

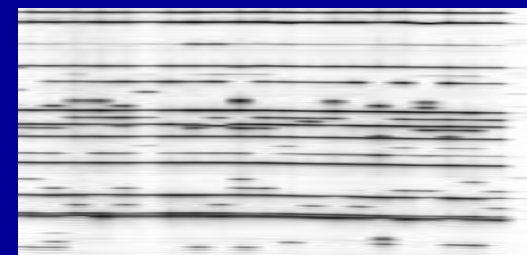
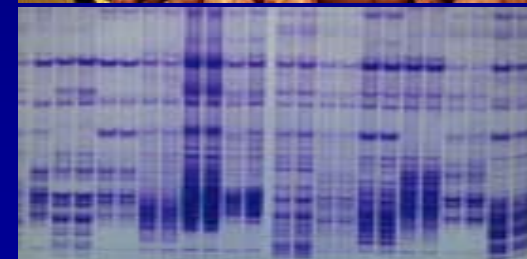
Молекулярные методы генотипирования и паспортизация сортов картофеля

Центр «Биоинженерия» РАН

Маркерные системы идентификации, использующихся в генетике и селекции картофеля

Маркер - это признак или молекула, которая может быть использована для отслеживания определенного признака или гена у анализируемых генотипов

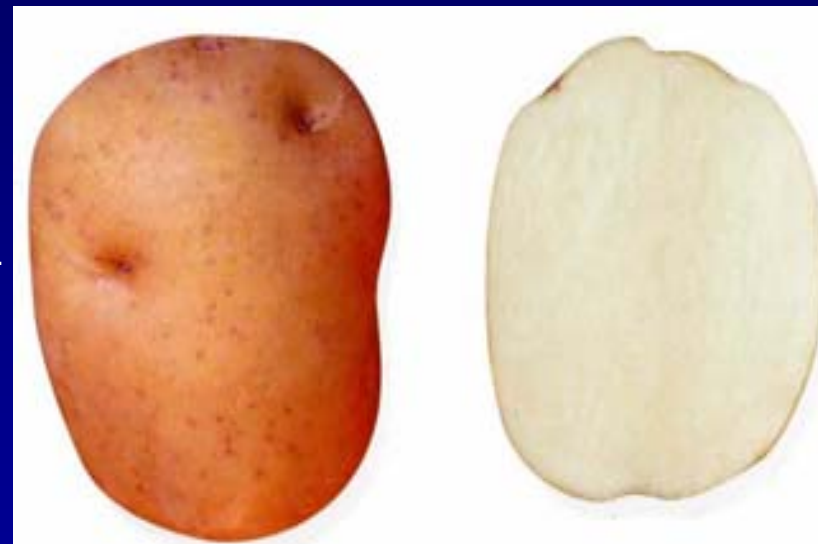
- Морфо-физиологические
- Биохимические
- Молекулярные



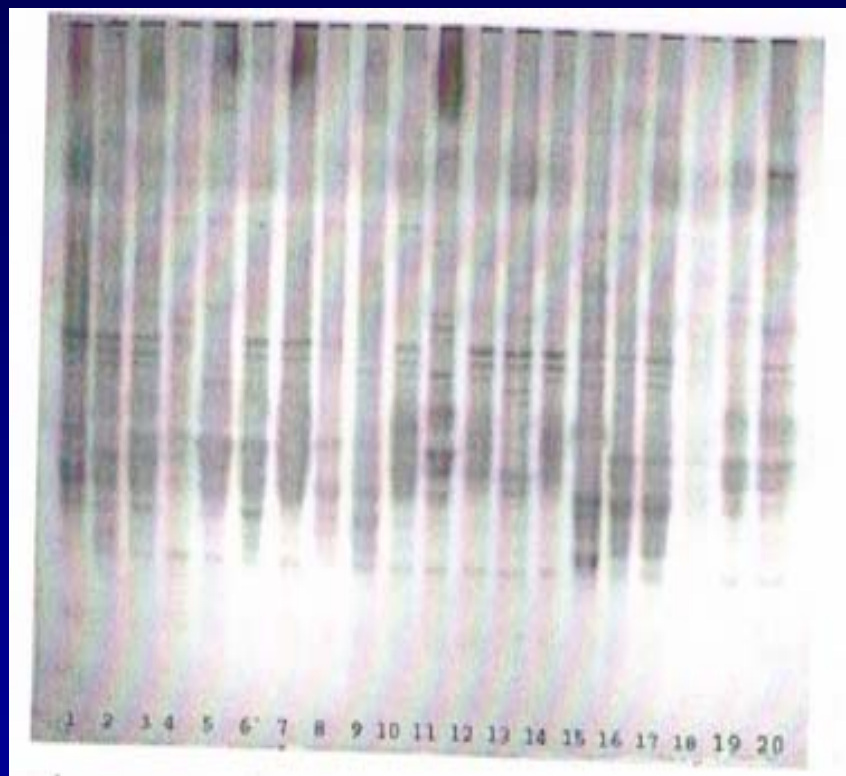
Морфо-физиологические маркеры сортов картофеля

*В Российском Государственном реестре в 2011 году, представлено
290 сортов картофеля, охраняются патентами 152 сорта.*

- ®
9601597
ИЛЬИНСКИЙ
Патентообладатель: ГНУ ВНИИ КАРТОФЕЛЬНОГО ХОЗЯЙСТВА ИМ. А.Г. ЛОРХА
Включен в Госреестр по Центрально-Черноземному (5) региону. Среднеранний, столового назначения.
- Растение средней высоты, листового типа, полупрямостоячее. Лист и листочек среднего размера, зеленые. Волнистость края отсутствует или очень слабая. Соцветие маленькое. Венчик средний, красно-фиолетовый.
- Товарная урожайность 176-346 ц/га, на уровне и на 144 ц/га выше стандарта Невский. Максимальная урожайность - 355 ц/га, на 56 ц/га выше стандарта (Липецкая обл.). Клубень овальный. Кожура красная, гладкая. Мякоть белая. Масса товарного клубня 54-158 г. Содержание крахмала 15,7-18,0%, на 1,5-4,6% выше стандарта Невский. Вкус хороший. Товарность 87-99%, на уровне стандарта. Лежкость 93%. Устойчив к возбудителю рака картофеля, восприимчив к золотистой картофельной цистообразующей нематодe. Восприимчив по ботве к изолятам возбудителя фитофтороза, выделенным в Московской обл., Республике Коми, Омской обл., Приморском крае; по клубням - умеренно восприимчив и умеренно устойчив к изоляту, выделенному в Московской обл. Ценность сорта: стабильная урожайность, хорошие вкусовые качества клубней, высокая товарность.

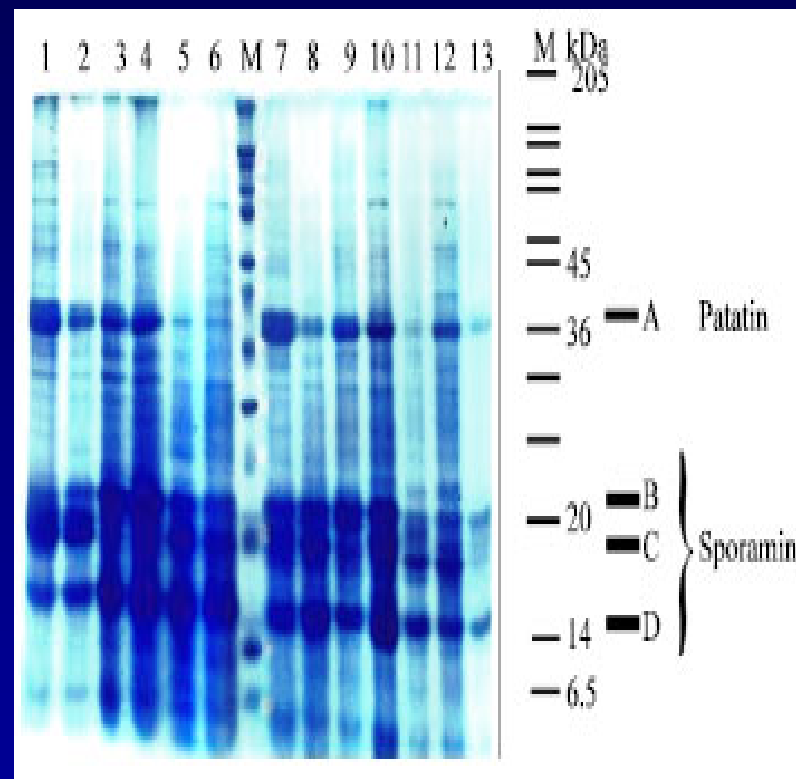


Биохимические маркеры сортов картофеля



Полиморфизм запасных белков клубней картофеля

Дементьева З.А., 2008



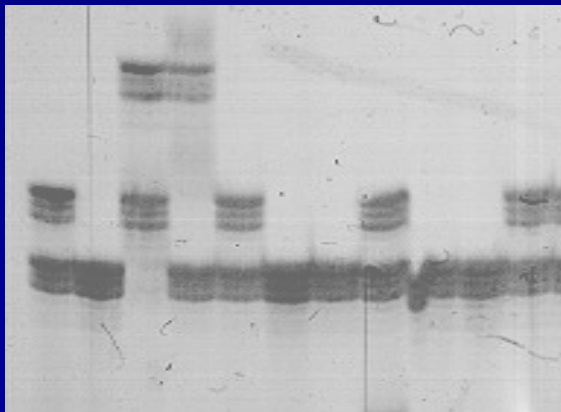
Comparison of **SDS-PAGE** protein patterns of 13 varieties

