

На правах рукописи

ВЕЛИШАЕВА Назифе Серверовна

**ТЕХНОЛОГИЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ КАРТОФЕЛЯ И ЕГО
ДИКОРАСТУЩИХ СОРОДИЧЕЙ НА ОСНОВЕ
МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА**

Специальность 03.00.23 – Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Москва - 2006

Работа выполнена во Всероссийском научно-исследовательском институте сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН (г. Москва).

Научный руководитель:

ведущий научный сотрудник
кандидат химических наук

Шилов Илья Александрович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

Морозов Сергей Юрьевич

доктор химических наук, профессор

Костров Сергей Викторович

Ведущая организация:

Всероссийский НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха

Защита состоится 5 декабря 2006 г. в 11.00 на заседании диссертационного совета Д 006.027.01 при Всероссийском научно-исследовательском институте сельскохозяйственной биотехнологии по адресу: 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42; тел.: (495) 976-65-44; факс: (495) 977-09-47; e-mail: iab@iab.ac.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН.

Автореферат разослан « 01 » декабря 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета Д 006.027.01
кандидат биологических наук



Меликова С.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Картофель является одной из важнейших сельскохозяйственных овощных культур, возделываемых практически во всех регионах РФ. Разнообразие зон возделывания и направлений использования культуры привело к необходимости создания сортов картофеля с различными хозяйственными и биологическими особенностями, такими, как устойчивость к болезням и вредителям, устойчивость к экстремальным условиям природной среды, высокие хозяйственные показатели и др. Современная селекция имеет существенные практические результаты, однако, требования, предъявляемые к современным сортам, постоянно возрастают в связи с периодическими вспышками болезней, постоянными экологическими изменениями в регионах, усиливающейся конкуренцией на рынке и т.п. В настоящее время в мировом сортименте картофеля насчитывается свыше 3 тыс. сортов. Практически ежегодно в России в Государственный Реестр селекционных достижений вносятся новые сорта. Для регистрации нового сорта по ряду основных сортоотличительных морфологических признаков, отражающих степень выраженности признаков отличимости, однородности и стабильности (Distinctness, Uniformity and Stability (DUS)) сортов, требуются длительные полевые испытания. В настоящее время представляется перспективным применение ДНК-технологий, с помощью которых станет возможным решение различных задач современной селекции, таких как подбор родительских форм для скрещивания, контроль интрогрессии генетического материала, паспортизация и сертификация сортов, создание «генетического паспорта» сельскохозяйственных растений, представляющего собой основу защиты интеллектуальной собственности селекционеров.

В настоящее время одним из главных методологических подходов в изучении генетического полиморфизма растений является применение молекулярных маркеров. Эти маркеры позволяют различать виды и подвиды растений, а также давать количественную характеристику их генетического и аллельного разнообразия. С введением молекулярных маркеров в практику биологических исследований появились новые возможности детального изучения структуры и организации генома растений, и количественной оценки степени сходства/различия на меж- и внутривидовом уровне. Для селекции растений особое значение имеет использование молекулярных маркеров для различения и идентификации сортов культурных растений, а также контроля за переносом генетического материала дикорастущих сородичей при отдаленных скрещиваниях.

Особый интерес представляют маркеры, получаемые с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Среди ПЦР-методов наиболее широко используют метод анализа полиморфизма микросателлитных последовательностей.

Гипервариабельность микросателлитных последовательностей, высокая плотность и равномерность их распределения по геному, кодоминантное наследование и простота их обнаружения в автоматическом режиме делает микросателлиты незаменимыми маркерами для исследования меж- и внутривидового разнообразия, генотипирования и популяционного анализа растений, а также для построения подробных генетических карт.

К преимуществу метода микросателлитного анализа можно отнести возможность создания на его основе эффективной универсальной технологии, пригодной для контроля интрогрессии генетического материала при отдаленных скрещиваниях, для различения и идентификации источников, доноров, гибридов и сортов сельскохозяйственных растений. На момент начала наших исследований было известно достаточное количество микросателлитных локусов растений рода *Solanum*, однако, их применимость для решения задач по различению и идентификации картофеля была мало изучена.

Таким образом, для решения сложных задач, таких как различение и идентификация растений на генетическом уровне, представляется актуальной разработка удобной в эксплуатации, относительно быстрой, высокопроизводительной и надежной технологии для генотипирования картофеля на основе анализа полиморфизма микросателлитов.

Цель работы. Разработка технологии для генотипирования картофеля и его дикорастущих сородичей на основе микросателлитного анализа.

Для выполнения работы были поставлены следующие ЗАДАЧИ:

1. Исследовать возможность применения метода микросателлитного анализа для генотипирования представителей рода *Solanum*. Создать эффективную универсальную технологию для генотипирования картофеля на основе анализа полиморфизма микросателлитов. Отобрать оптимальный набор праймеров к полиморфным микросателлитным локусам, являющихся перспективными для различения и идентификации растений рода *Solanum*.
2. Применить технологию микросателлитного анализа для генотипирования растений рода *Solanum* как на внутри- и межвидовом уровне, так и для генотипирования сортов картофеля отечественной и зарубежной селекции.
3. Применить технологию микросателлитного анализа для осуществления контроля интрогрессии генетического материала в гибриды/сорта при скрещивании родительских форм.

Научная новизна. В результате проведенных исследований нами были отобраны 20 пар праймеров к микросателлитным локусам картофеля, являющихся перспективными для проведения работ по различению и идентификации видов и сортов картофеля. С применением технологии микросателлитного анализа были составлены генетические профили 85 образцов растений рода *Solanum*, 44 из которых являются сортами картофеля отечественной и зарубежной селекции. На основе анализа первичных структур микросателлитных локусов STM 1105 (растения: вид *S. bulbocastanum*, сорт Ласунак и гибрид L 4-11; повторяющийся микросателлитный мотив (ACTC)_n), STM 2005 (растения: вид *S. bulbocastanum*, сорт Ласунак и гибрид L 4-11; повторяющийся микросателлитный мотив (CTGTG)_n) и STM 1057 (растения: вид *S. demissum*, сорта Early Rose, Апока, Скороплодный и гибрид 128-6; повторяющийся микросателлитный мотив (AAAT)_n) была впервые продемонстрирована природа полиморфизма микросателлитных последовательностей растений рода *Solanum*, а также показана возможность контроля интрогрессии генетического материала в гибриды/сорта при скрещивании родительских форм.

Практическая значимость работы. Показана перспективность применения техники микросателлитного анализа для исследования генетического разнообразия сельскохозяйственных культур, а также их идентификации, паспортизации и сертификации селекционного материала. Предлагаемая технология ДНК-анализа позволяет различать растительные геномы, осуществлять контроль интрогрессии генетического материала родительских форм в гибриды, а также осуществлять контроль сортовой чистоты растений. Продемонстрировано различие близкородственных сортов картофеля Альтаир и Аксамит, в селекции которых участвовали одни и те же родительские формы; различие сортов отечественной и зарубежной селекции (сорт Скороплодный и Wauseon); различие близкородственных генотипов – сортов Голубизна и Скороплодный, являющихся полусестринскими сортами картофеля. На примере сорта Голубизна показано, что предлагаемая технология микросателлитного анализа позволяет отслеживать и подтверждать сортовую подлинность экспертных образцов, сохраняемых и поддерживаемых в различных опытно-производственных хозяйствах.

