

УДК 575.174.015.3:582.951.4

А. Н. ПУНДИК<sup>1</sup>, Т. А. ГАПЕЕВА<sup>1</sup>, Т. Г. ТРЕТЬЯКОВА<sup>1</sup>, Т. В. СЕМАНЮК<sup>2</sup>,  
Г. А. ЯКОВЛЕВА<sup>2</sup>, И. Д. ВОЛОТОВСКИЙ<sup>1</sup>

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ  
*SOLANUM TUBEROSUM* И ДИКИХ ВИДОВ *SOLANUM* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
SCAR-МАРКЕРОВ, РАЗРАБОТАННЫХ НА ОСНОВЕ ISSR-ПЦР-АНАЛИЗА**

<sup>1</sup>Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, e-mail: gapееva@ipb.org.by

<sup>2</sup>Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству,  
пос. Самохваловичи

(Поступила в редакцию 19.09.2013)

**Введение.** Задача повышения продуктивности картофеля требует проведения постоянной селекционной работы по созданию новых сортов, обладающих повышенной устойчивостью к биотическому и абиотическому стрессу. Одним из перспективных способов увеличения результативности селекции считается использование межвидовой гибридизации для введения в геном культурного картофеля генов диких видов *Solanum*, ответственных за устойчивость к болезням, вредителям, а также неблагоприятным факторам окружающей среды. Однако непосредственное скрещивание генетически отдаленных видов редко удается вследствие физиологической и генетической несовместимости партнеров. Значительно более эффективным способом скрещивания генетически отдаленных видов считается соматическая гибридизация [1–3]. Например, метод соматической гибридизации был использован для интрогрессии в культурный картофель признаков устойчивости к нематоду *Meloidogyne chitwoodi* и фитофторозу от мексиканского вида *S. bulbocastanum* [4–6], вирусам (ВСЛК, Y), мягкой гнили клубня, вызываемой бактериями рода *Erwinia* от не клубненосного вида *S. brevidens* [7–10].

При получении соматических гибридов картофеля необходимо решать задачу отбора гибридных форм. Наиболее простым и эффективным способом решения данной задачи является разработка ПЦР-маркеров для сравнительной идентификации образцов культурного и диких видов картофеля. В частности, при исследовании соматических гибридов дигиплоидного культурного картофеля *Solanum tuberosum* L. (BF15) с диким видом *Solanum vernei* (V3) был применен ISSR (*Inter simple sequence repeat*)–ПЦР-анализ [11]. ISSR-праймеры являются заякоренными тандемно повторяющимися последовательностями и выявляют полиморфизм длины участков ДНК между микросателлитными повторами (SSR – *simple sequence repeats*). Данные универсальные мультилокусные маркеры так же, как и RAPD-праймеры, могут быть использованы для разработки уникальных монолокусных SCAR-маркеров (*sequence characterized amplification region*), позволяющих решать конкретные задачи по выявлению полиморфизма ДНК [12–14].

Целью данной работы была разработка на основе ISSR–ПЦР-анализа SCAR-маркеров для сравнительной идентификации генетических детерминант *Solanum tuberosum* и диких видов *Solanum* в геноме соматических гибридов.

**Материалы и методы исследования.** В работе были использованы образцы соматических гибридов картофеля, полученные в лаборатории биотехнологии РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству». Соматические гибриды были получены методом слияния протопластов культурного картофеля *S. tuberosum* (4x, 78563-76) или межвидового гибрида [*S. tuberosum* × *S. chacoense*] (2x, 86-6) с не клубненосными формами рода

*Solanum*, такими как *S. etuberosum* (E55-1), гибридами [*S. brevidens* × *S. etuberosum*] (Л48-3) или [*S. etuberosum* × *S. brevidens*] (Л49-2), характеризующимися устойчивостью к вирусам. Комбинации слияния протопластов для получения соматических гибридов были следующими: 1) 48 (78563-76+Л48-3), 2) 2D (86-6+E55-1), 3) 4D (86-6 +Л49-2). Тетраплоидная форма культурного картофеля 78563-76 была передана в виде клубней из отдела селекции НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству, образец 86-6 – в виде клубней и настоящих семян от д. б. н. А. П. Ермишина (Институт генетики и цитологии НАН Беларуси). В работе были использованы также образцы *Solanum* не клубненосных видов: Л30-28 (*Solanum caripense*), E55-4, E56-3 (*S. etuberosum*), E25-10 (*Solanum palustre*), E61-4 (*Solanum fernandezianum*) Ч-3 (*S. chaporense*) и других диких видов: Л61-5 (*S. pinnatisectum*), К2-8 (*S. boliviense*), Л33-2 (*S. michoacanum*) из коллекции НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству. Данная коллекция диких видов и гибридов рода *Solanum* была создана с использованием ботанических семян из ВИР (Санкт-Петербург, Россия), Немецко-Голландского Центра генетических ресурсов (CGN), Центрального Института картофеля в Лиме (CIP) и введены в культуру *in vitro* с присвоением индивидуального номера для растения, регенерированного из одного семени.