Ali and Javad , 2007

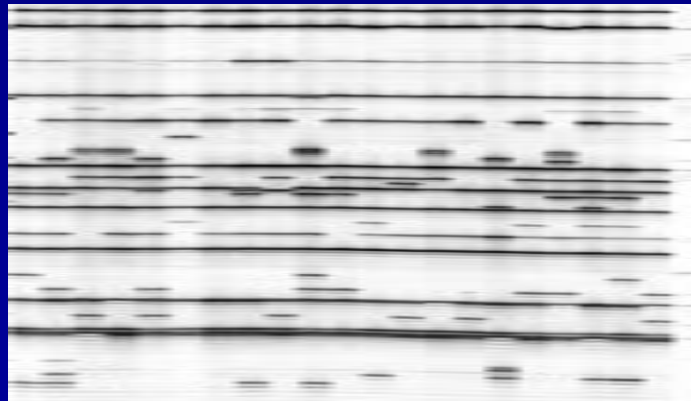
Молекулярные маркеры

«Идеальные» молекулярные маркеры для селекции:

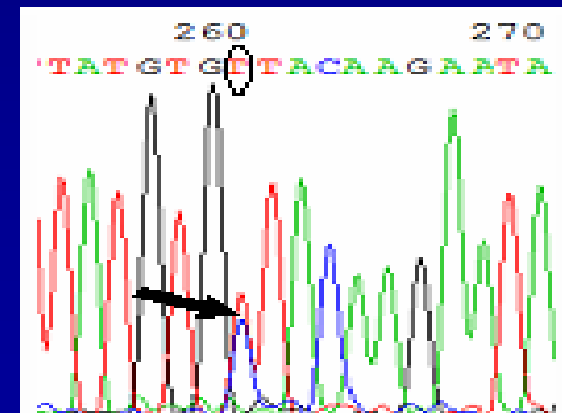
- обладают высокой дискриминационной способностью (высоко полиморфны)
- надежны и воспроизводимы
- равномерно распределены по геному
- легко анализируемы
- относительно недороги



SSR-маркирование



AFLP- маркирование

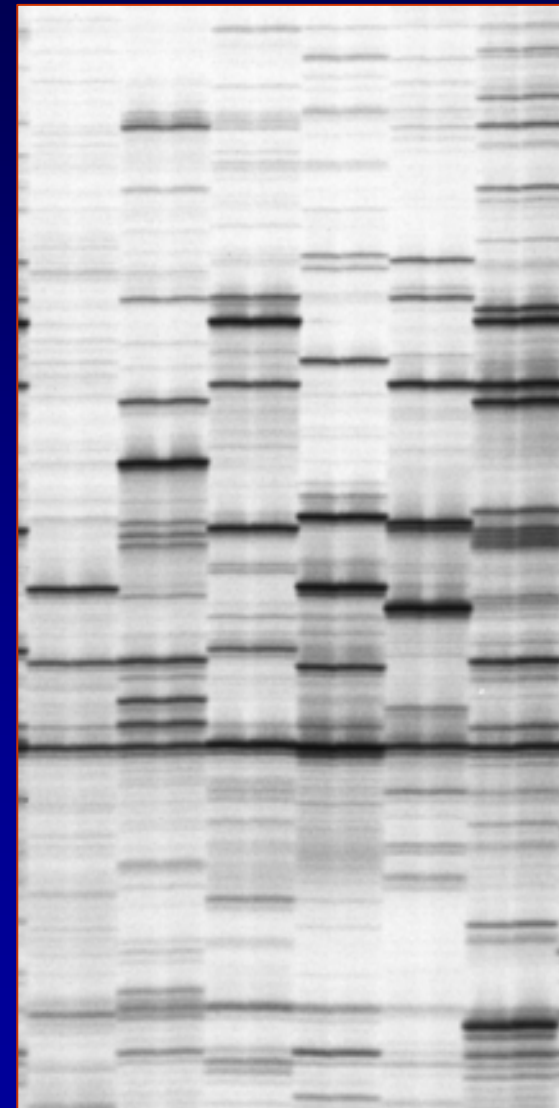
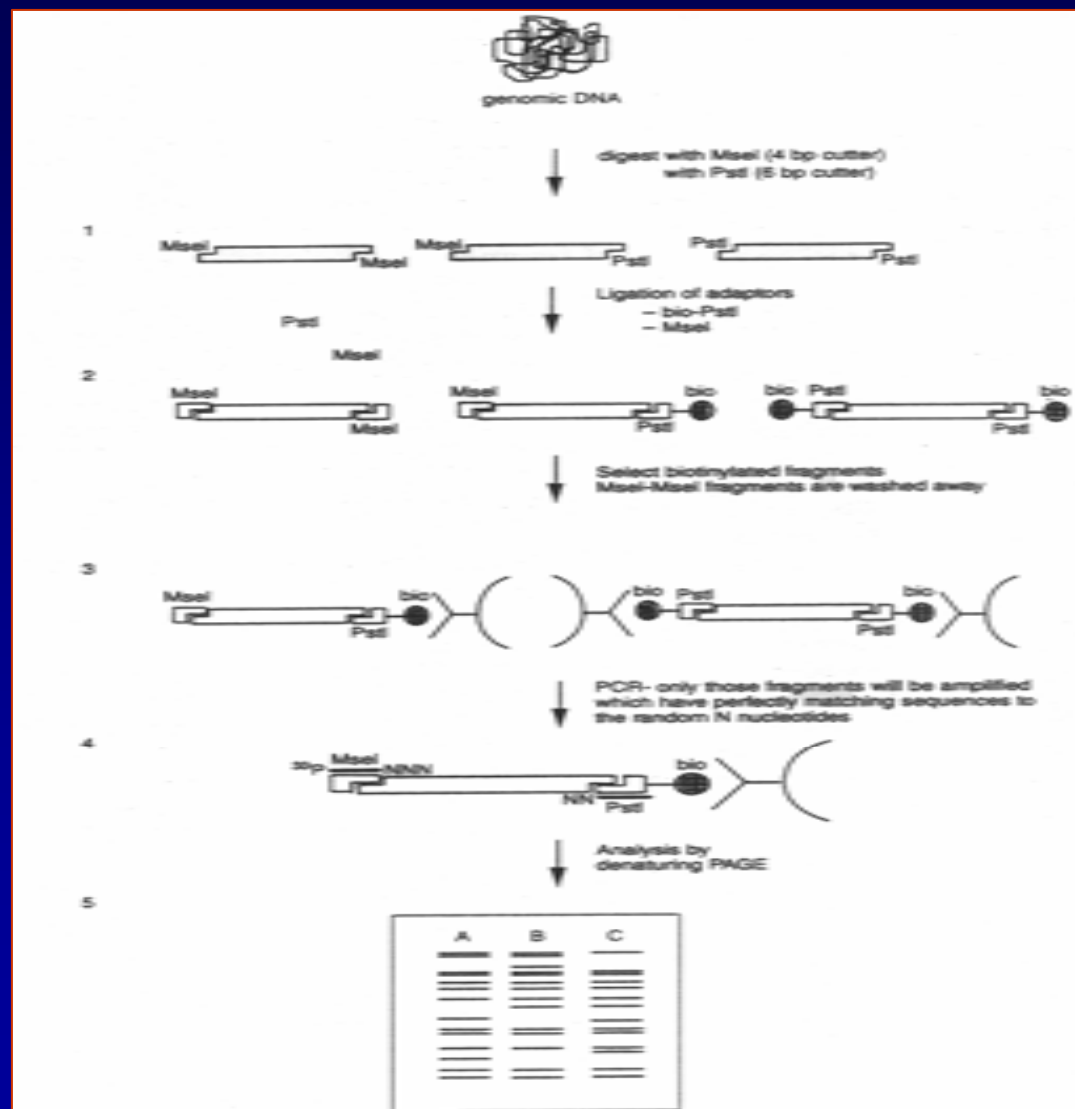


