

SSR-АНАЛИЗ СОВРЕМЕННЫХ РОССИЙСКИХ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДНК НОМЕНКЛАТУРНЫХ СТАНДАРТОВ

Антонова О.Ю., Клименко Н.С., Рыбаков Д.А.,
Фомина Н.А., Желтова В.В., Новикова Л.Ю.,
Гавриленко Т.А.*

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт
генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР),
190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44;
*✉ tatjana9972@yandex.ru

Во Всероссийском институте генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР) получают развитие новые подходы к документированию отечественных сортов с учетом рекомендаций Международного кодекса номенклатуры культурных растений параллельно с методами генетической паспортизации. Номенклатурный стандарт определенного сорта, представленный гербарным образцом, может служить эталоном, обеспечивая возможность проверки подлинности и однородности образцов сорта, полученных из различных источников. Для проведения такой проверки необходимы быстрые и надежные методы генотипирования образцов. В данной статье представлены протоколы модифицированных методов выделения ДНК, постановки ПЦП и проведения SSR-анализа, которые позволяют проводить генотипирование сортов картофеля без применения дорогостоящих наборов реагентов. С использованием набора из десяти хромосомспецифичных монокусных микросателлитных маркеров изучен полиморфизм 66 современных российских сортов картофеля, представленных номенклатурными стандартами, а также 11 предсортов и селекционных клонов, представленных ваучерными образцами. В этой выборке из 77 образцов выявлен высокий уровень полиморфизма в десяти изученных микросателлитных локусах. По данным SSR-анализа было идентифицировано 73 аллеля, в среднем наблюдалось по 7,3 аллеля на locus, число которых варьировало от трех (locus STG0025) до 11 (locus StI046). Значения PIC варьировали от 0,544 (locus STG0025) до 0,836 (locus StI046). Уникальные для этой выборки аллели были обнаружены в шести изученных локусах. Высокий уровень полиморфизма в SSR-локусах позволил однозначно идентифицировать практически каждый сорт выборки за исключением ожидаемого совпадения микросателлитных профилей двух сортов, являющихся соматональными вариантами. С использованием оптимизированного набора из восьми микросателлитных маркеров изучены генетические взаимосвязи современных российских сортов картофеля.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, номенклатурные стандарты, Гербарий ВИР, WIR, ДНК-маркеры, SSR-генотипирование, полиморфизм, генетический паспорт

Прозрачность финансовой деятельности/Financial transparency

Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. / The authors have no financial interest in the presented materials or methods.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация/Additional information

Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2020-4-o2>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer

Все авторы одобрили рукопись / All authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

SSR ANALYSIS OF MODERN RUSSIAN POTATO VARIETIES USING DNA SAMPLES OF NOMENCLATRURAL STANDARDS

Antonova O.Yu., Klimenko N.S., Rybakov D.A.,
Fomina N.A., Zheltova V.V., Novikova L.Yu.,
Gavrilenko T.A.*

N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR),
42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St.Petersburg 190000, Russia;
*✉ tatjana9972@yandex.ru

The N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR) is developing new approaches to documentation of national cultivars, taking into account recommendations of the International Code of Nomenclature for Cultivated Plants in parallel with methods of genetic certification. The nomenclatural standard of a particular cultivar represented by a herbarium specimen can be used as a reference for verifying authenticity and uniformity of cultivar specimens obtained from various sources. The verification requires fast and reliable methods for cultivar genotyping. This paper presents protocols for modified methods of DNA extraction, PCR-analysis and SSR-genotyping, which allow potato cultivars identification without the use of expensive reagent kits. A set of ten chromosome-specific microsatellite markers was used to study polymorphisms in 66 modern Russian potato cultivars, as well as in 11 pre-cultivars and breeding clones, represented by nomenclatural standards and voucher specimens, respectively. This subset of 77 specimens has demonstrated a high level of polymorphism in ten studied microsatellite loci. The SSR analysis identified 73 alleles; 7.3 alleles per locus were observed on average, the number of which varied from 3 (STG0025 locus) to 11 (locus StI046). The PIC values varied from 0.544 (STG0025 locus) to 0.836 (StI046 locus). The alleles, unique for this subset, were found at six studied loci. The high level of polymorphism at the SSR loci made it possible to unambiguously identify almost every cultivar, with the exception of the expected coincidence of microsatellite profiles of two cultivars, which are somaclonal variants. Using an optimized set of eight microsatellite markers, the genetic relationships of modern Russian potato cultivars were studied.