Растения *in vitro* культивировали в лабораторных условиях при 20–22 °С в условиях 16-часового фотопериода (200 мкм·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>; лампы LF 35W/54-765, Philips, Польша) на среде Мурасиге-Скуга без никотиновой кислоты, мезоинозита, глицина и с содержанием 10 г на 1 л сахарозы в отличие от оригинальной среды MS [15].

Суммарную растительную ДНК выделяли с помощью набора реагентов «GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit» (Sigma-Aldrich).

ПЦР проводили с применением «LC Taq» полимеразы, (Thermo Scientific, Fermentas, Литва) в термоциклере «My Cycler» (Био-Рад, США).

Визуализацию ДНК осуществляли методом электрофореза в агарозном геле [16]. Нуклеиновые кислоты в геле окрашивали с помощью флуоресцентного красителя ZUBR Green I (ОДО «Прайм-тех»). Гели анализировали на приборе «ГельДок 2000» (Био-Рад). Размеры фрагментов ДНК определяли путем их сравнения с линейкой ДНК-маркеров (Thermo Scientific, Fermentas).

Фрагменты ДНК выделяли из агарозного геля с использованием набора «GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit» (Amersham). Для клонирования фрагментов ДНК в векторах использовали стандартные способы, согласно лабораторному руководству [16], с применением ферментов производства «Thermo Scientific, Fermentas». Трансформацию бактериальных клеток осуществляли с использованием хлористого рубидия [17]. Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса [18].

Фрагменты ДНК для определения нуклеотидных последовательностей клонировали в векторе pMOSBlue по сайту EcoRV. Отобранные на среде с селективным антибиотиком (ампициллином) колонии трансформированных клеток проверяли на наличие вставки при помощи ПЦР с праймерами T7 (5'–taatacgaactactataggg) и U19 (5'–ttttcccagtcacgacgt). Секвенирование клонированных фрагментов проводили методом терминации синтеза цепи по Сэнгеру [19] в термоциклической реакции с применением праймеров T7 и U19, а также набора реагентов «Big Dye Termination v.3.1 Sequencing Kit» (Applied Biosystems, США). Анализ продуктов термоциклической реакции осуществляли на приборе «ABI PRISM 310» (Applied Biosystems, США). Результаты обрабатывались с помощью программы ABI Prism Sequencing Analysis 3.7.

**Результаты и их обсуждение.** Соматические гибриды, анализируемые в данной работе, получены слиянием протопластов форм культурного картофеля (78563-76, 86-6) и не клубненосных форм (E55-1, Л49-2, Л48-3) [20]. Характерным и ценным для селекции картофеля признаком партнеров-не клубненосов является повышенная устойчивость к Y- и L- вирусам картофеля. При этом не клубненосный вид *S. etuberosum* является общим для всех родителей-партнеров, не способных к завязыванию клубней. В качестве праймеров для ISSR–ПЦР-анализа были использованы два ISSR-маркера – I-SSR1 [5'-(CA)<sub>10</sub>-G-3'] и I-SSR2 [5'-(GTG)<sub>7</sub>-C-3'], примененные ранее для анализа соматических гибридов картофеля [11]. При использовании праймера I-SSR1 не было обнаружено ПЦР-продуктов для исходных родительских форм, кроме 78563-76 (один ампликон размером около 1500 пн). При проведении ПЦР-анализа с праймером I-SSR2 был выявлен ам-