Публикации по теме диссертационной работы. По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ. Основные результаты исследований были представлены на научной конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (Казань, 17-18 июня, 2004), III Международной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 19 октября, 2004), III Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 14-18 марта, 2005), а также на Всероссийской научно-практической конференции

молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье» (Суздаль, 19 – 22 мая, 2005).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 152 страницах печатного текста, содержит 17 таблиц и 37 рисунков. Список литературы включает 142 источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Материалы и методы исследования.

В работе использовали олигонуклеотиды, синтезированные в ЗАО «Синтол» (Россия); дНТФ фирмы «Медиген» (Россия); *Taq* ДНК-полимеразу ThermoStar, обеспечивающую «горячий старт» при проведении ПЦР, производства ВНИИ СБ (лаб. Молекулярной диагностики и генно-инженерных конструкций, зав. лаб. Луний В.Г.), термосеквеназу фирмы Amersham BioSciences (США), эндонуклеазы рестрикции *Msp* I, *Eco* RI, T4 ДНК-лигазу и соответствующие буферные растворы фирмы MBI Fermentas (Литва).

Формы растений были предоставлены из Института картофелеводства НАН (Беларусь), Российского аграрного университета (ТСХА, Россия), Всероссийского НИИ картофельного хозяйства (Россия), Всероссийского НИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова (Россия), ARS Potato Introduction Project, USDA (США), Center for Genetic Resources (CGR, Голландия), IPK Genbank Aussenstelle Nord (CLKS, Германия) и International Potato Center (CIP, Перу).

Выделение геномной ДНК из растительного материала проводили по методике Т.С. Osborn, предполагающей лизис материала с помощью детергентов и органических агентов, а также с помощью метода выделения ДНК на силикагелевом сорбенте [Boom R. *et al.*, 1990].

Для получения препаратов геномной ДНК в качестве растительного материала использовали световые ростки и молодые листья растений.

Полимеразную цепную реакцию проводили с помощью праймеров, представленных в Табл. 1. Реакции проводили в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 50 – 100 нг ДНК, по 10 пмоль каждого из используемых локус-специфичных праймеров (один из праймеров был помечен флуоресцентным красителем *Sy* 5), буфер для *Taq* ДНК-полимеразы ThermoStar, содержащий 100 мМ трис-НСI (рН 8,3), 25 мМ MgCl₂, 500 мМ KCl, 400 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата и 1 ед. термостабильной ДНК-полимеразы. Активация термостабильной ДНК-полимеразы происходила в результате нагревания реакционной смеси перед проведением ПЦР до 95°C и экспозиции при данной температуре в течение 10-12 мин.

Полимеразную цепную реакцию проводили при следующих температурных условиях: 1 цикл: 95° - 10 мин; 30 циклов: 94°С – 30 сек, $T_{отж}$ – 30 сек, 72°С – 30 сек; 1 цикл: 72°С – 5 мин. Температура отжига праймеров ($T_{отж}$) указана в Табл. 1. Для амплификации использовали термоциклер «Mastercycler gradient» фирмы «Eppendorf» (Германия) и GeneAmp PCR System 2400 фирмы «Perkin Elmer» (США).

Анализ флуоресцентно-меченых ПЦР-фрагментов проводился методом электрофореза в денатурирующих условиях с помощью автоматического секвенатора ALFexpress II фирмы Amersham BioSciences (США). Полученные данные анализировали с помощью пакета прикладных программ ALFwin Software Fragment Analysis.

Клонирование амплифицированных фрагментов ДНК проводили в состав pGEM-T Easy вектора (Promega, США).

Секвенирование ДНК-матриц проводили по методу Сэнгера с использованием автоматического секвенатора ALFexpress II фирмы Amersham BioSciences (США).

Для множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей использовали программы Clustal W и GenDoc, для построения дендрограмм использовали пакет прикладных программ TREECON [Van de Peer Y. *et al.*, 1994].

2. Исследование межвидовой и внутривидовой варибельности представителей рода *Solanum* методом микросателлитного анализа.

В основе предлагаемого способа генотипирования картофеля лежит метод микросателлитного анализа, неотъемлемой частью которого является полимеразная цепная реакция (ПЦР). При выборе праймеров для исследования полиморфизма микросателлитных локусов растений *Solanum* учитывались следующие критерии:

- длина получаемых ПЦР-фрагментов;
- количество выявляемых аллелей.

Различие длин аллелей микросателлитного локуса определяется числом повторяющихся единиц, представляющих собой ди-, три-, тетра-, пента- и гексануклеотиды. С помощью высокоразрешающего электрофореза в полиакриламидном геле ПЦР-фрагменты, отличающиеся всего на несколько нуклеотидов, различаются надежнее, если они имеют не очень большую длину (не более 300 п.н.). Это обстоятельство учитывалось при первичном выборе и анализе праймеров.

Важным критерием при выборе праймеров являлось выявляемое ими количество аллелей микросателлитного локуса. На основании литературных данных [Milbourne D. *et al.*, 1998, Ashkenazi V. *et al.*, 2001, McGregor С.Е. *et al.*, 2000] было проанализировано около

200 пар праймеров к микросателлитным локусам, после чего для генотипирования представителей рода *Solanum* нами были первоначально выбраны 30 пар праймеров.

С помощью метода микросателлитного анализа в работе было проанализировано 6 клубненосных видов *Solanum* (*S. kurtzianum*, *S. stoloniferum*, *S. chacoense*, *S. bulbocastanum*, *S. demissum* и *S. tuberosum*) и один бесклубневый вид (*S. lycopersicoides*). На рис. 1 представлены электрофореграммы разделения продуктов ПЦР в 8 %-ном полиакриламидном геле, полученных с четырех пар праймеров (POT 47-48, ST1КА, STS 1-2 и STM 0031), выявляющих в сумме от 6 до 12 аллельных вариантов для исследуемых микросателлитных локусов картофеля.

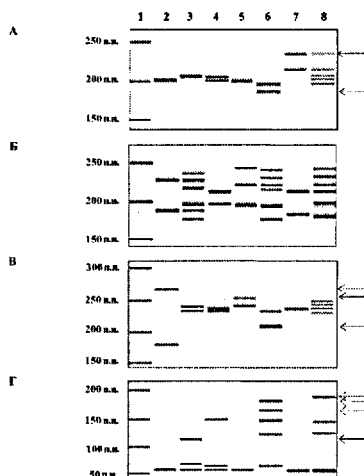


Рис. 1. Электрофореграммы разделения продуктов ПЦР в 8 %-ном полиакриламидном геле, полученных с праймеров POT 47-48 (А), ST1КА (Б), STS 1-2 (В) и STM 0031 (Г). В качестве матрицы для ПЦР использовали образцы ДНК растений *S. lycopersicoides* (2), *S. kurtzianum* PI 472923 (3), *S. chacoense* PI 133713 (4), *S. stoloniferum* PI 255532 (5), *S. demissum* PI 498012 (6), *S. bulbocastanum* Sbk (7), *S. tuberosum* 78563-76 (8). (Соответствующие дорожки электрофореграммы указаны в скобках). Дорожка 1 - маркер молекулярной массы.

Анализ представленных на рис. 1 данных показывает, что с помощью ряда праймеров к микросателлитным локусам картофеля можно получать уникальные для каждого образца ДНК-профили. В целом, совокупный генетический профиль, полученный в результате анализа нескольких локусов, позволяет нам надежно различать клубненосные и неклубненосные формы *Solanum*.