Key words: *Solanum tuberosum*, nomenclatural standards, VIR herbarium, WIR, DNA markers, SSR genotyping, polymorphism, genetic passport

Для цитирования: Антонова О.Ю., Клименко Н.С., Рыбаков Д.А., Фомина Н.А., Желтова В.В., Новикова Л.Ю., Гавриленко Т.А. SSR-анализ современных Российских сортов картофеля с использованием ДНК номенклатурных стандартов. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(4):77-96. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-4-o2

For citation: Antonova O.Yu., Klimenko N.S., Rybakov D.A., Fomina N.A., Zheltova V.V., Novikova L.Yu., Gavrilenko T.A. SSR analysis of modern Russian potato varieties using DNA samples of nomenclatural standards. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(4):77-96. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-4-o2

Antonova O.Yu. <https://orcid.org/0000-0001-8334-8069>

Klimenko N.S. <https://orcid.org/0000-0002-5432-6466>

Rybakov D.A. <https://orcid.org/0000-0003-1520-0219>

Fomina N.A. <https://orcid.org/0000-0002-4401-4995>

Zheltova V.V. <https://orcid.org/0000-0002-2805-7450>

Novikova L.Yu. <https://orcid.org/0000-0003-4051-3671>

Gavrilenko T.A. <https://orcid.org/0000-0002-2605-6569>

УДК 635.21:631.523+631.526.32

Поступила в редакцию: 16.11.2020

Принята к публикации: 24.12.2020

Список использованных в работе сокращений

SSR – Simple-sequence repeats – microsatellite markers – микросателлитные маркеры, SSR-маркеры;
PGI – Potato genetic identity kit – набор микросателлитных маркеров для генотипирования образцов картофеля, разработанный М. Гислейном с соавторами (Ghislain et al., 2009);
WIR – Международный акроним Гербария культурных растений мира, их диких родичей и сорных растений (Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург);
WNJ – Weighted Neighbor Joining;
ВИР (VIR) – ФГБНУ «ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова»;
ВНИИКСХ – Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха» (в настоящее время – Федеральный исследовательский центр картофеля им. А.Г. Лорха);
КПНИ_ЭГИ – эколого-географические испытания (ЭГИ) по комплексному плану научных исследований (КПНИ) подпрограммы «Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации»;
Ленинградский НИИСХ «Белогорка» – Ленинградский научно-исследовательский институт сельского хозяйства «Белогорка» (в настоящее время – Ленинградский НИИ сельского хозяйства «Белогорка» – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр картофеля им. А.Г. Лорха»);
СибНИИРС – Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции;
СИБНИИСХиТ СО РАСХН – Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства и торфа Российской академии сельскохозяйственных наук;
СФНЦА РАН – ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробιοтехнологий РАН»;
ТатНИИСХ-ФИЦ КазНЦ – Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное структурное подразделение ФГБУН «ФИЦ Казанский научный центр РАН»;
ФИЦ ИЦИГ СО РАН – Федеральный исследовательский центр институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук.

Введение

В Международном кодексе номенклатуры культурных растений (МКНКР) (International Code of Nomenclature for Cultivated Plants) (Brickell et al., 2016) даны рекомендации по созданию номенклатурных стандартов для повышения надежности документирования сортов. Номенклатурный стандарт, представленный гербарным образцом, может служить эталоном, обеспечивая возможность верификации образцов данного сорта, полученных из различных источников, проверки их подлинности и одно-

родности. Для проведения такой проверки необходимы быстрые и надежные методы генотипирования образцов. Несмотря на активное развитие новейших технологий полногеномного секвенирования, в практическом плане наиболее приемлемым инструментом остаются микросателлитные (SSR) маркеры, характеризующиеся высокой разрешающей способностью, хорошей воспроизводимостью результатов и относительно небольшой стоимостью анализа. Кроме того, SSR-анализ можно автоматизировать, а полученные профили воспроизводятся и поддаются сравнению даже при использовании разного оборудования (электрофорез в геле или капиллярный электрофорез).