SNP маркирование

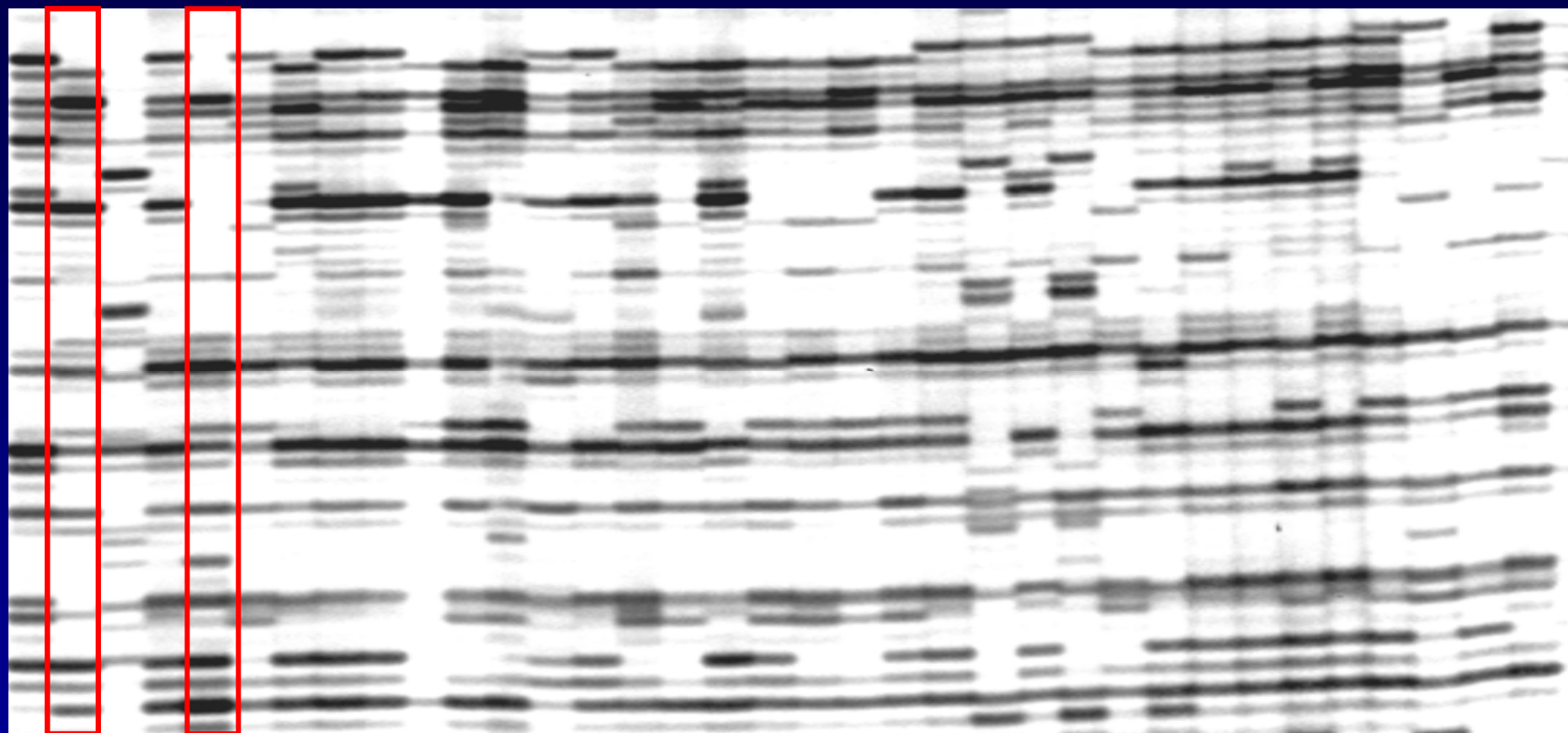
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ПАСПОРТИЗАЦИИ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ

- AFLP маркирование**
- SSR маркирование**
- SNP маркирование**

AFLP-метод маркирования генома сортов картофеля



Определение геномного полиморфизма сортов *S. tuberosum* отечественной селекции



AFLP спектр
сорт Ресурс

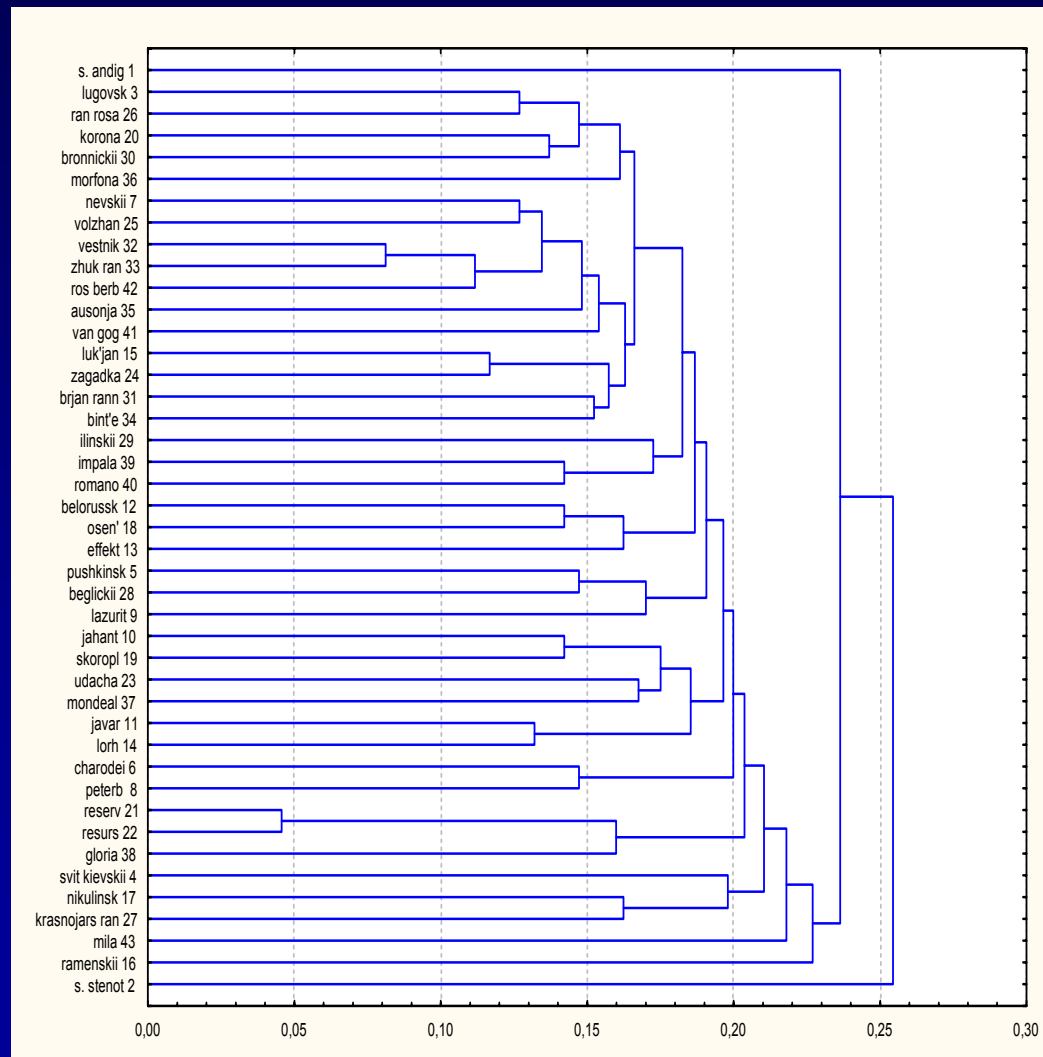
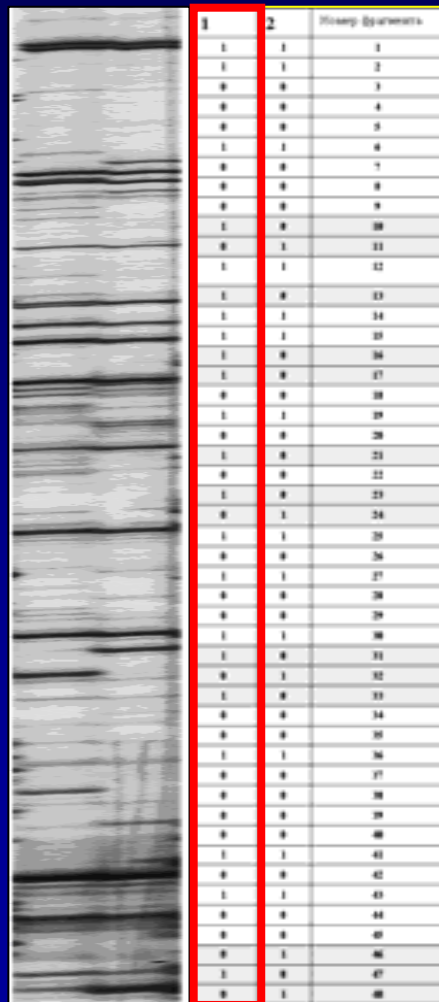
Сорт Невский

- Разработаны системы для маркирования сортов : E35/T55 E35/T59 E44/T61 E35/T59C E35/T55C
- Для каждого сорта получены индивидуальные AFLP спектры

AFLP-метод маркирования генома сортов картофеля

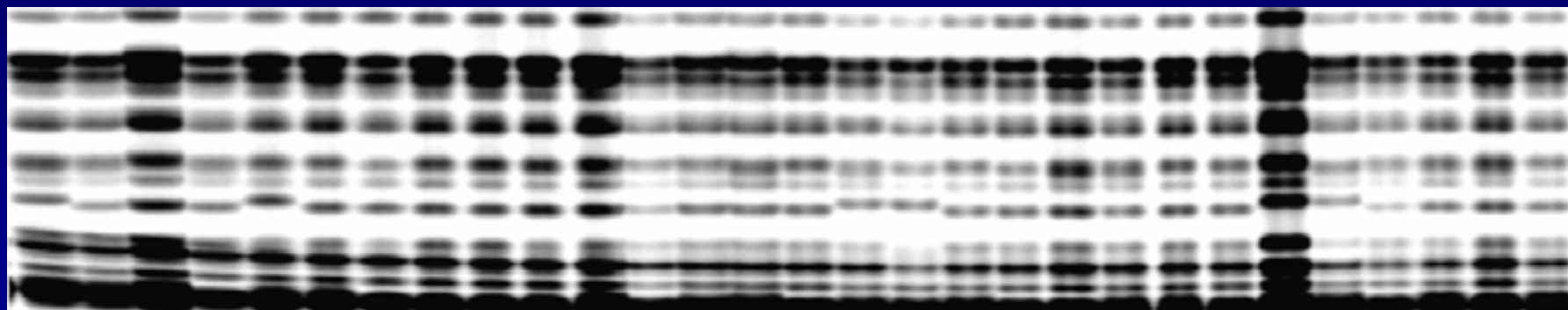
AFLP ПАНЕЛЬ

1 2



Использование разработанной системы AFLP-маркирования для определения сортовой однородности