Далее мы исследовали уровень генетического полиморфизма внутри видов *Solanum*. Для проведения анализа в нашем распоряжении были два североамериканских вида:

S. stoloniferum, *S. demissum*, и один южноамериканский вид *S. chacoense*. На рис. 2 представлены генетические профили 5 - 6 представителей каждого вида, полученные с пар праймеров POT 81-82 и STM 0019. Как видно из представленных на рис. 2 электрофореграмм, внутри каждого локуса все три вида *Solanum* имеют свои уникальные микросателлитные профили, однако, отдельные растения каждого вида обладают низким уровнем полиморфизма, что может свидетельствовать о том, что внутри того или иного локуса разные виды *Solanum* проявляют различный уровень генетического разнообразия. Так, например, внутри локуса POT 81-82 (рис. 2, А) все 6 растений *S. stoloniferum* имеют идентичный микросателлитный профиль; среди 5 растений *S. demissum* только *S. demissum* CGN 17805 (рис. 2, А, дорожка 17) имеет отличный от остальных растений ДНК-профиль; наибольший полиморфизм проявляют растения южноамериканского вида *S. chacoense*, среди которых 5 из 6 анализируемых генотипов имеют уникальные ДНК-профили; неразличимы только генотипы *S. chacoense* PI 189219 и *S. chacoense* PI 133713 (рис. 2, А, дорожки 8 и 9). Внутри локуса STM 0019 (рис. 2, Б) формы *S. stoloniferum* проявляют больший (по сравнению с локусом POT 81-82) полиморфизм.

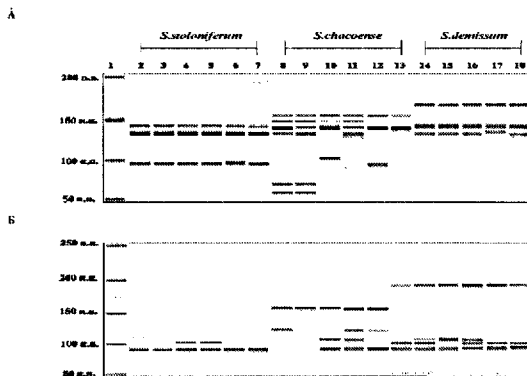


Рис. 2. Электрофореграммы разделения продуктов ПЦР в 8 %-ном полиакриламидном геле, полученных с праймеров POT 81-82 (А) и STM 0019 (Б). В качестве матриц для ПЦР использовали образцы ДНК растений *S. stoloniferum* PI 230490 (2), *S. stoloniferum* PI 255532 (3), *S. stoloniferum* CGN 18348 (4), *S. stoloniferum* CGN 23072 (5), *S. stoloniferum* 513 (6), *S. stoloniferum* 590 (7), *S. chacoense* PI 189219 (8), *S. chacoense* PI 133713 (9), *S. chacoense* PI 472828 (10), *S. chacoense* PI 472810 (11), *S. chacoense* CGN 20583 (12), *S. chacoense* 135 (13), *S. demissum* PI 161715 (14), *S. demissum* PI 205514 (15), *S. demissum* PI 498012 (16), *S. demissum* CGN 17805 (17), *S. demissum* 253 (18). (Соответствующие дорожки электрофореграммы указаны в скобках). Дорожка 1 - маркер молекулярной массы.

В результате проведенного микросателлитного анализа мы получили уникальный для каждого вида набор дескрипторов, на основе которого может быть составлен индивидуальный «генетический паспорт».

Таблица 1. Список рекомендуемых праймеров для анализа микросателлитов картофеля.

№ п/п	Название праймера	Последовательности праймеров 5' → 3'	T _{отж.} °С	Диапазон длины ПЦР-фрагментов, п.н.	Мотив	Количество наблюдаемых аллелей
1	СПКА	F-TCCGTCGCTAACSTACTA R-CCCAACATTACACGATTC	45	100-250	(ca) _n (at) _n	12
2	STS 1-2	F-TCTCTTGACACGGTCTCACTGAAAC R-TCACCCATTACACTGAGCCAGACA	50	200-270	(atc) _n	9
3	TOM 8-9	F-GCATTGATTCAACTTCATTCTCGT R-ATTTTCTCCACACCACTAACCG	56	120-170	(att) _n	8
4	POT 47-48	F-AACATGACACACATTAGCA R-AACTTACTCGAACCTCCGT	45	150-270	(tg) _n (ag) _n	6
5	POT 83-84	F-GGGACATCACACTCT R-CCGCTCCTATATGGCTG	42	100-200	(tg) _n	6
6	ST 15-16	F-MATTCATGTTCCGCTACGTC R-ATCCACAAGAAGCTCAMAATGCA	52	200-300	(aag) _n	5
7	POT 53-54	F-CCAAAATACAGGCTCCATAG R-TTCTCAACAACCTCCCATCC	55	150-250	(ct) _n (ca) _n	4
8	POT 57-58	F-TGCGCTGAAGCAGCGGTAAA R-CCCCACTAAGTAAACATTTG	55	100-200	(tg) _n	6
9	POT 81-82	F-ATAAACCCCATGACAGC R-ATCCCATAGATTTGTTAG	48	50-170	(ag) _n (g) _n (ag) _n	8
10	ST 5-6	F-CTTCCACTTGTAGTACCCCC R-AAATCCTTCTGACCTCCCC	55	100-200	(tc) _n (t) _n	4
11	STM 0031	F-CATACCCACCCACTACAC R-TTCAACCTATCATTTTGTGACTCG	54	50-200	(ac) _n ... (ac) _n (gcac)... (ac) _n (gcac) _n	8
12	STM 1005	F-ATGCCCTTACGAAATACTCGG R-CAGCTAACGGCTTGGCGG	55	150-200	(gta) _n	3
13	STM 1016	F-TCTGTATTTCATGCGATGTTCC R-ATCGTTGCCATGTGATGTAT	55	200-300	(tct) _n	9
14	STM 1019	F-TAGATTTCATTATCCCAACAGCA R-CAACTCCCTCTCCCAATAG	55	200-250	(atc) _n	4
15	STM 0019	F-AACAGCTATCCGACTCTCAATG R-TTCAAGTAAAGCTCTAGTATGCG	46	70-150	(at) _n (g) _n (at) _n (g) _n (gc) _n (gt) _n	9
16	STM 1057	F-TTATGTTCCGGTAAAACTGA R-AAATTAATGGAAGCAACC	47	100-150	(aaat) _n	5
17	STM 1097	F-TGATTAGTTGCTTTGTFG R-GCTTCCATCTTAATACACC	47	100-200	(cgttt) _n	4
18	STM 2005	F-TTTAAGTCTCAGTTCGCCAGG R-CTCACAACTTTTACCATTGCTGGG	55	150-200	(ctgttg) _n	3
19	STM 2013	F-TTCCGAATTAGCTCTGCC R-AAAAAAGCAACCCGACG	55	150-200	(tcta) _n	4
20	STM 1105	F-AAACCTGCTACAAATAAGCC R-CAGAAATAATCGAGGAGATG	52	70-150	(actc) _n	9

Подобный «паспорт» можно представить как в графической форме в виде набора аллелей по всем локусам, представляющих своеобразный «штрих-код», так и в математической форме в виде матрицы. Для составления совокупного математического профиля («паспорта») генотипа каждый фрагмент ДНК с известной молекулярной массой принимают за дескриптор. Далее составляют матрицу, содержащую сведения о присутствии (1) или отсутствии (0) этих дескрипторов у всех исследованных генотипов для всех сочетаний праймеров. В конечном итоге получают общую таблицу, в которой показаны все дескрипторы, выявленные с помощью разных пар праймеров и расположенные в порядке убывания их молекулярной массы. В результате проведенных нами экспериментальных исследований были отобраны 20 пар праймеров (Табл. 1), являющихся перспективными для идентификации растений рода *Solanum*.