Работы по разработке микросателлитных маркеров картофеля ведутся начиная с 90-х годов XX века (Veilleux et al, 1995; Kawchuk et al, 1996; Provan et al, 1996). За это время были созданы различные серии SSR-праймеров: STM (Milbourne et al., 1998), Stwax (Veilleux et al., 1995), StI (Feingold et al., 2005), st_ (Tang et al., 2008) и другие. Многие из SSR-локусов картированы на хромосомах генома картофеля. На основе обобщения информации о SSR-праймерах, разработанных разными авторами, М. Гислейн с соавторами (Ghislain et al., 2004, 2006, 2009) предложили несколько вариантов наборов ядерных монолокусных SSR-маркеров, позволяющих однозначно идентифицировать сорта и образцы культурных видов картофеля. А. Рейд с коллегами (Reid et al., 2011) использовали другой набор из девяти пар SSR-праймеров, при помощи которого им удалось добиться индивидуальной идентификации практически каждого сорта (99,5%) в изученной выборке из 892 европейских селекционных сортов картофеля.

Особую популярность приобрел набор PGI – Potato genetic identity kit (Ghislain et al., 2009), который содержит 24 пары праймеров, специфичных к последовательностям однокопийных SSR-локусов, при этом на каждой хромосоме генома картофеля картировано по два локуса. Различное число SSR-маркеров из набора PGI активно используется в генбанках, исследовательских и селекционных центрах для генотипирования и изучения разнообразия аборигенных южно-американских сортов (Ghislain et al., 2004, 2006, 2009; Spooner et al., 2007; Gavrilenko et al., 2010), местных и селекционных сортов (Spooner et al., 2005; Favoretto et al., 2011; Kandratiuk et al., 2012; Shvachko, 2012; Yessimseitova et al., 2015; Antonova et al., 2016; Ghebresslassie et al., 2016; Bali et al., 2017; Kolobova et al., 2017; Prysiazhniuk et al., 2018; Tiwari et al., 2018). В цитированных выше работах было показано, что однозначная идентификация сортов картофеля может быть осуществлена с применением меньшего, чем 24, числа SSR-маркеров из набора PGI.

Параллельно с развитием методов ДНК-генотипирования сортового генофонда, в ВИРе разрабатывают подходы к его документированию с учетом рекомендаций МКНКР (Brickell et al., 2016). С 2018 года в сотрудничестве с различными селекционными центрами стра-

ны создается коллекция номенклатурных стандартов сортов картофеля, которая сохраняется в Гербарии культурных растений мира, их диких родичей и сорных растений (Гербарий ВИР [WIR]) (Gavrilenko, Chukhina, 2020). Номенклатурные стандарты оформляют в виде гербарных образцов в соответствии с положениями МКНКР и с учетом разработанного в ВИР протокола (опубликован в статье Gavrilenko, Chukhina, 2020). Всего в гербарную коллекцию ВИР с целью оформления номенклатурных стандартов и гербарных ваучеров было передано более 130 образцов картофеля (включая дублетные образцы) – сортов, предсортов и селекционных клонов. Из всех переданных образцов была выделена ДНК для проведения SSR-генотипирования.

Большая часть образцов поступила в Гербарий ВИР из различных селекционных центров в рамках Комплексного плана научных исследований (КПНИ) подпрограммы «Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации». Следует отметить, что только 84 образца (77 сортов, четыре предсорта и три селекционных клона) были получены вместе с сопроводительными документами непосредственно от авторов или представителей институтов, где эти сорта создавались. С использованием такого авторского материала было оформлено 66 номенклатурных стандартов сортов и ряд ваучерных образцов, для которых были разработаны генетические паспорта (Klimenko et al., 2020; Fomina et al., 2020 (a); Rybakov et al., в этом выпуске; Fomina et al. (b), в этом выпуске).

Для оставшихся образцов из разных выборок КПНИ_ЭГИ, в передаче которых авторы, патентообладатели или представители институтов, где эти сорта создавались, участия не принимали, в ВИР проводят SSR-генотипирование (Fomina et al. (b), в этом выпуске) и оформляют гербарные ваучеры, документирующие материал эколого-географических испытаний, но в разработке генетических паспортов такие образцы не участвуют. Также следует отметить, что в отдельных случаях среди образцов КПНИ_ЭГИ были выявлены варианты засорения (см. статьи этого и предыдущего выпусков журнала), поэтому в изучении полиморфизма и генетических взаимосвязей сортов были использованы только номенклатурные стандарты, а также зарегистрированные ваучерные образцы, созданные на основе авторского материала.