Сорт Ильинский



МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ПАСПОРТИЗАЦИИ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ

- AFLP маркирование
- SSR маркирование
- SNP маркирование

Микросателлитный SSR-анализ

Микросателлит - 1-8 нуклеотидная последовательность, повторенная n раз

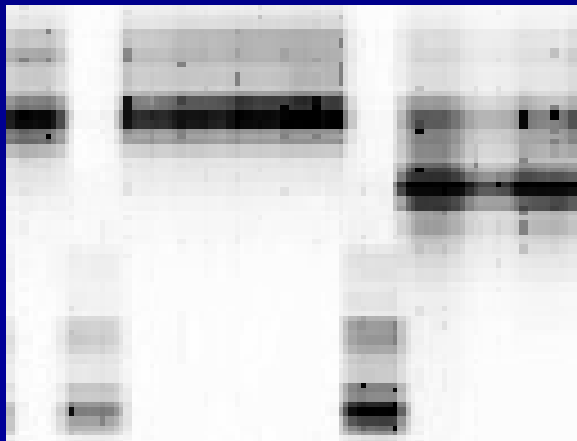
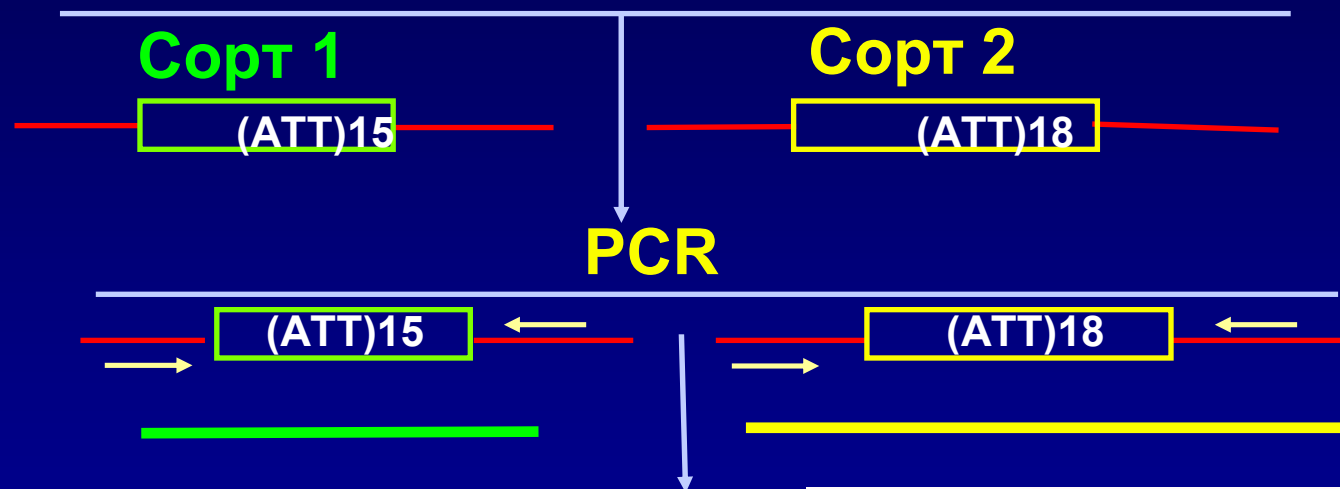
Примеры:

A A A A A A A A A A (A)11

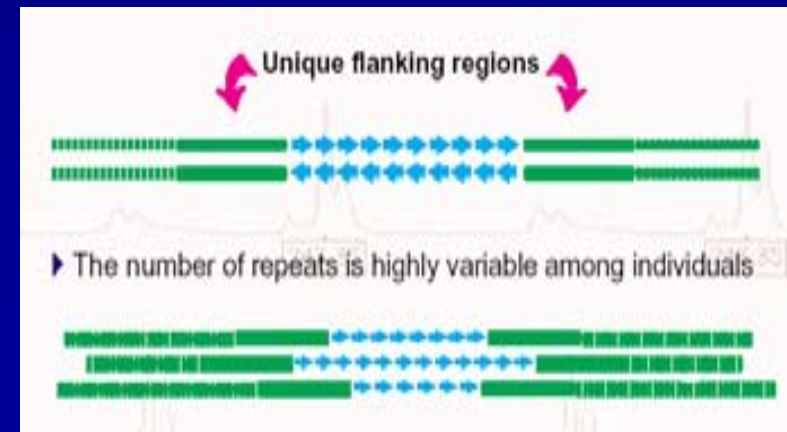
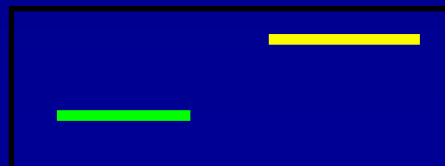
AT AT AT AT AT AT AT AT (AT)8

CGA CGA CGA CGA CGA CGA (CGA)6

Полиморфизм : по количеству повторов (и, следовательно, длине)



Электрофорез



Разработка SSR маркеров

- В результате анализа баз данных подобраны микросателлитные SSR локусы различной хромосомной локализации
- разработаны **52 пары** оригинальных SSR праймеров, приводящих к амплификации этих локусов.
- проведено SSR генотипирование сортов картофеля
- оценена степень информативности разработанных праймеров; определен спектр и частоты встречаемости аллельных вариантов
- **определен уровень полиморфизма** SSR локусов у сортов отечественной селекции
- Была **разработана SSR панель**, позволяющая дискриминировать сорта конкретной культуры и для каждого исследованного сорта установлена аллельная SSR формула.

SSR-маркирование видов и сортов картофеля

Характеристика локусов ядерных микросателлитов

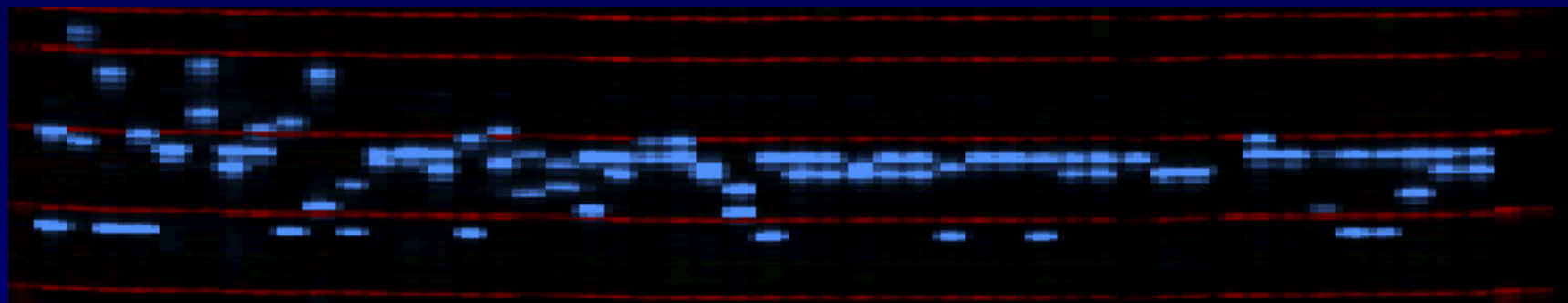
Локус	Число аллельных вариантов	Встречаемость аллельного варианта, %	Информативность, H
STU015	7	A-27.6 B - 13.8 C- 13.8 D- 6.9 E- 27.6 F- 6.9 G – 3.4	0.89
STU047	5	A-51.9; B -33.3; D-7.4; C,E-3.7	0.64
STU083	13	A-23.2; B -19.2; C -11.6; D, E -7.8; F, G, H, I, J,K,L ,M - 3.8	0.9
STU001	18	A-18.8; B,C -9,4; D,E,F,G -6,3; H,I,J,K,L,M,N,O,P,R,S - 3.1	0.95
STU012	12	A-18.8; B -15.6; C,D,H,I,J -6.3; E,F-9.4; K,L,M -3.1	0.92
STU104	11	A-40.6; B-21.9; C -9.4;D -6.3; E,F,G,H,J,I,N -3.1	0.79
STU058	10	A-25.0; B,D,E -15.6; G -9.4; F -6.3; C,H,I,J -3.1	0.87
STU092	7	A-31.3; B-18.8; C,D -12.5; E,F -6.3; G-3.1	0.84
STU005	7	A,E-29.6; B,C -11.1;D,F -7.4; G -3.7	0.82

