., 5338 п.н., 9045 п.н.
Полиморфные сайты в некодирующих областях митохондриального генома				
SSR	8	14	18	17
SNP	3	52	196	238
INDEL	2	13	29	34
Полиморфные сайты в кодирующих областях митохондриального генома				
SNP	4	3	34	50
INDEL	0	0	0	1

Из результатов, приведенных в таблице 5, можно заключить, что среди исследованных нами ЦМС линий подсолнечника наименьшая изменчивость мтДНК характерна для НА89(РЕТ1), а наибольшая - для НА89(АНН2).

В большинстве случаев причиной возникновения ЦМС у цветковых растений являются митохондриальные химерные белки, содержащие один или несколько трансмембранных доменов, гомологичные субъединицам АТФ-синтазы или белкам ассоциированным с дыхательной цепью переноса электронов (Gillman et al., 2007; Yang et al., 2009). Исходя из этого, мы проанализировали полипептиды, кодируемые ОРС в мтДНК ЦМС линий, на наличие трансмембранных доменов, а также оценили степень их гомологии с другими митохондриальными белками. Трансмембранные домены были обнаружены в полипептидах, кодируемых *orfH522* в мтДНК НА89(PET1), *orf228* и *orf285* в мтДНК НА89(PET2), *orf1287* в мтДНК НА89(MAX1), *orf558*, *orf891*, *orf933*, *orf1197* в мтДНК НА89(ANN2). Все ОРС за исключением *orf891* активно транскрибировались. В результате оценки уровня сходства ОРС с митохондриальными генами можно заключить, что *orf228* и *orf285* являются *atp9*-химерными генами а *orf1287*, *orf1197* - *atp6*-химерными генами. Ранее было показано, что ЦМС типа PET1 связана с *orfH522* (Kohler et al., 1991; Horn et al., 1996; Horn, 2002). На основе проведенных нами исследований можно предположить, что ЦМС типа PET2 непосредственно связана с *orf228* и *orf285*, ЦМС типа MAX1 – с *orf1287*, а ЦМС типа ANN2 - с *orf1197*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучен полиморфизм хлоропластных (*atpB*, *matK* и *rbcL*) и митохондриальных (*atp1*, *matR*, *nad5*) генов у представителей 5 однолетних и 16 многолетних видов рода *Helianthus* L. из коллекции ВИР. Количество точковых мутаций (SNP) в изученных генах хлДНК в среднем превышает в 3,6 раз соответствующий показатель в генах мтДНК. Выявлены специфичные SNP: у *H. strumosus* в генах *rbcL* (хлДНК) и *matR* (мтДНК), у *H. ciliaris* в генах *atpB* (хлДНК) и *matR* (мтДНК).

2. Получены и проанализированы полные нуклеотидные последовательности хлДНК и мтДНК линий НА89 и 3629 культурного и линии 398941 дикорастущего подсолнечника (*H. annuus*). Уровень изменчивости, детектируемый по числу SSR, SNP и INDEL полиморфных сайтов, оказался в 5,1 раз выше в хлДНК, чем в мтДНК. Дикорастущий подсолнечник (*H. annuus*) значительно отличается от селекционных линий по уровню изменчивости как хлДНК, так и мтДНК.

3. Сравнительный анализ хлоропластных геномов фертильной линии НА89 и ее стерильных аналогов НА89(PET1), НА89(PET2), НА89(ANN2), НА89(MAX1) позволил локализовать 447 полиморфных сайта, в том числе 57 SSR, 315 SNP и 75 INDEL. 119 из 315 SNP обнаружены в кодирующих участках генов, при этом 58 SNP приводят к изменению аминокислотных последовательностей кодируемых белков.

Среди стерильных аналогов наибольшее число полиморфных сайтов (246) в сравнении с фертильной линией идентифицировано у НА89(MAX1), а наименьшее (49) – у НА89(PET1).

4. Сравнительный анализ митохондриальных геномов фертильной линии НА89 и ее стерильных аналогов НА89(PET1), НА89(PET2), НА89(ANN2), НА89(MAX1) позволил локализовать крупные реорганизации геномов, в том числе 1 инверсию, 12 инсерций, 15 транспозиций и 16 делеций, а также 560 полиморфных сайтов, в том числе 33 SSR, 463 SNP и 64 INDEL. Размер митохондриальных геномов аллоплазматических линий с различными типами ЦМС значительно отличался по сравнению с фертильным аналогом. Изменения структуры мтДНК привели к возникновению новых открытых рамок считывания: *orf228*, *orf285*, *orf306*, *orf324*, *orf327*, *orf345*, *orf480*, *orfH522*, *orf558*, *orf645*, *orf891*, *orf933*, *orf1197*, *orf1287*, *orf2565*. Среди стерильных аналогов наибольшее число изменений структуры мтДНК идентифицировано у НА89(ANN2), а наименьшее – у НА89(PET1).