В данной работе с использованием этих 20 пар праймеров было выявлено 126 дескрипторов генетического разнообразия растений рода *Solanum*, на основе которых были созданы матрицы межвидового, внутривидового и сортового разнообразия. Эти матрицы в дальнейшем использовали для определения генетических расстояний (GD) между генотипами по Nei и Li (1979), и впоследствии проводили кластерный анализ методом UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with an Arithmetic Average) [Sneath P.H.A. et al., 1973], результатом которого являлись дендрограммы (пример одной из них приведен на рис. 3), отражающие филогенетические взаимоотношения анализируемых форм растений. Эти расчеты проводили с помощью пакета прикладных программ TREECON [Van de Peer Y. et al., 1994].

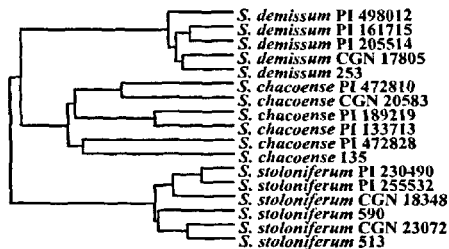


Рис. 3. Дендрограмма генетического разнообразия представителей трех видов рода *SOLANUM*.

Таким образом, используя метод анализа микросателлитных последовательностей, можно определять уровень биоразнообразия внутри вида, в частности внутри видов *Solanum*. На основании проведенного анализа представителей трех видов *Solanum*: *S. stoloniferum*, *S. demissum* и *S. chacoense*, можно говорить о том, что наибольшее генетическое

разнообразии проявляют растения *S. chacoense*, наименьшее – растения *S. demissum*; также можно различать североамериканские (*S. stoloniferum*, *S. demissum*) и южноамериканские (*S. chacoense*) виды *Solanum* (рис. 3).

3. Исследование полиморфизма генома картофеля методом микросателлитного анализа.

В настоящее время картофель является одной из основных овощных сельскохозяйственных культур. Современная селекция картофеля основывается на применении межсортовой и межвидовой гибридизации. Эти методы позволили сочетать и комбинировать в новых сортах наиболее важные свойства родительских форм, планировать и прогнозировать заданные параметры. Современные сорта сочетают около 40 - 50 признаков (далее перечислены наиболее важные и значимые признаки), как то морфологические особенности гнезда и клубня (окраска кожуры, мякоти, глазков; число клубней в гнезде и масса клубня; длина столонов); урожайность (число и масса клубней в гнезде); качество (содержание крахмала, белка, витамина С, редуцирующих сахаров, соланина, вкус, консистенция, развариваемость, пригодность к переработке); группа спелости (ранние, среднеранние, среднеспелые, среднепоздние, поздние); устойчивость к грибным и бактериальным болезням (рак, фитоальтернариоз, парша, чёрная ножка, кольцевая гниль и др.); устойчивость к вирусным болезням (скручивание листьев, крапчатость и др.); устойчивость к вредителям (картофельная и стеблевая нематоды, колорадский жук, картофельная моль и др.); устойчивость к жаре, засухе, переувлажнению, заморозкам; период покоя клубней (в зависимости от целей возделывания); сохранность (лёжкость) в период хранения; пригодность к механизированному уходу и уборке.

Для современного сельского хозяйства решающую роль играет выбор сорта. Благодаря правильно подобранным сортам для возделывания в той или иной местности возможно увеличение сбора продукции до 30 - 50 %. Правильно подобранный сортимент позволяет увеличить не только урожай, но и улучшить качество продукции, растянуть сроки ее поступления, повысить выход готового продукта.

В нашей работе для исследования полиморфизма нетранслируемых последовательностей генома картофеля мы использовали сорта отечественной и зарубежной селекции. Технология анализа микросателлитных последовательностей генома картофеля позволяет различать сорта по ряду микросателлитных локусов, причем перечень этих локусов не универсален и варьирует в зависимости от характера и количества

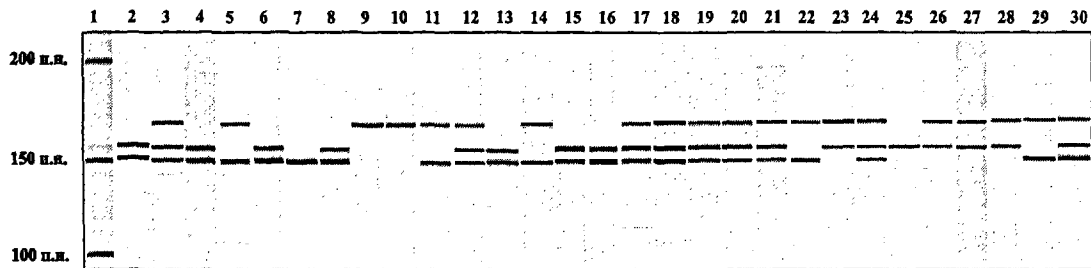


Рис. 4. Электрофореграммы разделения продуктов ПЦР в 8 %-ном полиакриламидном геле, полученных с пары праймеров STM 2005. В качестве матриц для ПЦР использовали образцы ДНК растений Скороплодный (2), Брянский ранний (3), Эффект (4), Голубизна (5), Ресурс (6), Никулинский (7), Белоснежка (8), Жуковский ранний (9), Atlantic (10), Ильинский (11), Луговской (12), Удача (13), Синцевец (14), Лукьяновский (15), Петербургский (16), Невский (17), Kameraz (18), Смена-20 (19), Saturna (20), Desiree (21), Romano (22), Katahdin (23), Russet Burbank (24), Kennebec (25), Wauseon (26), Lady Rosetta (27), Maris Piper (28), Альтаир (29), Аксамит (30). (Соответствующие дорожки электрофореграммы указаны в скобках). Дорожка 1 - маркер молекулярной массы.

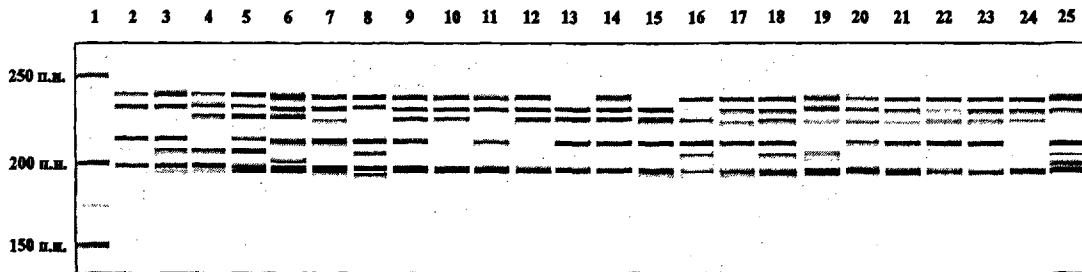


Рис. 5. Электрофореграммы разделения продуктов ПЦР в 8 %-ном полиакриламидном геле, полученных с пары праймеров POT 47-48. В качестве матриц для ПЦР использовали образцы ДНК растений Olev (2), Агрономический (3), Aquila (4), Jubel (5), Прикульский ранний (6), Смена - 20 (7), Kameraz (8), Голубизна (9), Осень (10), I28-6 (11), Эффект (12), Раменский (13), Скороплодный (14), Алока (15), Удача (16), Брянский ранний (17), Березка (18), Atlantic (19), Wauseon (20), Katahdin (21), Kennebec (22), Superior (23), Альтаир (24), Аксамит (25). (Соответствующие дорожки электрофореграммы указаны в скобках). Дорожка 1 - маркер молекулярной массы.