Аллельная вариабельность SSR локуса у видов *Solanum* и сортов *S.tuberosum*

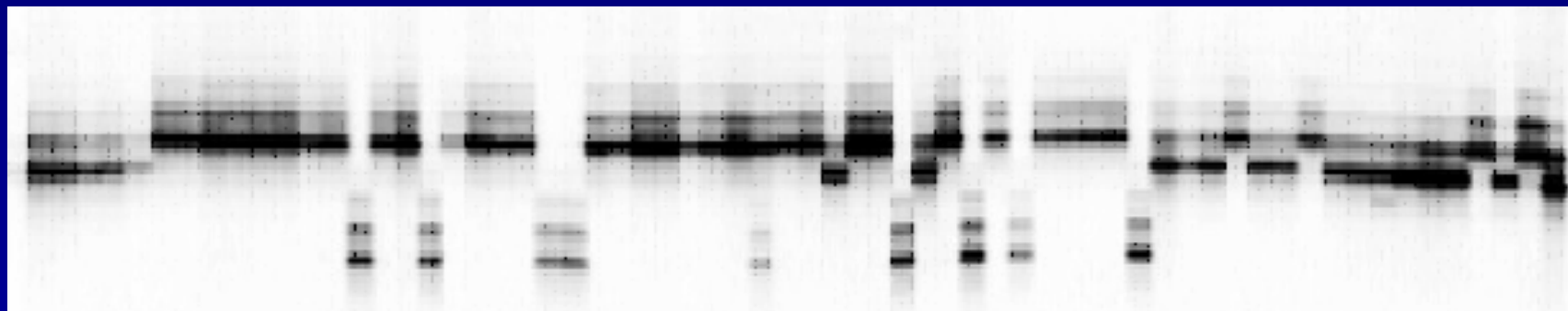
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35



Использование SSR-метода для маркирования сортов



микросателлит- (GG)8 ATTC (CA)5



микросателлит- (CCGA)12 (AT)5

Панель SSR- маркеров сортов картофеля

	Локус	STU01							STU04					STU08											
	Аллель	A	B	C	D	E	F	G	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Russet Burbunk				+					+								+							
2	Mondeal					+				+				+											
3	Bintje	+								+						+									
4	Romano			+					+															+	
5	Пушкинский			+						+															+
6	Чародей							+				+				+									
7	Невский					+			+							+									
8	Петербургский		+							+							+								
9	Лазурит				+							+		+											
10	Яхонт					+			+										+						
11	Эффект					+			+									+							
12	Лорх	+							+													+			
13	Лукьяновский					+			+							+									
14	Раменский	+							+					+											
15	Никулинский						+						+	+											
16	Осень			+						+															
17	Скороплодный	+								+													+		
18	Корона					+			+					+											
19	Резерв		+							+						+									
20	Удача			+								+													
21	Загадка		+							+												+			
22	Волжанин					+			+															+	
23	Ранняя Роза		+						+										+						
24	Красноярский	+								+				+											
25	Беглицкий						+				+														
26	Ильинский	+							+															+	
27	Бронницкий	+							+																
28	Вестник	+							+											+					
29	Жуковский					+			+													+			

SSR паспорт сорта

SSR паспорт сорта

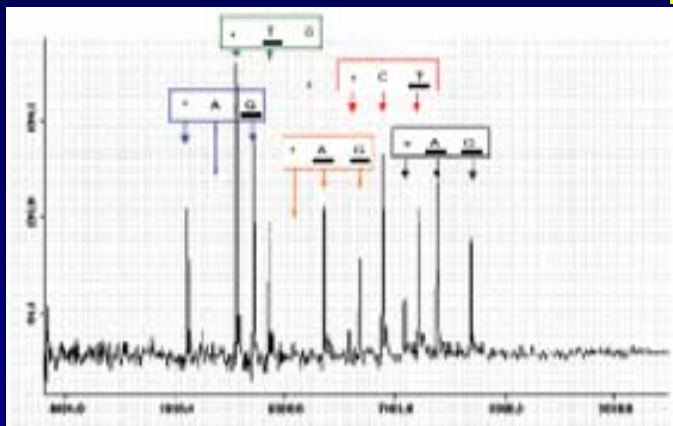
SSR паспорт сорта

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ПАСПОРТИЗАЦИИ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ

- **AFLP** маркирование
- **SSR** маркирование
- **SNP** маркирование

SNP маркирование

Single Nucleotide Polymorphism (**SNP**) –
точковый полиморфизм



Сорт 1 → ACGTGT**G**CCACGTGCCCA**A**ATG

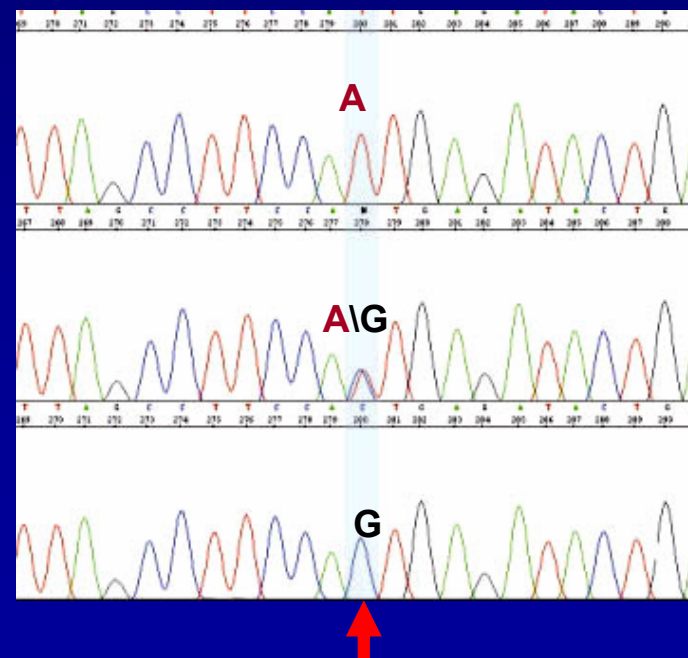
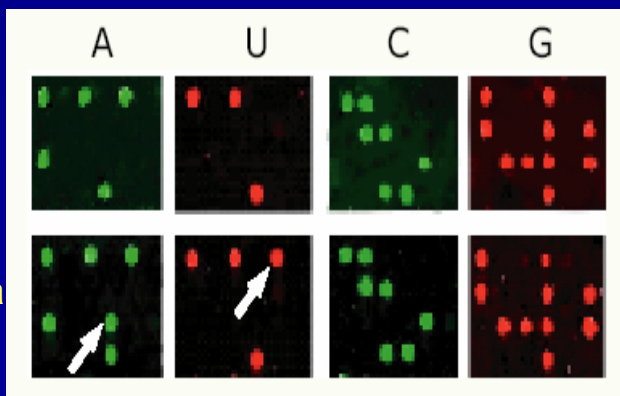


Сорт 2 → ACGTGT**T**CCACGTGCCCA**G**ATG

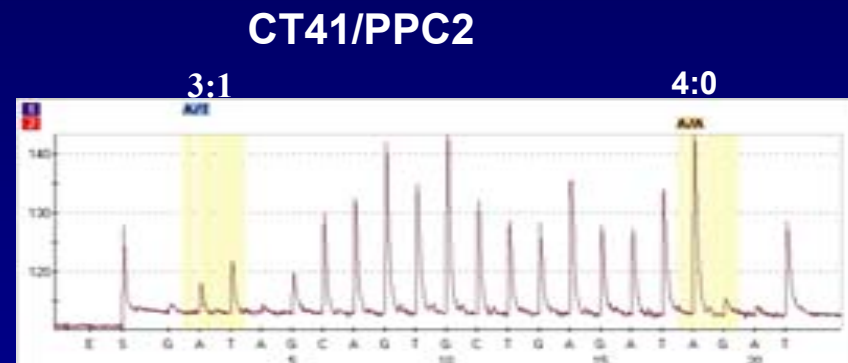
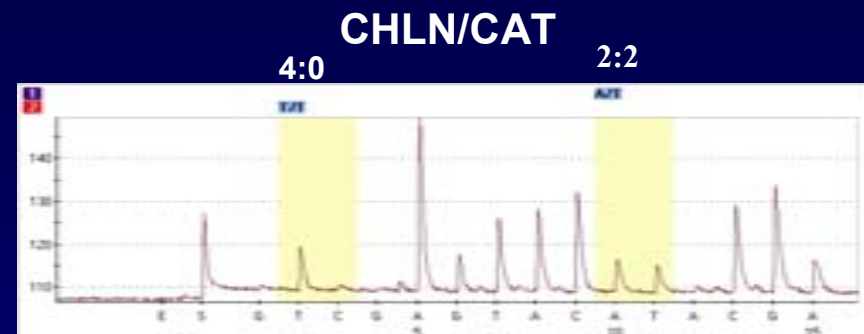
Детекция SNP сортов
с помощью микрочипов

сорт Roma

сорт Andretta



Использование **SNP** маркирования для определения аллельного состояния и паспортизации сортов *S. tuberosum*