Цель данной работы – модификация методов выделения ДНК и SSR-анализа для решения задач генетической паспортизации сортов картофеля и изучения генетического разнообразия сортового генофонда. В настоящей работе представлены протоколы модифицированных методов выделения ДНК и проведения SSR-анализа, включая оптимизированный набор SSR-праймеров, которые были использованы для изучения полиморфизма микросател-

литных локусов современных российских сортов картофеля, представленных номенклатурными стандартами и ваучерными образцами.

Растительный материал

Материалом для выполнения данной работы послужили сорта и селекционные клоны картофеля, переданные в 2018-2019 годах в Гербарий ВИР с целью оформления номенклатурных стандартов и ваучерных образцов из четырех селекционных центров (Gavrilenko, Chukhina, 2020):

- Всероссийского научно-исследовательского института картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха (далее – ВНИИКХ);

- Ленинградского НИИ сельского хозяйства «Белогорка» (далее – Ленинградский НИИСХ «Белогорка»);

- Татарского НИИ сельского хозяйства «Казанский научный центр РАН» (ТатНИИСХ-ОСП ФИЦ КазНЦ);

- СибНИИРС – филиал ИЦиГ СО РАН (табл. 1).

Растительный материал передавали в гербарную коллекцию авторы сортов или представители организаций, где были созданы сорта, вместе с копиями официальных документов («Анкета сорта – Форма N 378», «Авторское свидетельство», «Описание селекционного достижения», «Патент»), а также с актами передачи материала в ВИР. Подробные описания созданных номенклатурных стандартов 66 российских сортов картофеля даны в серии статей выпусков № 3 и № 4 тома 3 журнала «Биотехнология и селекция растений» (Klimenko et al., 2020; Fomina et al. (a), 2020; Rybakov et al., в этом выпуске; Fomina et al. (b), в этом выпуске).

В исследование были включены семь ваучерных образцов четырех предсортов ('Калибр', 'Сальса', 'Сердолик', 'Эликсред') и трех селекционных клонов (1604/16, 'Алый парус', 'Жемчужина') (табл. 1), для оформления которых был использован растительный материал, полученный непосредственно от авторов (Klimenko et al., 2020; Fomina et al. (a), 2020; Rybakov et al., в этом выпуске).

В Гербарии ВИР также были зарегистрированы ваучерные образцы еще трех уральских сортов ('Аляска', 'Люкс', 'Терра') и сорта 'Танго' татарстанской селекции. Уже после регистрации гербарных ваучеров появилась возможность сопоставления ваучерных образцов с материалом, полученным от авторов этих сортов – результаты SSR-анализа одноименных образцов совпали (Fomina et al. (b), в этом выпуске).

Эти 77 образцов (66 номенклатурных стандартов и 11 гербарных ваучерных образцов – таблица 1) были использованы в настоящей работе для разработки методических протоколов, анализа полиморфизма микросателлитных локусов и изучения генетических взаимосвязей сортов.