анализируемых генотипов. Внутри одного и того же локуса для определенной выборки генотипов можно получить микросателлитные профили, позволяющие различать либо всю панель исследуемых генотипов, либо часть представленных образцов растений.

Таким образом, можно говорить о том, что выбор информативного локуса для генотипирования образцов методом микросателлитного анализа во многом зависит от характера и представительности выборки генотипов для проведения подобного эксперимента. На рис. 4 представлены микросателлитные профили сортов картофеля, обнаруженные для локуса STM 2005. Как видно, внутри локуса STM 2005 (рис. 4) можно наблюдать наличие 7 различных генетических профилей анализируемых сортов, среди которых 2 являются уникальными: сорт Никулинский и Kennebec (дорожки 7 и 25).

Специального внимания заслуживает задача генотипирования близкородственных сортов картофеля методом анализа микросателлитных последовательностей. В качестве примера на рис. 5 приведен анализ генетических профилей ряда близкородственных сортов по локусу POT 47-48. Как видно из рис. 5, практически все представленные генетические профили имеют сложный и схожий набор аллелей. Среди анализируемых образцов ДНК имеются 2 пары генотипов: сорт Голубизна (Гатчинский × 128-6) и Осень (Granola × 128-6) (дорожки 9 и 10); сорт Скороплодный (128-6 × Anoka) и Удача (Vilnia × Anoka) (дорожки 14 и 16), в селекции которых участвовали родительские формы, среди которых одна была общая (генотипы выделены жирным шрифтом). Как видно из электрофореграмм генотипы сортов можно различать между собой внутри каждой полусестринской пары.

Общность происхождения сортов можно также наблюдать между сортами отечественной и зарубежной селекции (рис. 6). Проведенный анализ микросателлитных профилей сортов Скороплодный (Россия) и Wauseon (Нидерланды), полученных с пары праймеров STM 1057 (рис. 6, А), показывает, что сорт Скороплодный (дорожка 11) сочетает все аллели родительских форм Anoka (дорожка 9) и 128-6 (дорожка 10) (рис. 6, А, аллели обозначены стрелками 1, 2, 3 и 4), а различие в генетических профилях сортов Скороплодный и Wauseon (дорожки 11 и 12, соответственно) обеспечивается присутствием/отсутствием единственного аллеля (обозначен стрелкой 2), который является генетическим материалом *S. demissum* (дорожка 7). Для определения характера происхождения аллелей необходимо в каждом конкретном случае устанавливать их первичную структуру; аллели 3 и 4 размером 103 п.н. и 107 п.н., соответственно (рис. 6, А) характерны для двух родоначальников: *S. demissum* и Early Rose, участвовавших в селекции сортов Wauseon (рис. 6, А, дорожка 12) и Скороплодный (рис. 6, А, дорожка 11).

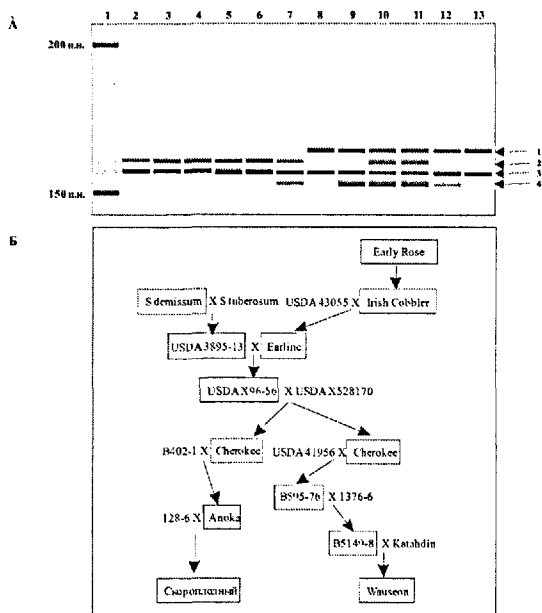


Рис. 6. Пример сопоставления генетического профиля образцов ДНК растений отечественной селекции, полученного на основе анализа микросателлитных последовательностей, с их селекционной историей. Электрофоретическая картина разделения продуктов ПЦР в 8 %-ном полиакриламидном геле, полученная с пары праймеров STM 1057 (А). В качестве матрицы для ПЦР использовали образцы ДНК растений *S. demissum* CGN17805 (2), *S. demissum* 375 (3), *S. demissum* 253 (4), *S. demissum* PI 161715 (5), *S. demissum* PI 205514 (6), *S. demissum* PI 498012 (7), Early Rose (8), Апока (9), гибрид 128-6 (10), Скороплодный (11), Wauseon (12), Katahdin (13). Селекционная история (схема) сортов картофеля (Б) составлена на основании их родословных. Соответствующие дорожки электрофоретической картины указаны в скобках). Дорожка 1 - маркер молекулярной массы.

Полученные данные о первичной структуре микросателлитного локуса STM 1057, локализованного на VIII хромосоме [Milbourn D. *et al.*, 1998], представлены на рис. 7 и рис. 8; аллель размером 111 п.н. является генетическим материалом *S. demissum*; аллель размером 115 п.н. - Early Rose (рис. 8). Полученные данные о первичных структурах аллелей родительских форм (гибрид 128-6 и сорт Апока) и их гибрида (сорт Скороплодный) (рис. 7), свидетельствуют о кодоминантном наследовании генетического материала родительских форм при скрещивании. Различия в молекулярной массе аллелей обеспечивается наличием разного количества повторяющихся единиц (AAAT)_n (рис. 7).

Еще более сложной, но крайне необходимой и важной задачей в селекции растений является различение и идентификация растений, полученных в результате скрещивания одних и тех же родительских форм, получивших статус сорта.

Anoka (103): TTATGTTTCGGTTAAAAATGATCAGCTGGATAGCTGATTACTAGCCCTGCCAGTTGTTAAT 61
Anoka (107): TTATGTTTCGGTTAAAAATGATCAGCTGGATAGCTGATTACTAGCCCTGCCAGTTGTTAAT 61
Anoka (115): TTATGTTTCGGTTAAAAATGATCAGCTGGATAGCTGATTACTAGCCCTGCCAGTTGTTAAT 61
Scor (103): TTATGTTTCGGTTAAAAATGATCAGCTGGATAGCTGATTACTAGCCCTGCCAGTTGTTAAT 61
Scor (107): TTATGTTTCGGTTAAAAATGATCAGCTGGATAGCTGATTACTAGCCCTGCCAGTTGTTAAT 61
Scor (111): TTATGTTTCGGTTAAAAATGATCAGCTGGATAGCTGATTACTAGCCCTGCCAGTTGTTAAT 61
Scor (115): TTATGTTTCGGTTAAAAATGATCAGCTGGATAGCTGATTACTAGCCCTGCCAGTTGTTAAT 61
128-6 (103): TTATGTTTCGGTTAAAAATGATCAGCTGGATAGCTGATTACTAGCCCTGCCAGTTGTTAAT 61
128-6 (107): TTATGTTTCGGTTAAAAATGATCAGCTGGATAGCTGATTACTAGCCCTGCCAGTTGTTAAT 61
128-6 (111): TTATGTTTCGGTTAAAAATGATCAGCTGGATAGCTGATTACTAGCCCTGCCAGTTGTTAAT 61
128-6 (115): TTATGTTTCGGTTAAAAATGATCAGCTGGATAGCTGATTACTAGCCCTGCCAGTTGTTAAT 61