Определение SNP у сортов картофеля с помощью микрочипов

сорт
Луговской



сорт
 Bintje



* совместно с М. Ван Кауеном

SNP панель для маркирования сортов картофеля

№	Название сорта картофеля	TU8_7 (T/C)	TU5_6 (G/A)	TU2_10 (A/G)	TU12_11 (A/T)
1	Russet Burbunck	T/C	G/G	A/A	A/T
2	Mondeal	3T/C	G/G	A/G	A/T
3	Bintije	T/3C	G/A	A/G	A/3T
4	Romano	T/C	3G/A	A/G	A/A
5	Пушкинский	T/C	G/A	A/A	A/A
6	Чародей	T/C	3G/A	A/A	A/T
7	Невский	3T/C	G/G	A/A	A/3T
8	Петербургский	T/3C	G/G	A/A	A/3T
9	Лазурит	T/3C	G/A	A/A	A/3T
10	Яхонт	T/3C	G/G	A/A	A/A
11	Эффект	T/C	A/A	A/G	A/T
12	Лорх	T/C	G/G	A/A	A/A
13	Лукьяновский	T/C	G/G	3A/G	A/A
14	Раменский	T/3C	G/G	3A/G	A/3T
15	Никулинский	3T/C	A/A	A/G	A/3T
16	Осень	T/C	G/G	A/G	A/T
17	Скороплодный	3T/C	G/G	A/A	A/T
18	Корона	3T/C	G/G	A/G	A/3T
19	Резерв	T/3C	G/G	A/G	A/T
20	Удача	3T/C	G/A	A/G	A/A
21	Загадка	T/C	G/G	A/G	A/A
22	Волжанин	T/C	G/A	A/G	A/A
23	Ранняя Роза	3T/C	G/G	A/G	A/A
24	Красноярский	3T/C	3G/A	A/G	A/3T
25	Беглицкий	T/3C	G/G	A/G	A/A
26	Ильинский	T/C	G/G	3A/G	A/3T
27	Бронницкий	T/C	G/G	A/G	A/3T
28	Вестник	3T/C	3G/A	A/G	A/A
29	Жуковский	3T/C	G/G	3A/G	A/3T

Аллельный статус SNP

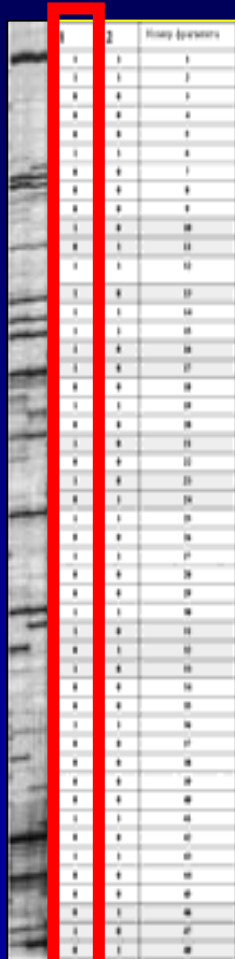
Гомозиготы 4:0 0:4
Гетерозиготы 2:2 3:1 1:3

SNP
ПАСПОРТ СОРТА

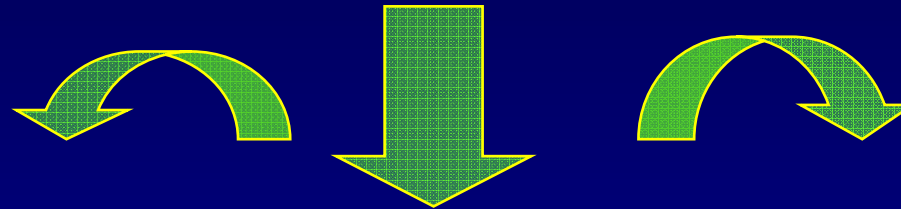
SNP
ПАСПОРТ СОРТА

Молекулярный паспорт

AFLP ПАНЕЛЬ



сорта картофеля Эффект



SSR ПАНЕЛЬ

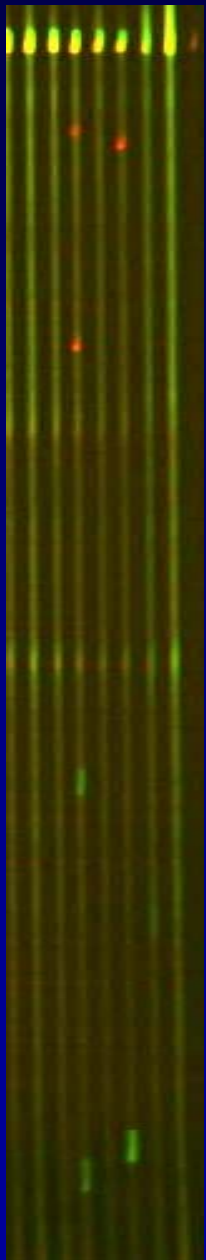
	Линия	STU016							STU047							STU082						
	Аланья	A	B	C	D	E	F	G	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L		
1	Russet Burbank																					
2	Mondeal																					
3	Bintje																					
4	Romano																					
5	Пучковский																					
6	Чародей																					
7	Нисский																					
8	Петербургский																					
9	Латуня																					
10	Восток																					
11	Эффект																					
12	Лора																					
13	Лукоминский																					
14	Романский																					
15	Нисский																					
16	Соня																					
17	Скороспелый																					
18	Корона																					
19	Резерв																					
20	Удача																					
21	Защита																					
22	Волжанин																					
23	Роман Рок																					
24	Краснодарский																					
25	Белый																					
26	Ильинский																					
27	Бронзовый																					
28	Восток																					
29	Жуковский																					

SNP ПАНЕЛЬ

№	Название сорта картофеля	TUB_7 (T/C)	TUB_8 (G/A)	TUB_10 (A/G)	TUB_11 (A/T)
1	Russet Burbank	T/C	G/G	A/A	A/T
2	Mondeal	ST/C	G/G	A/G	A/T
3	Bintje	T/C	G/A	A/G	A/ST
4	Romano	T/C	SG/A	A/G	A/A
5	Пучковский	T/C	G/A	A/A	A/A
6	Чародей	T/C	SG/A	A/A	A/T
7	Нисский	ST/C	G/G	A/A	A/ST
8	Петербургский	T/C	G/G	A/A	A/ST
9	Латуня	T/C	G/A	A/A	A/ST
10	Восток	ST/C	G/G	A/A	A/ST
11	Эффект	T/C	A/A	A/G	A/T
12	Лора	T/C	G/G	A/A	A/A
13	Лукоминский	T/C	G/G	SA/G	A/A
14	Романский	T/C	G/G	SA/G	A/ST
15	Нисский	ST/C	A/A	A/G	A/ST
16	Соня	T/C	G/G	A/G	A/T
17	Скороспелый	ST/C	G/G	A/A	A/T
18	Корона	ST/C	G/G	A/G	A/ST
19	Резерв	T/C	G/G	A/G	A/T
20	Удача	ST/C	G/A	A/G	A/A
21	Защита	T/C	G/G	A/G	A/A
22	Волжанин	T/C	G/A	A/G	A/A
23	Роман Рок	ST/C	G/G	A/G	A/A
24	Краснодарский	ST/C	SG/A	A/G	A/ST
25	Белый	T/C	G/G	A/G	A/A
26	Ильинский	T/C	G/G	SA/G	A/ST
27	Бронзовый	T/C	G/G	A/G	A/ST
28	Восток	ST/C	SG/A	A/G	A/A
29	Жуковский	ST/C	G/G	SA/G	A/ST