Таблица 1. Материал, использованный в настоящей работе

Table 1. Material used in this work

Растительный материал поступил в Гербарий ВИР (*) / Plant material was transferred to VIR from the Institution (*)	Оформленные номенклатурные стандарты сортов (N – число сортов) / Nomenclatural standards (N- number of cultivars)	Ваучерные образцы / Voucher specimens	
		Сорта / Cultivars	Селекционные клоны и предсорта, проходящие госсортоиспытания / Breeding clones and prevarieties
из Ленинградского НИИСХ «Белогорка» в 2018 – 2019 годах (Klimenko et al., 2020)	N = 21 ‘Вдохновение’, ‘Весна белая’, ‘Гусар’, ‘Даная’, ‘Евразия’, ‘Лига’, ‘Ломоносовский’, ‘Майский цветок’, ‘Наяда’, ‘Невский’, ‘Очарование’, ‘Памяти Осиповой’, ‘Русская красавица’, ‘Сиверский’, ‘Сиреневый туман’, ‘Сказка’, ‘Снегирь’, ‘Сударыня’, ‘Холмогорский’, ‘Чародей’, ‘Чароит’	–	N = 5 1604/16, ‘Алый парус’, ‘Жемчужина’, ‘Калибр’, ‘Сердолик’
из ТатНИИСХ- ОСП ФИЦ КазНЦ в 2019 году (Fomina et al. (a), 2020)	N = 4 ‘Зумба’, ‘Кортни’, ‘Регги’, ‘Самба’	–	N = 1 ‘Сальса’
из СибНИИРС- филиал ФИЦ ИЦиГ СО РАН в 2018 году (Fomina et al. (b), в этом выпуске)	N = 4 ‘Златка’, ‘Лина’, ‘Сафо’, ‘Юна’	–	–
из ВНИИКС имени А.Г. Лорха в 2018 – 2019 годах (Rybakov et al., в этом выпуске)	N = 30 ‘Арлекин’, ‘Бабушка’, ‘Барин’, ‘Варяг’, ‘Василек’, ‘Великан’, ‘Вымпел’, ‘Голубизна’, ‘Гранд’, ‘Гулливвер’, ‘Дебют’, ‘Жигулевский’, ‘Ильинский’, ‘Колобок’, ‘Красавчик’, ‘Краса Мещеры’, ‘Крепыш’, ‘Купец’, ‘Матушка’, ‘Метеор’, ‘Нальчикский’, ‘Пламя’, ‘Призер’, ‘Русский сувенир’, ‘Северное сияние’, ‘Третьяковка’, ‘Утро’, ‘Фаворит’, ‘Фиолетовый’, Фрителла’	–	N = 1 ‘Эликсред’
из ВНИИКС имени А.Г. Лорха в 2018 и 2019 гг. (Fomina et al. (b), в этом выпуске)	N = 7 ‘Антонина’, ‘Любава’, ‘Накра’, ‘Памяти Рогачева’, ‘Саровский’, ‘Солнечный’, ‘Тулеевский’	N = 3 ‘Аляска’, ‘Люкс’, ‘Терра’	–
из ВНИИКС имени А.Г. Лорха в 2018 году (Fomina et al. (a), 2020)	–	N = 1 ‘Танго’	–
	N = 66	N = 4	N = 7

Примечание. *дана ссылка на статью с детальным описанием номенклатурных стандартов и ваучерных образцов / Reference is made to the publication with a detailed description of nomenclatural standards and vaucher specimens.

В генотипировании также участвовали образцы 11 сортов из разных выборок КПНИ_ЭГИ: ‘Браво’, ‘Ирбитский’, ‘Кемеровчанин’, ‘Кузнечанка’, ‘Танай’ (Fomina et al. (b), в этом выпуске), а также ‘Былина Сибири’, ‘Захар’, ‘Мариинский’, ‘Старт’, ‘Юбиляр’, ‘Янтарь’. Для этих образцов сопроводительные документы от авторов сортов или представителей организаций, где эти сорта создавались, в ВИР не поступали, поэтому полученные для них данные не были включены в итоговый анализ полиморфизма микросателлитных локусов и генетических взаимосвязей сортов.

Протокол выделения ДНК

Выделение ДНК проводили методом СТАВ-экстрак-

ции, модифицированным в отделе биотехнологии ВИР (Gavrilenko et al., 2013), с учетом дополнительных изменений, приведенных ниже. ДНК выделяли непосредственно из растительного материала, переданного в гербарную коллекцию ВИР для создания номенклатурных стандартов и ваучерных образцов. Поскольку образцы для гербаризации поступали в ВИР в виде побегов с соцветиями и затем в виде клубней, возникла необходимость оптимизации метода выделения ДНК для получения качественных ДНК-препаратов из различных органов растений картофеля, в том числе на поздних сроках вегетации растений. Кроме того, препарат ДНК номенклатурного стандарта должен служить эталоном в изучении подлинности и однородности образцов сорта, поэтому было исключено использование дорогостоящих фирменных наборов,

позволяющих получать ДНК только в микроколичествах.