Anoka (103): GCTATGTATGAAATAAATAAAT-----GGTTGCTTCCATTAAATTT 103
Anoka (107): GCTATGTATGAAATAAATAAATAAAT-----GGTTGCTTCCATTAAATTT 107
Anoka (115): GCTATGTATGAAATAAATAAATAAATAAATAAATGGTTGCTTCCATTAAATTT 115
Scor (103): GCTATGTATGAAATAAATAAATAAAT-----GGTTGCTTCCATTAAATTT 103
Scor (107): GCTATGTATGAAATAAATAAATAAATAAAT-----GGTTGCTTCCATTAAATTT 107
Scor (111): GCTATGTATGAAATAAATAAATAAATAAATAAATGGTTGCTTCCATTAAATTT 111
Scor (115): GCTATGTATGAAATAAATAAATAAATAAATAAATGGTTGCTTCCATTAAATTT 115
128-6 (103): GCTATGTATGAAATAAATAAATAAAT-----GGTTGCTTCCATTAAATTT 103
128-6 (107): GCTATGTATGAAATAAATAAATAAATAAAT-----GGTTGCTTCCATTAAATTT 107
128-6 (111): GCTATGTATGAAATAAATAAATAAATAAATAAATGGTTGCTTCCATTAAATTT 111
128-6 (115): GCTATGTATGAAATAAATAAATAAATAAATAAATGGTTGCTTCCATTAAATTT 115

Рис. 7. Первичная структура аллелей локуса STM 1057, интрогрессируемых из родительских форм Анока и гибрида 128-6 в сорт Скороплодный (Scor) = гибрид 128-6 × Анока. 103, 107, 111 и 115 – размер соответствующего аллеля, п.н. Повторяющийся мотив (AAAT)_n подчеркнут. Последовательности праймеров отмечены жирным шрифтом.

S. dem (103): TTATGTTTCGGTTAAAAATGATCAGCTGGATAGCTGATTACTAGCCCTGCCAGTTGTTAAT 61
S. dem (107): TTATGTTTCGGTTAAAAATGATCAGCTGGATAGCTGATTACTAGCCCTGCCAGTTGTTAAT 61
S. dem (111): TTATGTTTCGGTTAAAAATGATCAGCTGGATAGCTGATTACTAGCCCTGCCAGTTGTTAAT 61
Scor (103): TTATGTTTCGGTTAAAAATGATCAGCTGGATAGCTGATTACTAGCCCTGCCAGTTGTTAAT 61
Scor (107): TTATGTTTCGGTTAAAAATGATCAGCTGGATAGCTGATTACTAGCCCTGCCAGTTGTTAAT 61
Scor (111): TTATGTTTCGGTTAAAAATGATCAGCTGGATAGCTGATTACTAGCCCTGCCAGTTGTTAAT 61
Scor (115): TTATGTTTCGGTTAAAAATGATCAGCTGGATAGCTGATTACTAGCCCTGCCAGTTGTTAAT 61
E. R. (107): TTATGTTTCGGTTAAAAATGATCAGCTGGATAGCTGATTACTAGCCCTGCCAGTTGTTAAT 61
E. R. (115): TTATGTTTCGGTTAAAAATGATCAGCTGGATAGCTGATTACTAGCCCTGCCAGTTGTTAAT 61

S. dem (103): GCTATGTATGAAATAAATAAATAAAT-----GGTTGCTTCCATTAAATTT 103
S. dem (107): GCTATGTATGAAATAAATAAATAAATAAATAAAT-----GGTTGCTTCCATTAAATTT 107
S. dem (111): GCTATGTATGAAATAAATAAATAAATAAATAAATGGTTGCTTCCATTAAATTT 115
Scor (103): GCTATGTATGAAATAAATAAATAAATAAAT-----GGTTGCTTCCATTAAATTT 103
Scor (107): GCTATGTATGAAATAAATAAATAAATAAATAAATGGTTGCTTCCATTAAATTT 107
Scor (111): GCTATGTATGAAATAAATAAATAAATAAATAAATGGTTGCTTCCATTAAATTT 111
Scor (115): GCTATGTATGAAATAAATAAATAAATAAATAAATGGTTGCTTCCATTAAATTT 115
E. R. (107): GCTATGTATGAAATAAATAAATAAATAAATAAATGGTTGCTTCCATTAAATTT 107
E. R. (115): GCTATGTATGAAATAAATAAATAAATAAATAAATGGTTGCTTCCATTAAATTT 115

Рис. 8. Первичная структура аллелей локуса STM 1057. Дикий вид *S. demissum* PI 498012 (S. dem); сорт-родоначальник Early Rose (E.R.); сорт Скороплодный (Scor). 103, 107, 111 и 115 – размер соответствующего аллеля, п.н. Повторяющийся мотив (AAAT)_n подчеркнут. Последовательности праймеров отмечены жирным шрифтом.

Среди анализируемых нами растений имеются два сорта картофеля белорусской селекции, являющихся сестринскими линиями: сорт Аксамит (Добро × 77540-57) и Альтаир

(Добро × 77540-57). Проведенные исследования показали, что генотипы сортов Аксамит и Альтаир по ряду локусов (Табл. 1) имеют различный набор аллелей, что позволяет различать два растения.

Таким образом, система генотипирования растений рода *Solanum* на основании использования 20 пар праймеров (Табл. 1), позволяет проводить различие известных генотипов между собой (включая близкородственные сорта). Было выявлено 126 дескрипторов генетического разнообразия представителей рода *Solanum*, на основе которых созданы так называемые «генетические паспорта» исследуемых генотипов картофеля. В рамках проведенной работы на основе «генетических паспортов» построены дендрограммы (пример одной из них приведен на рис. 9), характеризующие генетические расстояния между сортами картофеля и дикорастущими сородичами.

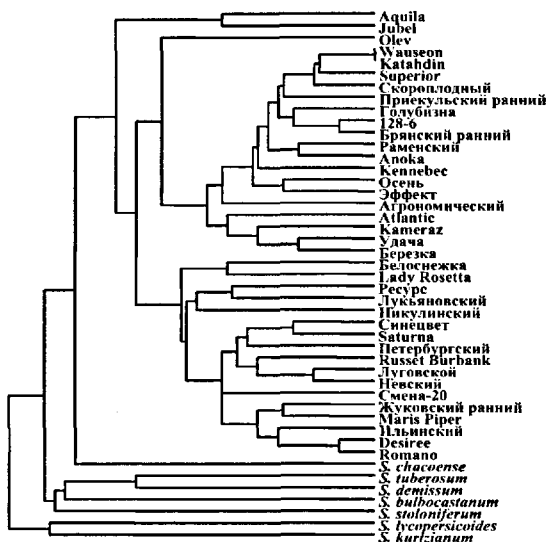


Рис. 9. Дендрограмма генетического разнообразия представителей рода *Solanum*, построенная по результатам анализа полиморфизма микросателлитных последовательностей.

Представленная дендрограмма (рис. 9), выявляет связи между сортами, которые достаточно хорошо соотносятся с их селекционными историями (родословными).