5. Биоинформатический анализ полипептидов, кодируемыми активно транскрибирующимися открытыми рамками считывания, возникшими в результате реорганизаций мтДНК, позволяет предположить, что ЦМС типа PET2 непосредственно связана с *atp9*-химерными генами *orf228* и *orf285*, ЦМС типа MAX1 – с *atp6*-химерным геном *orf1287*, ЦМС типа ANN2 - с *atp6*-химерным геном *orf1197*.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

I. В журналах, рекомендованных ВАК, индексируемых в базах Scopus, Web of Science

1. Usatov, A. V. The relationship between heterosis and genetic distances based on SSR markers in *Helianthus annuus* / A. V. Usatov, A. I. Klimenko, K. V. Azarin O. F. Gorbachenko, N. V. Markin, V. E. Tikhobaeva, Yu. A. Kolosov, O. A. Usatova, S. Bakoev, **M. Makarenko**, L. V. Getmantseva // American Journal Agricultural and Biological Sciences. – 2014. – Vol. 9. - № 3. – P. 270-276.

2. **Makarenko, M. S.** Comparative Genomics of Domesticated and Wild Sunflower: Complete Chloroplast and Mitochondrial Genomes / M. S. Makarenko A. V. Usatov, N. V. Markin, K. V. Azarin, O. F. Gorbachenko, N. A. Usatov // OnLine Journal of Biological Sciences. – 2016. - Vol. 16. - № 1. – P. 71-75.

3. Markin, N. Study of Informative DNA Markers of the Rf1 Gene in Sunflower for Breeding Practice / N. Markin, A. Usatov, **M. Makarenko**, K. Azarin, O. Gorbachenko, N. Kolokolova, T. Usatenko, O. Markina, V. Gavrilova // Czech Journal of Genetics and Plant Breeding. – 2017. - Vol. 53 - № 2. - P. 69-75.

4. Azarin, K. Comparative Analysis of the Complete Chloroplast Genome of the Alloplasmic Sunflower (*Helianthus* L.) Lines with Various CMS Types / K. Azarin, **M. Makarenko**, A. Usatov, V. Khachumov, A. Kovalevich, O. Gorbachenko, V. Gavrilova // American Journal of Biochemistry and Biotechnology. – 2018. – Vol. 14. - № 1. – P. 39-47.

5. **Makarenko, M. S.** Mitochondrial Genomes Organization in Alloplasmic Lines of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) with Various Types of Cytoplasmic Male Sterility / M. S. Makarenko, I. V. Kornienko, K. V. Azarin, A. V. Usatov, M. D. Logacheva, N. V. Markin, V. A. Gavrilova // PeerJ. – 2018. – Vol. 6. - Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.5266>.

II. Базы данных

6. База данных «Полиморфизм хлоропластного генома многолетних дикорастущих видов подсолнечника (*Helianthus*) / Маркин Н. В., Усатов А. В., Гудко М. Н., **Макаренко М. С.**, Азарин К. В., Денисенко Ю. В. // Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2015621575 в Реестре баз данных РФ от 19.10.2015.

7. База данных «Полные нуклеотидные последовательности хлоропластных геномов аллоплазматических линий НА89 с различными типами цитоплазматической мужской стерильности» / Усатов А. В., **Макаренко М. С.**, Азарин К. В., Гудко В. Н.,

Денисенко Ю. В. // Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2017621205 в Реестре баз данных РФ от 17.10.2017.

III. Другие издания

8. Усатов, А. В. Локализация индуцированных мутаций и реверсий в хлоропластном геноме *Helianthus annuus* / А. В. Усатов, Н. В. Маркин, М. Д. Логачева, **М. С. Макаренко**, Н. С. Колоколова // Материалы II Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы». – Минск: ИГиЦ НАНБ. – 2015. – С. 129.

9. Рассадина, В. В. Влияние пластидных мутаций в генах *rpoA* и *rpoC2* на биогенез фотосинтетического аппарата в листьях подсолнечника / В. В. Рассадина, А. В. Усатов, **М. С. Макаренко**, Н. Г. Аверина // XI съезд Белорусского общества генетиков и селекционеров. Материалы III Международной научной конференции, посвященной 115-летию со дня рождения академика А.Р. Жебрака «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы». – Минск: ИГиЦ НАНБ. – 2016. – С. 34.