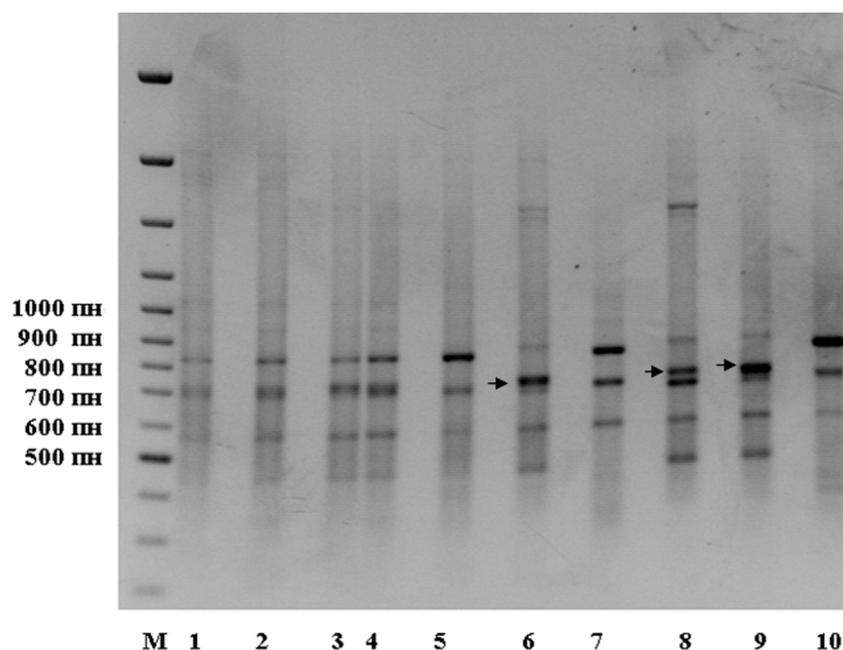


Рис. 1. Гель-электрофореграмма продуктов ПЦР с праймером I-SSR2. Цифрами обозначены номера дорожек: 1, 2 – соматические гибриды комбинации слияния 4D (5-2 и 4-2), 3, 4 – соматические гибриды комбинации слияния 2D (4-5 и 265-2), 5 – соматический гибрид комбинации слияния 48 (2-3), 6–10 – родительские формы 48-3, 86-6, E55-1, Л49-2, 78563-76 соответственно. М – маркеры размеров линейных фрагментов ДНК «Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus». Стрелкой обозначен ампликон, специфичный для не клубненосных видов

пликон размером около 750 пн, специфичный для не клубненосных родителей (рис. 1). Данный ампликон был обнаружен и для вышеуказанных соматических гибридов. Следует отметить, что ПЦР-фрагмент сходного размера наблюдался для дикого вида *Solanum vernei* (V3) в отличие от дигиплоидного культурного картофеля *Solanum tuberosum* L. (BF15) [11].

С целью подбора SCAR-праймеров, более четко выявляющих специфичные для не клубненосных видов ампликоны, было проведено определение нуклеотидных последовательностей клонированных ПЦР-продуктов размером 750 пн, образующихся в ПЦР с ISSR-2 праймерами на матрицах ДНК образцов E55-1, 48-3 и Л49-2 не клубненосных видов-партнеров. Сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей с использованием компьютерной программы BLASTn показал наличие гомологии (не менее, чем 80%) с 5-й хромосомой *Solanum demissum*, для которой ожидаемый размер ПЦР-продукта, получаемого с использованием праймера I-SSR2, также составляет около 750 пн.

**Последовательности олигонуклеотидов для подбора SCAR-праймеров, предназначенных для сравнительного анализа полиморфизма межмикросателлитного участка ДНК культурного и диких видов *Solanum***

Номер праймера	Наименование праймера*	Последовательность праймера, 5'-3'	Номер пары праймеров
1	SD5/19-1s	CGAGACTAGGTTCCACGAGC	1
2	SD5/19-1a	CGAACTAGCCTCACTCCGAC	
1	SD5/19-1s		2
3	SD5/19-2a	TCTCTAGACTTGGGGCAGGA	
4	SD5/19-3s	TTGGCCAAGTTTATTCTCTCG	3
2	SD5/19-1a		
5	SD5/19-9s	TCTACAGGTTGGAACAGGGC	4
2	SD5/19-1a		
4	SD5/19-3s		5
3	SD5/19-2a		
6	SD5/16-3s	AATCTCTAGACCTGGGGCGT	6
1	SD5/19-1s		

