

## ВВЕДЕНИЕ

Принцип маркирования широко используется в генетике и селекции растений. У растений понятие «маркер» является собирательным. В самом широком смысле его используют для обозначения признака, отвечающего трем главным критериям: наличие полиморфизма у представителей одного вида, независимость от условий выращивания и стабильное наследование в ряду поколений. У культурных растений в качестве маркеров используют как морфологические (например, различные варианты окраски частей растения, ветвления и т.п.), так и молекулярные (полиморфные варианты запасных белков семян и изоферментов, а также фрагментов ДНК) признаки. В отличие от морфологических признаков, проявление которых часто зависит от факторов среды, а уровень изменчивости (например, в группе родственных сортов) невысок, молекулярные маркеры не зависят от условий выращивания и характеризуются сравнительно более значительным полиморфизмом. Так, высокополиморфны многие запасные белки семян, что позволяет эффективно использовать их для решения широкого круга теоретических и практических задач при работе с коллекциями генетических ресурсов растений и в селекционном процессе (Конарев В. Г., 2000; Конарев А. В., 2006). Благодаря использованию молекулярных маркеров удалось достичь значительного прогресса в изучении культурных растений и их диких родичей. Молекулярные маркеры нашли широкое применение в работах по генотипированию, геномному картированию, локализации генов, контролирующих важные биологические и хозяйственно ценные признаки, структурированию генетического разнообразия, оценке внутривидовых и межвидовых взаимосвязей. Особую значимость в селекционно-генетических исследованиях приобрели молекулярные ДНК маркеры, помогающие отбирать генотипы, несущие ценные аллели генов или их сочетания. Такой подход получил название маркер-опосредованной селекции (*Marker Assisted Selection – MAS*). Он дает возможность ускоренного отбора ценных генотипов из генотипически разнородного селекционного материала (например, в расщепляющейся гибридной популяции). Однако молекулярные маркеры пока еще недостаточно полно используются для массовой оценки коллекций генетических ресурсов культурных растений и их диких родичей.

В настоящем практическом руководстве, ориентированном, прежде всего, на исследователя, делающего первые шаги в области молекулярной генетики, описаны основные этапы скрининга генетических ресурсов растений с использованием молекулярных маркеров, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Приводятся используемые в отделе генетики ВИР методики выделения ДНК растений, постановки ПЦР и анализа ее результатов с помощью электрофореза в агарозном геле.

Возможности молекулярного скрининга продемонстрированы на примере идентификации в коллекции подсолнечника носителей стерильного типа цитоплазмы, гена восстановления фертильности пыльцы форм с ЦМС РЕТ1, оценки генетической чистоты родительских линий гибридов подсолнечника и определения уровня гибридности партий семян, идентификации коллекционных образцов ячменя, несущих ген *mlol1*, определяющий устойчивость к возбудителю мучнистой росы.

## ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О МОЛЕКУЛЯРНОМ СКРИНИНГЕ

**Скрининг** генетических ресурсов – обследование выборки (группы) образцов коллекции с помощью специального метода (физиологического, иммунологического, биохимического и т.п.) с целью выявления в ней форм (генотипов), характеризующихся ценными биологическими признаками и свойствами (устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам, повышенное содержание питательных веществ и т.п.). Особенностью сохраняемых в ВИРе коллекций генетических ресурсов культурных растений и их диких родичей является высокое генетическое разнообразие образцов по признакам, представляющим интерес для селекции. Скрининг позволяет оценить генетическое разнообразие коллекции и выделить в ней образцы (группы генотипов), характеризующиеся близкими или идентичными характеристиками (фенотипами). Выделившиеся образцы рассматриваются как носители (источники) генов перспективных для селекции признаков. Затем проводят генетический анализ: оценивают наследование признаков при скрещиваниях и делают заключения о характере его генетического контроля (числе генов, их аллельном состоянии и т.д.). Такой подход дает возможность не только оптимизировать состав коллекций, но и разрабатывать стратегии использования потенциала генетического разнообразия в селекционном процессе.

При **молекулярном скрининге**, основанном на использовании ДНК-технологий, индикатором гена служит **молекулярный маркер** – фрагмент самого гена (если ген секвенирован и его разные аллели различаются по нуклеотидной последовательности) либо сцеплено с ним наследуемый фрагмент ДНК. Разработка маркера, перспективного для молекулярного скрининга, требует специального комплексного исследования, включающего выявление полиморфизма ДНК у форм с контрастным проявлением признака (или носителей разных аллелей) и последующий гибридологический анализ с идентификацией фрагмента, локализованного вблизи искомого гена. Молекулярный маркер, сцепленный с геном, представляющим интерес для селекции, должен удовлетворять двум требованиям: находиться на минимальном расстоянии от локуса этого гена (что исключает вероятность потери маркера в результате рекомбинации в

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение .....	5
Общие сведения о молекулярном скрининге .....	6
Общие сведения о ПЦР .....	10
Подготовка растительного материала .....	12
Выделение ДНК .....	13
Определение концентрации и оценка качества полученных фракций ДНК .....	21
Подготовка реакционной смеси и постановка ПЦР .....	22
Оценка результатов ПЦР методом электрофореза .....	25
Примеры молекулярного скрининга .....	29
Приложение .....	39
Список литературы .....	43