10. **Макаренко, М. С.** SSR-анализ митохондриальной ДНК однолетних видов подсолнечника (*Helianthus L.*) / М. С. Макаренко, А. В. Усатов, Т. Т. Толстая, В. А. Гаврилова, А. А. Ковалевич // Сборник тезисов Всероссийской конференции с международным участием «50 лет ВОГиС: успехи и перспективы». - М. – 2016. – С. 215.

11. Усатов, А. В. Сравнительный анализ полных последовательностей хлоропластных и митохондриальных геномов дикорастущей и культурной форм подсолнечника (*Helianthus annuus L.*) / А. В. Усатов, **М. С. Макаренко**, М. Д. Логачева, Н. В. Маркин, Т. В. Шамова // Сборник тезисов Всероссийской конференции с международным участием «50 лет ВОГиС: успехи и перспективы». - М. – 2016. – С. 311.

12. **Макаренко, М. С.** Исследование структурно-функциональной организации митохондриального генома у аллоплазматических линий подсолнечника с различными типами ЦМС / М. С. Макаренко, М. Д. Логачева, А. В. Усатов, К. В. Азарин, В. А. Гаврилова // Сборник материалов Международной научной конференции, посвященной 90-летию Ботанического сада Южного федерального университета «Современные технологии в изучении биоразнообразия и интродукции растений». - Ростов-на-Дону, Таганрог: ЮФУ. – 2017. – С. 251-252.

13. Шамова Т. В. SSR-анализ митохондриальной ДНК однолетних видов подсолнечника / Т. В. Шамова, **М. С. Макаренко**, А. В. Усатов // Сборник материалов Международной научной конференции, посвященной 90-летию

Ботанического сада Южного федерального университета «Современные технологии в изучении биоразнообразия и интродукции растений». - Ростов-на-Дону, Таганрог: ЮФУ. – 2017. – С. 278-280.

14. **Макаренко, М. С.** Структурные перестройки митохондриального генома у аналогов линии НА89 подсолнечника с различными типами ЦМС / М. С. Макаренко, М. Д. Логачева, А. В. Усатов, К. В. Азарин, А. А. Ковалевич // Сборник материалов научно-практической конференции с международным участием «Генетика - фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции». - Ростов-на-Дону, Таганрог: ЮФУ. – 2017. – С. 25.

15. **Макаренко, М. С.** Структура митохондриального генома у аллоплазматических линий подсолнечника с различными типами ЦМС / М. С. Макаренко, А. В. Усатов, В. А. Гаврилова // Тезисы докладов IV Вавиловской международной конференции «Идеи Н.И. Вавилова в современном мире» - Санкт-Петербург: ВИР. – 2017. – 193 с.

16. Шамова, Т. В. Исследование изменчивости митохондриального генома культурного и дикорастущего подсолнечника (*Heliantus annuus* L.) / Т. В. Шамова, **М. С. Макаренко**, Усатов А. В. // Материалы Международной школы-конференции молодых ученых «Наука и молодежь: фундаментальные и прикладные проблемы в области селекции и генетики сельскохозяйственных культур». – Зерноград: НИИЗК–2017. – С. 133-137.

17. **Макаренко, М. С.** Структурно-функциональная организация митохондриальных геномов у аллоплазматических линий подсолнечника с различными типами ЦМС / М. С. Макаренко // Материалы XXV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2018». – Москва: МГУ – 2018. – Режим доступа: https://lomonosov-su.ru/archive/Lomonosov_2018/data/12715/75524_uid83161_report.pdf.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВИР – Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова

мтДНК – митохондриальная ДНК

ОРС – открытая рамка считывания

ПЦР – полимеразная цепная реакция

хлДНК – хлоропластная ДНК

ЦМС – цитоплазматическая мужская стерильность

INDEL – insertion or deletion – инсерции или делеция одного или нескольких нуклеотидов

IR – inverted repeat – инвертированный повторяющийся регион

LSC – large single copy region – большой однокопийный регион

SNP – single nucleotide polymorphism – однонуклеотидный полиморфизм

SSC – small single copy region – малый однокопийный регион

SSR – simple sequence repeats - простые повторяющиеся последовательности

Благодарности

Искренне благодарю научного руководителя д.б.н., проф. А.В. Усатова за предоставленную возможность проведения данного исследования, за бесценные советы и помощь в написании диссертации. Считаю своим долгом выразить благодарность коллективу лаборатории эволюционной геномики ФББ МГУ, и в частности, М.Д. Логачевой за помощь в работе. Выражаю глубокую признательность сотрудникам ВИР им. Н.И. Вавилова: В.А. Гавриловой за неоценимые консультации, помощь в работе и предоставленный материал исследования, Т.Т. Толстой за помощь в работе с коллекционными образцами ВИР.