Номер праймера	Наименование праймера*	Последовательность праймера, 5'-3'	Номер пары праймеров
6	SD5/16-3s		7
7	SD5/16-4a	ATCCCTCGTAGCGTCAGAGA	
8	SD5/16-5s	GAGGTGCTGGTAAAGCCAAG	8
9	SD5/16-5a	CATGAGGGCAGCTACAGTGA	
8	SD5/16-5s		9
7	SD5/16-4a		
10	E-7/10s	GGCTGACCTAGTCGAAACCA	10
11	E-7/10a	TTGGCCAAGTTTATCCCTCA	
12	E-7/1s	CTCAGGCCTAGCCCTCTTCT	11
13	E-7/1a	GAGAAGGGCTCAATGTCCAA	
14	E-1/3s	GTAGGCCAACCCAGAAATGA	12
15	E-1/3a	ACCCATCTCAACCACCTCAG	
16	E-1/10s	CCCAACTGAAACACCTCGTT	13
17	E-1/10a	AGAAGGGCTCGATGTCAATG	

\*s, a – прямой и обратный праймер соответственно.

При помощи компьютерной программы Primer-BLAST были подобраны 13 пар олигонуклеотидных последовательностей для разработки SCAR-праймеров на основе нуклеотидных последовательностей 5-й хромосомы *Solanum demissum* и клонированных секвенированных последовательностей для образца E55-1 (таблица). Все пары праймеров были протестированы на матрицах ДНК растений не клубненосных форм Л48-3, Л49-2, E55-1, гибридных растений с не клубненосными партнерами, а также вида-партнера 78563-76. Программа для термоциклера была следующей: предварительная денатурация – 95 °С, 7 мин; денатурация – 94 °С, 45 с, отжиг – 50:60 °С, 45 с; элонгация – 72 °С, 45 с, 30 циклов; конечная элонгация – 72 °С, 7 мин. Скорость набора температуры составляла 1°С за 1 с. В результате было обнаружено, что пара праймеров E-1/10 (№ 13, таблица) может быть использована для выявления последовательности исследуемого ISSR-участка не клубненосного вида *S. etuberosum* в составе геномов соматических гибридов комбинаций слияния 48-3, 2D и 4 D (рис. 2, а), а пары праймеров № 5, 7, 8 (таблица) могут быть использованы для выявления соответствующего фрагмента ISSR-участка *S. tuberosum* (рис. 2, б). Остальные пары

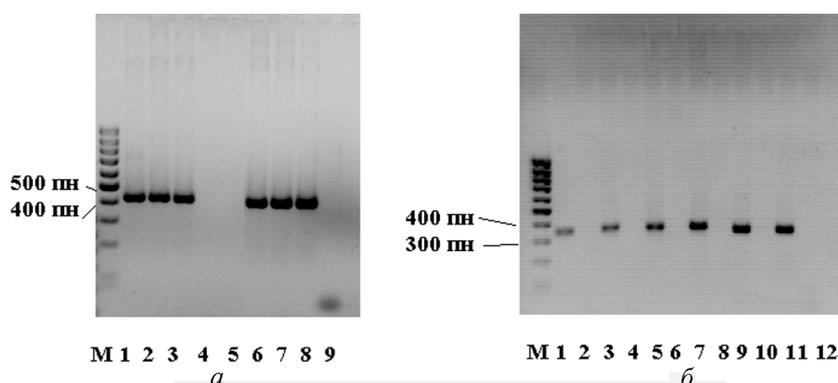


Рис. 2. Гель-электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами для сравнительной идентификации образцов *S. tuberosum* и не клубненосных форм рода *Solanum*. Цифрами обозначены номера дорожек; М – маркеры размеров линейных фрагментов ДНК («Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus»); а – результаты амплификации с праймерами E-1/10, подобранными для секвенированной ISSR-последовательности ДНК *S. etuberosum*: 1 – [*S. brevidens* x *S. etuberosum*] (Л48-3), 2 – [*S. tuberosum* x *S. brevidens*] (Л49-2), 3 – *S. etuberosum* (E55-1), 4 – *S. tuberosum* (78563-76, 4х), 5 – [*S. tuberosum*] x *S. chacoense*] (86-6, 2х), 6 – 48-3-2, комбинация 48 {*S. tuberosum* (78563-76, 4х) + [*S. brevidens* x *S. etuberosum*] (Л48-3)}, 7 – 4D-5-1, комбинация 4D {[*S. tuberosum* x *S. chacoense*] (86-6, 2х) + [*S. etuberosum* x *S. brevidens*] (Л49-2)}, 8 – 2D-4-5, комбинация 2D {[*S. tuberosum* x *S. chacoense*] (86-6, 2х) + *S. etuberosum* (E55-1)}, 9 – контроль без ДНК; б – результаты амплификации с праймерами, подобранными для аннотированной последовательности 5-й хромосомы *S. demissum* (1 – 4 – праймеры SD5/19-3S, SD5/19-2A; 5 – 8 – праймеры SD5/16-3S, SD5/16-4a; 9 – 12 – праймеры SD5/16-5S, SD5/16-5a): 1, 5, 9 – *S. tuberosum* (78563-76, 4х); 2, 6, 10 – [*S. brevidens* x *S. etuberosum*] (Л48-3), 3, 7, 11 – 48-3-2, комбинация 48 {*S. tuberosum* (78563-76, 4х) + [*S. brevidens* x *S. etuberosum*] (Л48-3)}, 4, 8, 12 – контроль без ДНК