Навеску растительной ткани растирали в жидком азоте, добавляли 2 × СТАВ-буфер [100 мМ трис-НСl, рН=8,0; 2 М NaCl; 20 мМ ЭДТА; 2% СТАВ (цетилтриметилбромид аммония, Sigma, #H6269); 1,5% β-меркаптоэтанол, 1% PVP (поливинилпирролидон, Sigma, #P5288)] и проводили экстракцию ДНК в течение полутора-двух часов при температуре 65°C. В данной модификации буфера, используемого для экстракции, предложен ряд изменений по сравнению с протоколом 2013 года (Gavrilenko et al., 2013), а именно повышена концентрация хлорида натрия до 2 М и концентрация β-меркаптоэтанола до 1,5%. Это позволило более эффективно избавляться от окисленных полифенолов и других соединений, накопленных в тканях активно вегетирующих полевых растений.

К лизату добавляли метабисульфит натрия до конечной концентрации 1,5% (концентрация Na₂S₂O₅ также была повышена по сравнению с исходным протоколом) и равный объем смеси хлороформ/изоамиловый спирт (в соотношении 24:1). Пробирки инвертировали при комнатной температуре (не ниже 25°C) в течение 45 минут (использовали ротатор Multi Bio RS-24 фирмы BioSan), затем центрифугировали при комнатной температуре (10000 об/мин, 25°C, 15 минут). Водную фазу отбирали в чистые пробирки, добавляли равный объем предварительно охлажденного изопропилового спирта, перемешивали и оставляли при -20°C в течение ночи. Выпавший осадок ДНК собирали центрифугированием (10000 об/мин, 4°C, 20 минут), промывали три раза по 30 минут в 80% этиловом спирте, высушивали при комнатной температуре и растворяли в буфере TE (10 мМ трис-НСl, рН 8,0; 1 мМ ЭДТА, рН=8,0). Объем раствора зависел от величины осадка, в среднем при выделении ДНК из 200-300 мг растительной ткани он составлял 500 мкл.

В некоторых случаях препараты ДНК сохраняли загрязненность фенолами, на что указывал желтый цвет полученного раствора. Дополнительную очистку проводили при помощи поливинилполипирролидона (PVPP, Sigma, #P6755). Для этого к раствору ДНК добавляли суспензию порошка PVPP в буфере TE, содержимое пробирок аккуратно перемешивали и пробирки инвертировали на ротаторе Multi Bio RS-24 в течение 2-3 часов при комнатной температуре и минимальной скорости 5-10 об/мин. При этом происходило связывание полифенолов с частицами PVPP. Затем пробирки центрифугировали (5000 об/мин, 25°C, 5 минут), отбирали водную фазу в чистую пробирку, а к осадку добавляли равный объем буфера TE, добиваясь равномерной суспензии, и пробирки инвертировали еще 5-10 минут. Осаждали PVPP путем центрифугирования, отбирали водную фазу в чистую пробирку. Обе водные фазы объединяли. Необходимо отметить, что перед проведением такой очистки осадок ДНК должен быть полностью растворен в буфере TE, иначе ДНК при центрифугировании осядет вместе с PVPP и будет потеряна.

В результате выполненных исследований ДНК была

выделена из растительного материала, послужившего для создания 66 номенклатурных стандартов и 11 гербарных ваучеров, а также из 60 образцов разных выборок КПНИ-ЭГИ (включая одноименные образцы). Для каждого сорта проводили как минимум два независимых выделения ДНК из разных частей растений, поступивших в Гербарий ВИР и взятых непосредственно перед гербаризацией материала (Gavrilenko, Chukhina, 2020) из развитых листьев побегов и из кожуры клубней; а также позднее из этиолированных ростков и/или из световых ростков, сформировавшихся на клубнях, оставшихся после гербаризации.

Качество выделенной ДНК контролировали при помощи нанофотометра Implen N60 (URL : <https://www.implen.de/nanophotometer>), а также электрофорезом в 0,8% агарозном геле. При этом спектральные характеристики полученных препаратов лежали в пределах нормы, значения отношения A260/A280 составляли 2,0-2,4, а отношения A260/A230 – от 1,8 до 2,0. Для всех препаратов ДНК были генерированы амплификационные продукты. Таким образом, предложенный нами протокол позволяет получать ДНК хорошего качества из разных частей растений на разных стадиях развития.