Дальнейшая работа по совершенствованию метода анализа полиморфизма микросателлитных последовательностей позволит создать «генетические паспорта»,

идентифицирующие генотипы. Прежде необходимо провести популяционное исследование, основанное на ДНК-анализе значительного количества образцов растений определенной группы, как по количеству ДНК-образцов, так и по их разнообразию. Таким образом, для каждого микросателлитного локуса на основе всех выявленных аллельных вариантов, будет составлена так называемая «аллельная лестница», отражающая весь набор аллельных вариантов для конкретного локуса с известной первичной структурой. Дальнейшая работа подразумевает проверку стабильности аллельных вариантов, содержащих микросателлитные последовательности для того или иного растения, после чего исследуемому образцу растения будет присвоен свой уникальный набор аллелей («генетический паспорт») по строго определенному списку микросателлитных локусов. Результатом столь масштабной работы станет возможность паспортизации новых сортов, сертификации семян и разнообразной продукции растениеводства.

4. Контроль интрогрессии генетического материала родительских форм в гибриды.

В настоящее время одним из основных методов селекции картофеля является межвидовая гибридизация, в частности, гибридизация с дикими видами картофеля. Однако передача полезных признаков от диких видов путем их непосредственного скрещивания с *S. tuberosum* осложняется по ряду причин, одной из которых является филогенетическая отдаленность видов. В целях преодоления межвидовой несовместимости, вызывающей отклонения от нормального процесса формирования гибридных семян, прибегают к использованию метода соматклональной гибридизации. Для оценки эффективности передачи генетического материала при межвидовой гибридизации картофеля мы изучали растительный материал, любезно предоставленный Г. А. Яковлевой (Институт картофелеводства ИАН, Беларусь), представляющий собой соматические гибриды и их семенное поколение, полученные при скрещивании *S. bulbocastanum* и *S. tuberosum*. Для установления природы интрогрессируемых фрагментов ДНК от родительских форм в гибриды в работе использовали образцы ДНК растений *S. bulbocastanum*, *S. tuberosum* (сорт Ласунак) и гибрида L 4-11 (рис. 10).

Соответствующие аллели размером 96, 104, 114 п.н. (рис. 10, А) и аллели размером 154, 166 п.н. (рис. 10, Б) клонировали в состав вектора pGEM-T Easy фирмы Promega (США).

Полученные данные о первичной структуре микросателлитного локуса STM 1105, локализованного на VIII хромосоме, представлены на рис. 11 и в целом согласуются с результатами работы [Milbourne D. *et al.*, 1998], в которой была определена первичная структура фрагмента ДНК размером 114 п.н. у *S. tuberosum*, содержащего мотив (ACTC)₆.

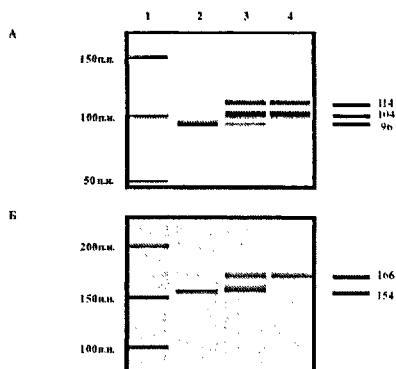


Рис. 10. Электрофореграммы разделения продуктов ПЦР в 8 % -ном полиакриламидном геле, полученных с праймеров STM 1105 (А) и STM 2005 (Б). В качестве матриц для ПЦР использовали образцы ДНК растений *S. bulbocastanum* (Sbk; дорожка 2), L 4-11 (Sbk × Ласунак; дорожка 3), *S. tuberosum* (сорт Ласунак; дорожка 4). (Соответствующие родительские пары и/или дорожки электрофореграммы указаны в скобках). Дорожка 1 - маркер молекулярной массы. 96, 104, 114, 154, 166 – размер аллелей соответствующего локуса, п.н.

Las. 114 **AAACCTGCTACAATAAGGCAGGCACCTCCTCATCTTTACTCACTCACTCACTCACTCACTC** : 64
L4-11. 114 **AAACCTGCTACAATAAGGCAGGCACCTCCTCATCTTTACTCACTCACTCACTCACTCACTC** : 64
L4-11. 104 **AAACCTGCTACAATAAGGCAGGCACCTCCTCATCTCT--C-----ACTCACTCACTCACTC** : 54
Las. 104 **AAACCTGCTACAATAAGGCAGGCACCTCCTCATCTCT--C-----ACTCACTCACTCACTC** : 54
Sbk. 96 **AAACCTGCTACAATAAGGC-----ACCTCCTCATCTCT--CAC--ACTC-----** : 40
L4-11. 96 **AAACCTGCTACAATAAGGC-----ACCTCCTCATCTCT--CAC--ACTC-----** : 40

Las. 114 **ACACAGCTCAAC-----AAGTGGTAACTTTTACTCATCTCCTCCAATTATTTCTG** : 114
L4-11. 114 **ACACAGCTCAAC-----AAGTGGTAACTTTTACTCATCTCCTCCAATTATTTCTG** : 114
L4-11. 104 **ACACAGCTCAAC-----AAGTGGTAACTTTTACTCATCTCCTCCAATTATTTCTG** : 104
Las. 104 **ACACAGCTCAAC-----AAGTGGTAACTTTTACTCATCTCCTCCAATTATTTCTG** : 104
Sbk. 96 **ACACAGCTCAACACTCAACAAGTGGTAACTTTTAC--CATCTCCTCCAATTATTTCTG** : 96
L4-11. 96 **ACACAGCTCAACACTCAACAAGTGGTAACTTTTAC--CATCTCCTCCAATTATTTCTG** : 96

Рис. 11. Первичная структура аллелей локуса STM 1105 интрогрессируемых из родительских форм *S. bulbocastanum* (Sbk) и *S. tuberosum* (сорт Ласунак, Las) в соматический гибрид Sbk × Ласунак (L4-11). 96, 104, 114 – размер соответствующего аллеля, п.н. Повторяющийся мотив (ACTC)_n подчеркнут. Последовательности праймеров отмечены жирным шрифтом.

Проведенный анализ первичных структур аллелей локуса STM 1105 позволяет говорить о полиморфизме микросателлитных последовательностей, основанном не только на различии в количестве тандемных повторов, но и на вариабельности областей, прилегающих к микросателлитному повтору.

Сведения о первичной структуре микросателлитного локуса STM 2005, локализованного на XI хромосоме, представлены на рис. 12 и согласуются с результатами работы [Milboume D. et al., 1998] с той только разницей, что в определенной нами первичной структуре фрагмента ДНК размером 166 п.н. у *S. tuberosum* содержится мотив

(CTGTTG)₅ вместо опубликованных авторами данных о наличии во фрагменте ДНК размером 166 п.н. мотива (CTGTTG)₃,

40

Las.166 TTTAAGTTCTCAGTTCTGCAGGGAAGTACTTTCATATAACATATATTTCTGTGTAAACGACGAAATA : 66
L4-11.166 TTTAAGTTCTCAGTTCTGCAGGGAAGTACTTTCATATAACATATATTTCTGTGTAAACGACGAAATA : 66
Sbk.154 TTTAAGTTCTCAGTTCTGCAGGGAAGTACTTTCATATAACATATATTTCTGTGTAGACGACGAAATA : 66
L4-11.154 TTTAAGTTCTCAGTTCTGCAGGGAAGTACTTTCATATAACATATATTTCTGTGTAGACGACGAAATA : 66