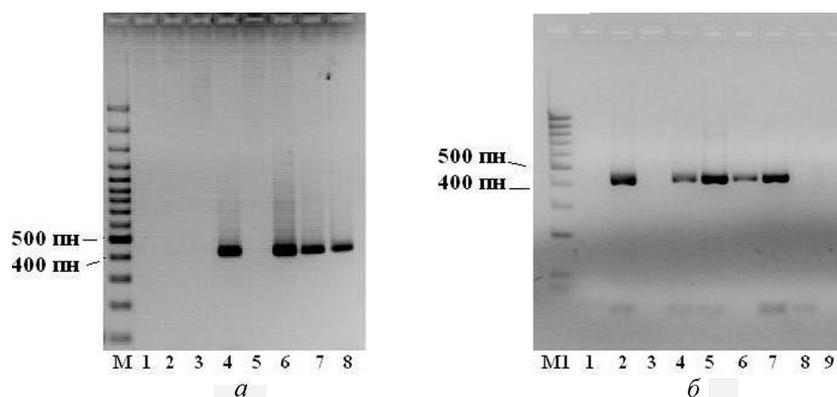


Рис. 3. Гель-электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами E-1/10 для сравнительной идентификации образцов *S. tuberosum* (а) и других диких видов *Solanum* (б). Цифрами обозначены номера дорожек; М и М1 – маркеры линейных фрагментов ДНК «Gene Ruler 100 bp DNA LadderPlus» и «Gene Ruler 100 bp DNA Ladder» соответственно; а – 1 – контроль без ДНК, 2 – *S. tuberosum* (78563-76, 4x), 3 – *S. caripense* (Л30-28), 4 – *S. palustre* (E25-10), 5 – *S. fernandezianum* (E61-4), 6 – [*S. brevidens* x *S. tuberosum*] (Л48-3), 7 – [*S. etuberosum* x *S. brevidens*] (Л49-2), 8 – *S. etuberosum* (E55-1); б – 1 – *S. chaporense* (Ч-3), 2 – *S. etuberosum* 3 (E56-3), 3 – *S. pinnatisectum* (Л61-5), 4 – *S. boliviense* (К2-8), 5 – *S. etuberosum* (E55-4), 6 – *S. michoacanum* (Л33-2), 7 – *S. etuberosum* (E55-1), 8 – [*S. tuberosum* x *S. chacoense*] (86-6, 2x), 9 – контроль без ДНК

праймеров (таблица) либо не различали образцы *S. tuberosum* и не клубненосных форм, либо не давали ПЦР-продуктов. В результате с использованием пары праймеров E-1/10 было показано наличие ампликона размером около 400 пн для всех проанализированных образцов соматических гибридов. С целью секвенирования было проведено клонирование полученных ПЦР-продуктов и определение их нуклеотидных последовательностей. Анализ полученных последовательностей с помощью компьютерной программы BLASTn показал, что участок от 162 до 412 пн исследуемой ISSR-последовательности соответствует фрагменту 5-й хромосомы *Solanum demissum*, а участок до 161 пн не имеет аналогов среди аннотированных последовательностей базы данных NCBI.

Пара праймеров E1/10 была также протестирована на образцах не клубненосных и других диких видов *Solanum*. ДНК-ПЦР-анализ растений не клубненосных видов *Solanum caripense*, *Solanum palustre*, *Solanum fernandezianum*, *S. chaporense*, а также диких видов *S. pinnatisectum*, *S. boliviense*, *S. michoacanum* показал, что пара праймеров E1/10 может быть использована для тестирования большинства вышеуказанных видов, кроме *Solanum caripense*, *S. fernandezianum* и *S. chaporense* (рис. 3), при этом размер ампликона составляет во всех случаях около 400 пн.