Метод EcoTILLING



Амплификация фрагмента анализируемого гена

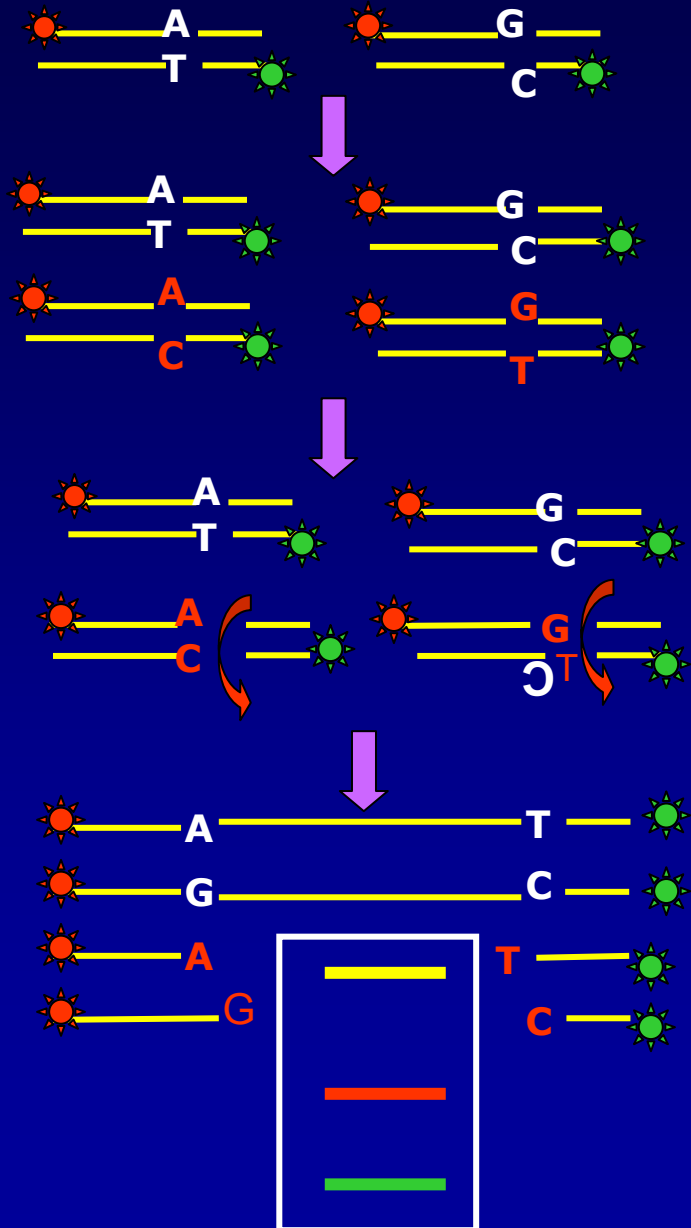


праймеры с флуорометкой

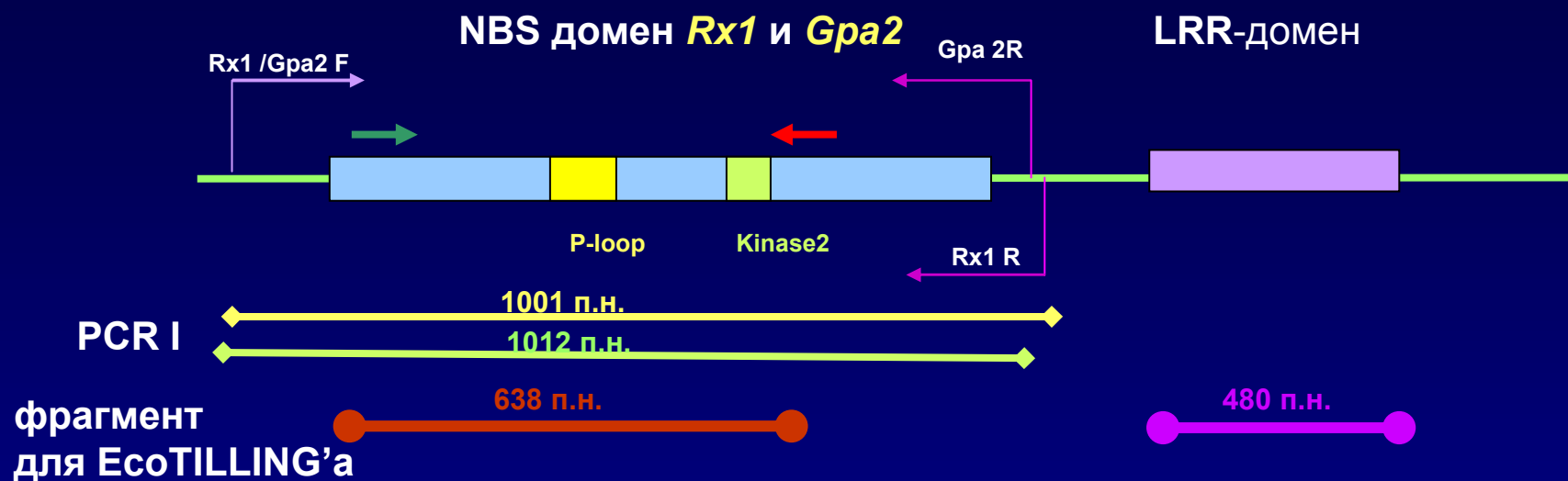
**Денатурация \ ренатурация
образование гетродуплексов**

**Рестрикция гетродуплексов
EndoI nucléase**

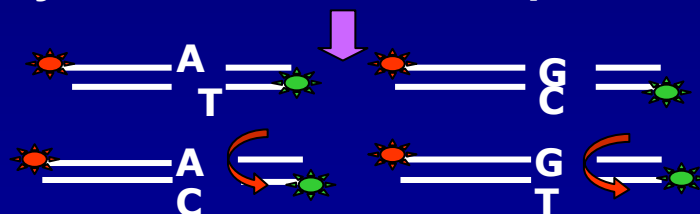
**Анализ продуктов на
денатурирующем
акриламидном
геле (LICOR)**



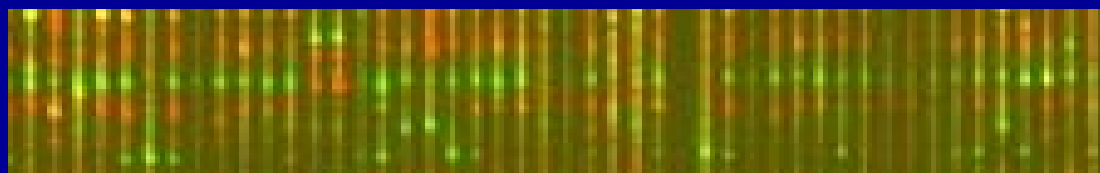
EcoTILLING – новый метод анализа variability генов



обработка нуклеазой *Endo I* и образование гетродуплекса



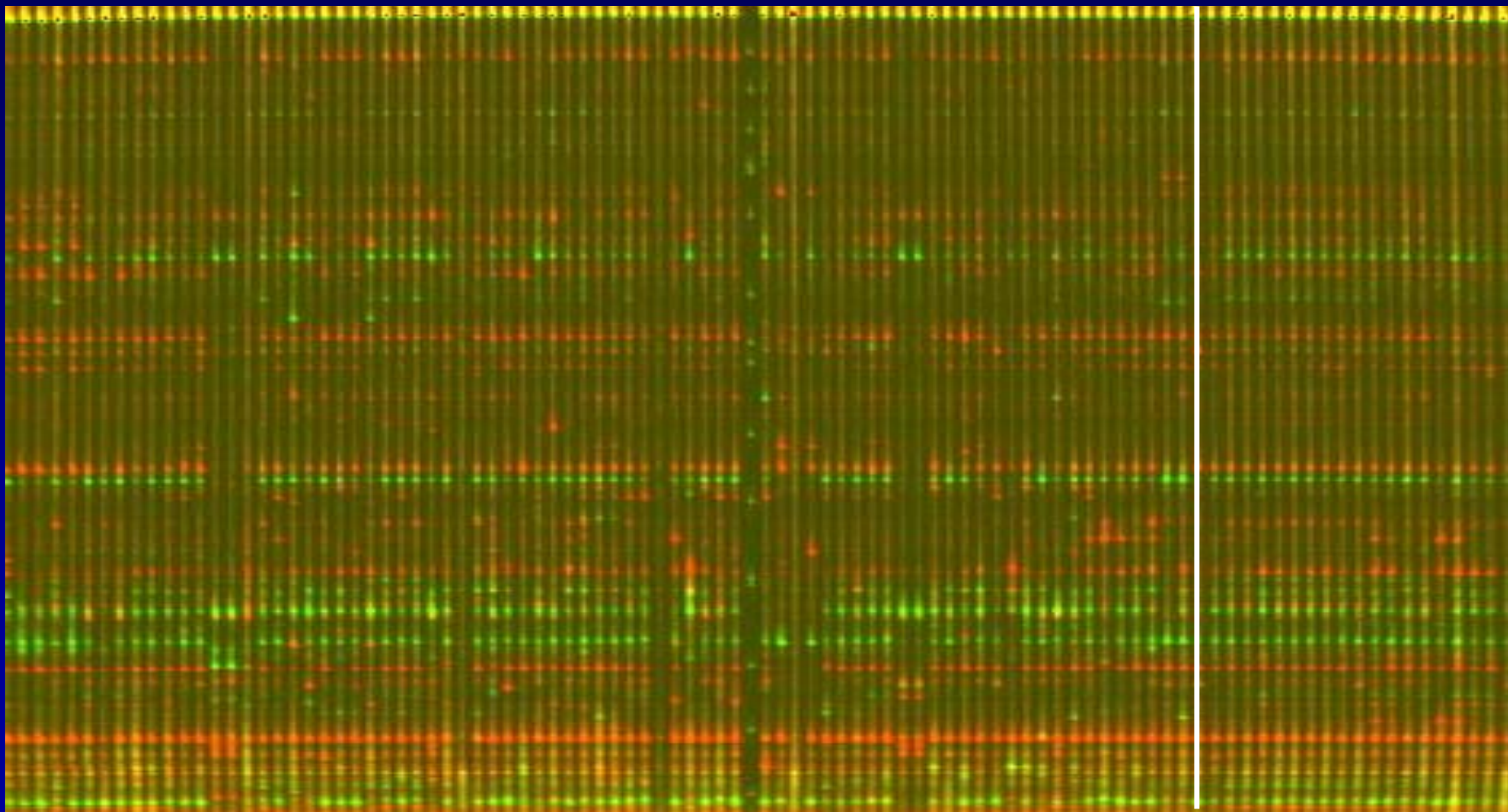
визуализация нуклеотидных замен с помощью LiCor 4300