107

Las.166 AACAAATGCTGCTGTTGCTGTTGCTGGTCTGTTGCTGGTCTGCTAAGAGGGGACTATCGTGCCAA : 132
L4-11.166 AACAAATGCTGCTGTTGCTGTTGCTGGTCTGTTGCTGGTCTGCTAAGAGGGGACTATCGTGCCAA : 132
Sbk.154 AACAAATGCTGCTGTTGCTGTTGCTGGT-----TTGCTAAGAGGGGACTATCGTGCCAA : 120
L4-11.154 AACAAATGCTGCTGTTGCTGTTGCTGGT-----TTGCTAAGAGGGGACTATCGTGCCAA : 120

Las.166 TGTAGCCGAACCCAGCAATGGTAAAGGTTATGAC : 166
L4-11.166 TGTAGCCGAACCCAGCAATGGTAAAGGTTATGAC : 166
Sbk.154 TGTAGCCGAACCCAGCAATGGTAAAGGTTATGAC : 154
L4-11.154 TGTAGCCGAACCCAGCAATGGTAAAGGTTATGAC : 154

Рис. 12. Первичная структура аллелей локуса STM 2005 интрогрессируемых из родительских форм *S. bulbocastanum* (Sbk) и *S. tuberosum* (сорт Ласунак, Las) в соматический гибрид Sbk × Ласунак (L4-11). 154, 166 – размер соответствующего аллеля, п.н. Повторяющийся мотив (CTGTTG)₅ подчеркнут. Последовательности праймеров и нуклеотиды в позициях 40, 107 отмечены жирным шрифтом.

Анализ первичных структур микросателлитных повторов локуса STM 2005 позволяет объяснять полиморфизм длин аллелей только лишь различием в количестве повторяющихся гексануклеотидных единиц (CTGTTG). Интересно отметить, что по этим двум микросателлитным локусам обе родительские формы относительно друг друга имеют уникальные первичные структуры: нуклеотидные последовательности AGGC...TA...T (*S. tuberosum*) и АСТСААС (*S. bulbocastanum*), образующие соответствующие инсерции/делеции в первичных структурах аллелей гибрида L 4-11 (рис. 11) или точечные нуклеотидные замены в позициях 40 и 107 (рис. 12), которые отчетливо наследуются гибридом L 4-11.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные нами экспериментальные исследования позволили создать эффективную универсальную технологию для генотипирования картофеля и его дикорастущих сородичей. Применение техники микросателлитного анализа: оптимизированный способ выделения растительной ДНК; применение современных подходов к проведению ПЦР (использование термостабильных ферментов, обеспечивающих проведение «горячего старта» ПЦР); применение метода высокоразрешающего электрофореза в денатурирующих условиях, исключающего возникновения артефактов в

ПЦР, позволяет различать растительные геномы, включая близкородственные, а также осуществлять контроль интрогрессии генетического материала от родительских форм в гибриды/сорта; сравнение генетических «отпечатков пальцев» контрольных образцов с генетическими «отпечатками пальцев» экспертных образцов позволяет отслеживать и подтверждать сортовую подлинность последних. Предлагаемая в нашей работе технология анализа микросателлитов позволит в будущем приблизиться к внедрению методов контроля продуктов растениеводства; к введению в действие автоматизированной информационной системы, обеспечивающей быстрый сбор, обработку, хранение и использование данных о генетических ресурсах («генетический паспорт» растения).

По материалам работы составлены и опубликованы методические рекомендации для специалистов-биотехнологов, сельскохозяйственных биотехнологических и селекционных центров, научно-исследовательских институтов.

ВЫВОДЫ

1. Разработана эффективная универсальная технология генотипирования представителей рода *Solanum*. По результатам исследования 85 генотипов картофеля и его дикорастущих сородичей предложен оптимальный набор праймеров (20 пар праймеров), с помощью которого возможно различать и идентифицировать растения рода *Solanum*.
2. С помощью разработанной технологии проведено межвидовое и внутривидовое различение растений рода *Solanum*. Проведено генотипирование 44 сортов картофеля отечественной и зарубежной селекции. На основе анализа генотипов показана возможность различия близкородственных сортов картофеля Альтаир и Аксамит, в селекции которых участвовали одни и те же родительские формы.
3. Впервые показано, что предлагаемая технология микросателлитного анализа позволяет осуществлять контроль интрогрессии генетического материала родительских форм в гибриды/сорта. На основе экспериментального анализа первичных структур ряда микросателлитных локусов показана возможность контроля интрогрессии генетического материала дикого вида *S. bulbocastanum* и сорта Ласунак в гибрид L 4-11, а также интрогрессии генетического материала родительских форм, участвовавших в селекции сорта Скороплодный.
4. С помощью разработанной технологии микросателлитного анализа проведено подтверждение сортовой подлинности экспертных образцов картофеля сорта Голубизна, полученных из различных опытно-производственных хозяйств.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Бирюкова В.А., Велишаева Н.С., Зайцев В.С., Хавкин Э.Е., Хромова Л.М., Шилов И.А. ДНК – дактилоскопия картофеля и его дикорастущих сородичей. // Вопросы картофелеводства. Материалы «Школы молодых ученых». Всерос. НИИ картофельного хозяйства. - М., 2004. С. 114-123.
2. Анискина Ю.В., Бирюкова В.А., Велишаева Н.С., Мартынов В.В., Панкин А.А., Прибылова Т.А., Хавкин Э.Е., Шилов И.А. ДНК - генотипирование растений *Brassica* и *Solanum*. // III Международная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». Тезисы докладов. Москва. 19 октября 2004 г. С. 119-120.
3. Анискина Ю.В., Бирюкова В.А., Велишаева Н.С., Панкин А.А., Прибылова Т.А., Хавкин Э.Е., Шилов И.А. ДНК – генотипирование растений родов *Brassica* и *Solanum*. // Сельскохозяйственная биология. 2005 г. №1. С. 110-119.
4. Анискина Ю.В., Велишаева Н.С., Шилов И.А., Хавкин Э.Е. Генотипирование пасленовых и крестоцветных растений методом микросателлитного анализа. // Методические рекомендации, ВНИИСБ. Москва. 2005 г. 21 С.
5. Бекетова М.П., Бирюкова В.А., Велишаева Н.С., Дробязина П.Е., Зайцев В.С., Хавкин Э.Е., Шилов И.А., Яковлева Г.А. ДНК маркеры интрогрессии устойчивости к фитофторозу картофеля. // III Московский международный конгресс. Биотехнология: состояние и перспективы развития. Москва. 14-18 марта 2005 г. С. 227.
6. Велишаева Н.С., Бирюкова В.А., Яковлева Г.А., Хавкин Э.Е. Применение метода микросателлитного анализа для ДНК-генотипирования картофеля и его дикорастущих сородичей. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье». Суздаль. 19 – 22 мая 2005 г. С. 333.
7. Велишаева Н.С., Шилов И.А., Хавкин Э.Е. Использование технологии микросателлитного анализа для различения сортов картофеля и его дикорастущих сородичей. // Вопросы картофелеводства. Актуальные проблемы науки и техники. Научные труды. Всерос. НИИ картофельного хозяйства. - М., 2006. С. 228 – 235.
8. Велишаева Н.С., Хавкин Э.Е., Шилов И.А. Генотипирование картофеля и его дикорастущих сородичей методом полиморфизма микросателлитов. // Доклады РАСХН. 2006 г. № 5. С. 3 – 5.