**Заключение.** С использованием ISSR-праймеров разработаны SCAR-маркеры для межмикросателлитной геномной последовательности диких видов *Solanum* и культурного картофеля *Solanum tuberosum*. Показано, что пара маркеров E1/10 позволяет выявить последовательность, характерную для генома не клубненосного вида *Solanum etuberosum*, в составе соматических гибридов с *Solanum tuberosum*, при этом область амплификации межмикросателлитного участка содержит уникальную последовательность, не имеющую гомологии с аннотированными последовательностями базы данных NCBI. Пара праймеров E1/10 также может быть использована при проведении сравнительной идентификации образцов культурного картофеля и таких диких видов, как *Solanum palustre*, *S. pinnatisectum*, *S. boliviense*, *S. michoacanum*.

## Литература

1. Глеба Ю. Ю., Зубко М. К. // Биотехнология. Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР. 1988. Т. 9. С. 3–72.
2. Rokka V. M. // Genome. 1998. Vol. 41, № 4. P. 487–494.
3. Johnson A. A. T. and Veilleux R. E. // Plant Breed. Rev. 2001. Vol. 2. P. 167–225.
4. Brown Ch. R., Mojtahedi H., Santo G. S. // Euphytica. 1995. Vol. 8. P. 71–78.
5. Helgeson J. P., Pohlman J. D., Austin D. et al. // Theor. Appl. Genet. 1998. Vol. 9. P. 738–742.
6. Austin S., Pohlman J. D., Brown C. R. et al. // Am. Potato J. 1993. Vol. 70. P. 485–495.
7. Austin A., Baer M. A., Helgeson J. P. // Plant Sci. 1985. Vol. 39, № 1. P. 75–82.

8. Rokka VM., Xu YS., Kankila J. et al. // Euphytica. 1994. Vol. 80. P. 207–217.
9. McGrath J. M., Williams C. E., Haberlach G. T. et al. // Amer. J. Potato Res. 2002. Vol. 79. P. 19–24.
10. Tek A. L., Stevenson W. R., Helgelson W. R. et al. // Theor. Appl. Genet. 2004. Vol. 109. P. 249–254.
11. Trabelsi S., Gargouri-Bouziid R., Vedel F. et al. // Tissue Org. Cult. Genet. 2005. Vol. 83. P. 1–11.
12. Qian Y. E., Ying-xiong Q. I. U., Yan-qil Q. U. O. et al. // J. Zhejiang Univ. 2005. Vol. 7. P. 868–872.
13. Albani M. C., Battey N. H., Wilkinson M. J. // Theor. Appl. Genet. 2004. Vol. 109. P. 571–579.
14. Hongyan Su, Wang Lei, Linde Liu et al. // J. Appl. Genet. 2008. Vol. 49. P. 233–235.
15. Murashige T., Skoog F. A. // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. P. 473–497.
16. Sambrook J. W., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory manual. N. Y: Cold Spring Harb. Lab. Press, 1989.
17. Дрейнер Дж., Скотт П. // Генная инженерия растений. Лабораторное руководство. М., 1991.
18. Харди К. Дж. Выделение бактериальных плазмид М., 1990. Гл. 1. С. 11–18.
19. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1977. Vol. 74. P. 5463–5467.
20. Яковлева Г. А. // Докл. НАН Беларуси. 2006. Т. 50, №6, С. 76–80.

A. N. PUNDIK, T. A. GAPEEVA, T. G. TRETYAKOVA, T. V. SEMANYUK,  
G. A. YAKOVLEVA, I. D. VOLOTOVSKI

**COMPARATIVE IDENTIFICATION OF GENETIC DETERMINANTS OF *SOLATIUM TUBEROSUM*  
AND WILD SPECIES OF *SOLATIUM* BY USING THE ISSR-DERIVED SCAR MARKERS**

**Summary**

ISSR primers were used to develop SCAR markers for genome region between microsatellite loci of wild species of *Solarium* and potato *Solarium tuberosum*. These markers were shown to be applied for comparative identification of genetic determinants of potato *Solarium tuberosum* and such wild species as *Solarium etuberosum*, *Solarium palustre*, *S. pinnatisectum*, *S. boliviense*, *S. michoacanum*.