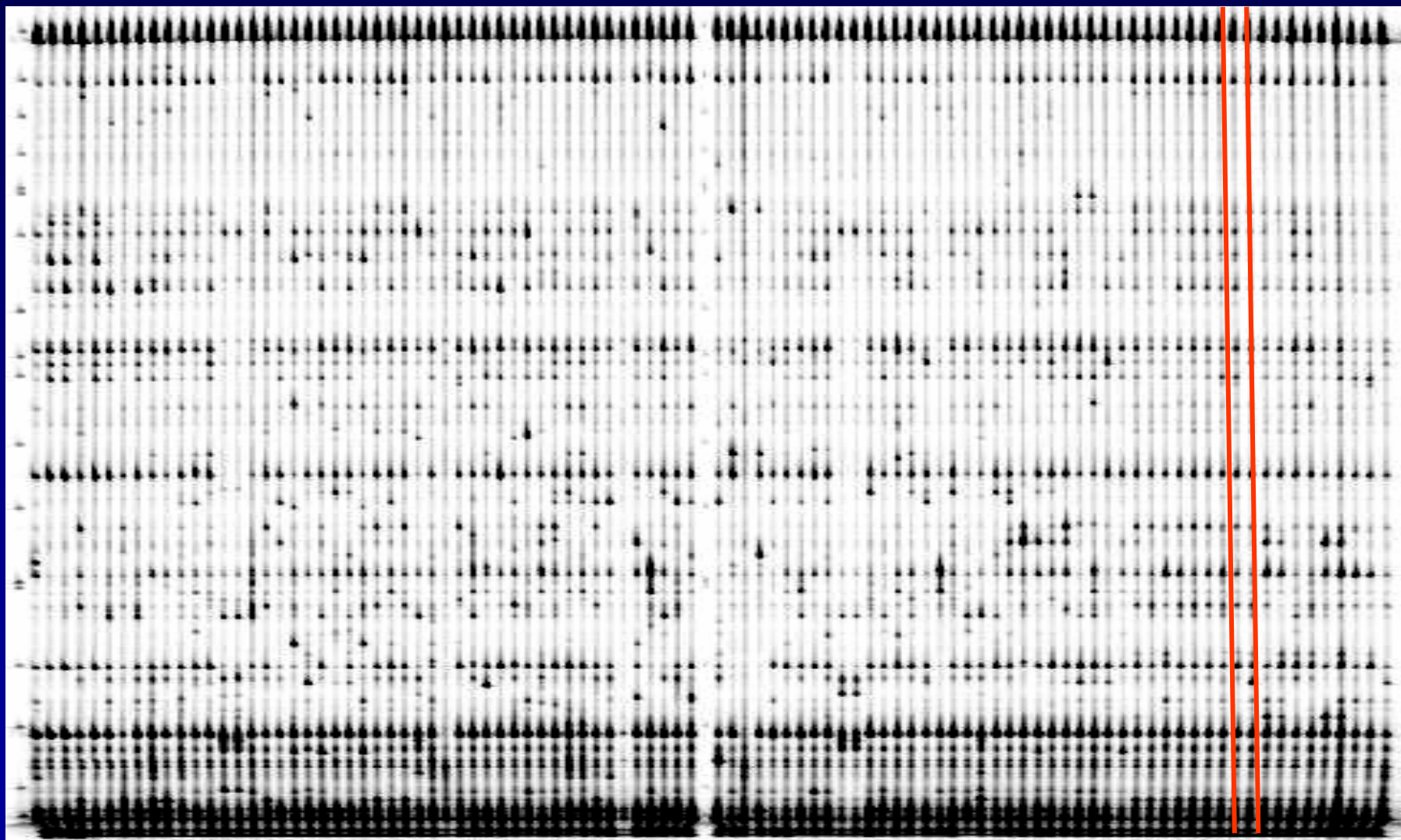
EcoTILLING: выявление аллельных вариантов генов *Rx1* у 96 образцов 42 видов картофеля

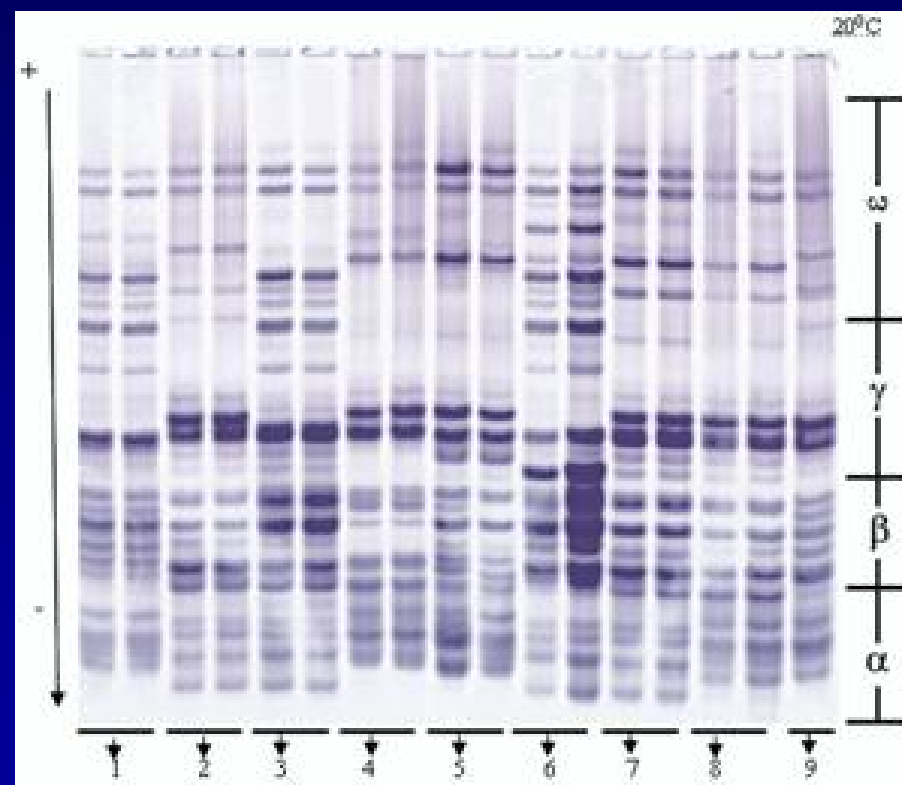
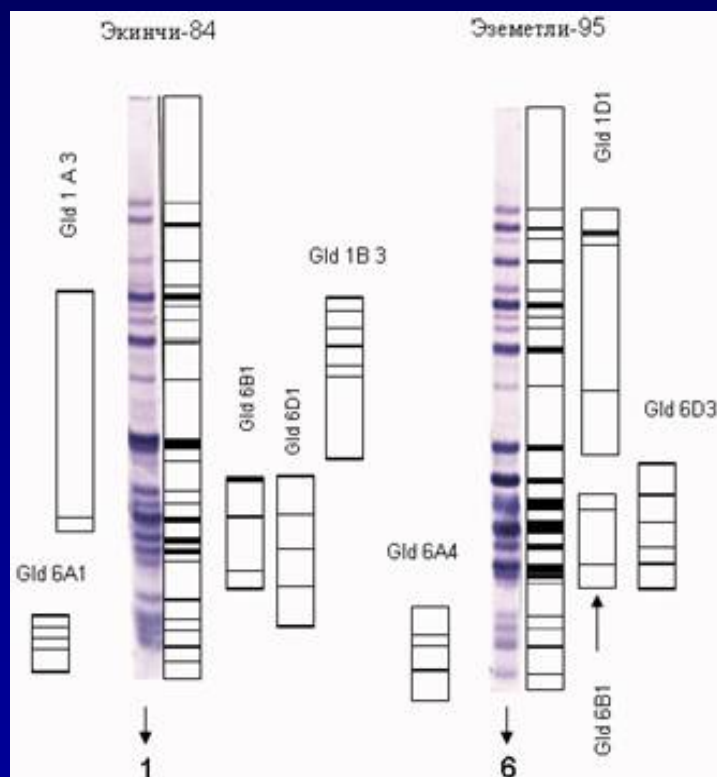
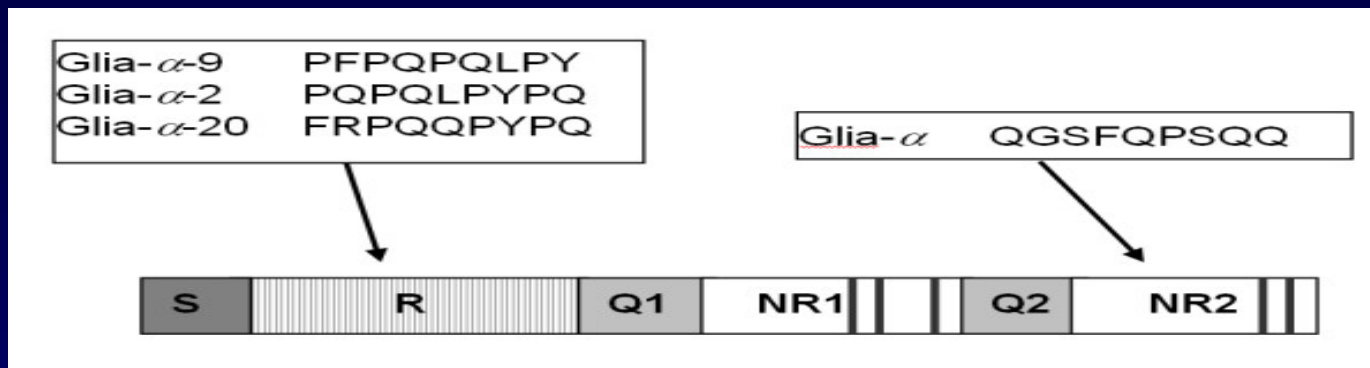
Образцы дикорастущих видов *Solanum*
альтернативные по признаку устойчивости

сорта *S.tuberosum*



EcoTILLING: молекулярная паспортизация образцов и сортов картофеля





Электрофореграммы глидинокодирующих локусов мягкой пшеницы
 1 - Экинчи-84, 2 - Гобустан, 3 - Нурлу-99, 4 - Гырмызыгул, 5 - Безостая
 Эзметли- 95, 7- Анза, 8 - Рузи- 84, 9 - Саратовская-29