Отбор микросателлитных локусов для генетической паспортизации сортов картофеля - оптимизированный набор SSR-праймеров

Ранее для анализа полиморфизма у сортов картофеля отечественной селекции в отделе биотехнологии ВИР применяли различные SSR-маркеры, отобранные из набора PGI (Ghislain et al., 2009). Так, в работе Н.А. Швачко (Shvachko, 2012) выборка из 185 образцов отечественных и зарубежных сортов из коллекции ВИР была генотипирована при помощи 14 SSR-маркеров: STG0010; STG0016; STG0025; StI001; StI004; StI014; StI030; StI032; StI033; STM0037; STM1052; STM1104; STM5114; STM5127. Позднее в анализе выборки из 113 отечественных сортов применяли частично измененный набор маркеров: STG0016, STG0025, StI001, StI012, StI014, StI030, StI032, StI033, StI046, STM0037, STM1104, STM1106, STM5121, STM5127 (Antonova et al., 2016). С учетом частичного перекрытия всего было апробировано 17 различных маркеров из набора PGI, после чего было принято решение исключить семь из них из дальнейшей работы по разным причинам. Так, три локуса – STG0025, STM1104 и STM5121 по сравнению с другими оказались недостаточно полиморфными (значения PIC соответственно 0,544 и 0,597 и 0,602); в локусе StI030 различия размеров аллельных фрагментов не были кратны числу нуклеотидов повторяющегося мотива, что вызывало неоднозначную интерпретацию результатов; праймеры STG0010, STM1052 и STM5127 отличались нестабильной амплификацией.

В настоящей работе мы остановились на наборе из 10 пар праймеров, в число которых входили восемь из набора PGI – STG0016, StI001, StI004, StI014, StI032, StI033,

STM5114, STM0037 (Ghislain et al., 2009), а также маркеры StI046 (Feingold et al., 2005) и STM2005 (Milbourne et al., 1998). Маркер StI046 был отобран нами по результатам анализа выборки сортов отечественной селекции (Antonova et al., 2016). Этот локус отличался высоким уровнем полиморфизма и гетерозиготности, что подтвердилось и в настоящей работе для выборки образцов-номенклатурных стандартов сортов. Другой маркер, STM2005, оказался очень удобным в анализе – повторяющийся мотив микросателлитного участка состоял из 6 пн, что обеспечивало при электрофорезе большое расстояние на геле между ПЦР-продуктами и позволяло однозначно интерпретировать результаты. Первые генетические паспорта номенклатурных стандартов российских сортов картофеля были разработаны по результатам SSR-анализа с этими десятью маркерами (Klimenko et al., 2020).

Следует отметить, что в процессе работы по оформлению генетических паспортов мы отказались еще от двух маркеров – StI001 и StI014. При их амплификации образовывались слабые дополнительные полосы.

Итоговый рекомендуемый набор для молекулярно-генетической паспортизации сортов картофеля включал следующие восемь монолокусных хромосомспецифичных микросателлитных маркеров: STM2005 (Milbourne et al., 1998), StI046 (Feingold et al., 2005) и шесть маркеров из набора PGI (STG0016, StI004, StI032, StI033, STM5114, STM0037) (табл. 2). В дальнейшем генетические паспорта российских сортов оформляли с использованием этого набора (Fomina et al. (a), 2020; Rybakov et al., см. в этом же выпуске; Fomina et al. (b), см. в этом же выпуске).

Проведение ПЦР

В целях экономии затрат на флуоресцентное мечение праймеров использовали метод tail-ПЦР: флуоресцентную метку вводили в реакционную смесь вместе с прямым праймером M13 (5'-CACGACGTTGTAACGAC-3'), при этом каждый из прямых праймеров на 5'-конце содержал ту же последовательность длиной 19 пн. При работе на секвенаторе Li-Cor 4300S DNA Analyzer с лазерной детекцией фрагментов (URL : <https://www.licor.com>) праймер M13 нес на 5'-конце метку IRD700 или IRD800, однако при необходимости он может быть помечен и другими флуоресцентными красителями.

ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 14 мкл, содержащей 40 нг геномной ДНК, 1 × реакционный буфер (Диалат, Москва), 2,5 мМ MgCl₂, 0,5 мМ каждого из dNTPs, 0,20 мкМ прямого и обратного праймеров, 100 нМ прямого праймера M13, меченного флуоресцентным красителем IRD700 или IRD800, и 1 ед. Таq-полимеразы (Диалат, Москва).

Для повышения эффективности работ ПЦР проводили в 96-луночных планшетах, в каждую лунку которых предварительно вносили по 4 мкл раствора ДНК, разведенного водой (стандарта 18.2 МΩ-см) до концентрации 10 нг/мкл. При постановке ПЦР для одного планшета готовили

мастер-микс (в расчете на 96 лунок), содержащий все компоненты за исключением ДНК, в расчете числа реакций учитывали 8 дополнительных препаратов, то есть мастер-микс готовили для 104 лунок.

Состав мастер-микса:

	На одну реакцию:	на 104 реакции:
H ₂ O (18.2 МΩ-см)	5,6 мкл	581 мкл
10 × реакционный буфер	1,4 мкл	146 мкл
50 мМ MgCl ₂	0,7 мкл	73 мкл
10 мМ dNTPs	0,7 мкл	73 мкл
5 мкМ прямой праймер	0,56 мкл	58,5 мкл
5 мкМ обратный праймер	0,56 мкл	58,5 мкл
5 мкМ праймер M13	0,28 мкл	29 мкл
Таq-Полимераза (5U/μL)	0,2 мкл	21 мкл

После перемешивания на вортексе мастер-микс распределяли по 10 мкл в лунки планшета при помощи автоматической электронной пипетки Eppendorf Xplorer® для объемов пипетирования 5-100 мкл. Конечный объем составлял 14 мкл. Поверх водного раствора наносили две капли минерального масла. Все операции проводили на льду. Следует отметить, что при заклеивании планшетов термостойкими пленками ПЦР-смесь объемом 10-14 мкл в амплификаторе частично испаряется, поэтому необходимо или использовать масло, или проводить реакцию в объеме 20-25 мкл. Последнее существенно увеличивает расходы на анализ. Планшеты центрифугировали (центрифуга Eppendorf 5810R, ротор A-2-DWP), после чего помещали в амплификатор.

Для большей специфичности реакции все программы содержали функцию TOUCHDOWN. В тех случаях, когда у разработчиков праймеров эта функция не была предусмотрена, протоколы были модифицированы (STG0016, STM0037, STM2005, STM5114, в таблице 2 отмечены звездочкой). Для всех праймеров использовали единообразную программу: 94°C – 3 минуты 30 секунд; 8 циклов [94°C – 45 секунд, T_m+4°C – 1 минута 30 секунд с понижением на 0,5° на 1 цикл, 72°C – 1 минута]; 32 цикла [94°C – 45 секунд, T_m – 45 секунд, 72°C – 1 минута], и в заключение 72°C – 5 минут. Температуры отжига праймеров приведены в таблице 2.

В качестве положительных контролей использовали клоны образцов культурного вида картофеля *S. stenotomum* Juz. & Bukasov, генотипированные нами ранее (Gavrilenko et al., 2010) и имеющие изучаемые локусы в состоянии симплекса, а именно: k-3640 (локусы StI004, StI032, StI033, STM0037, STM5114), k-11023 (STG0016, StI032, StI033, STM5114), k-14892 (StI001, StI014) и k-17483 (STG0016, StI001, STM5114). Кроме того, для локусов STG0016, StI001, StI004, StI014, StI032, StI033, STM0037 и STM5114) в качестве контролей использовали ранее генотипированные образцы культурного тетраплоидного картофеля *S. tuberosum* ssp. *andigenum* (Juz. & Bukasov) Hawkes – k-1741, k-1746 и *S. tuberosum* L. – k-3446, k-7528).

Таблица 2. ДНК-маркеры SSR-локусов, использованные для генотипирования

Table 2. DNA markers of SSR loci used for genotyping

№ п/п	Название маркера у авторов праймеров / Name of the marker according to the authors who have developed primers	Название маркера в наборе PGI (Ghislain et al., 2009) / Name of the marker according to the PGI kit description (Ghislain et al., 2009)	Хромосома / chromosome	Повторяющийся мотив / Repeat	Последовательность праймеров (5'→3') (прямой и обратный праймеры) / Primer sequences (5'→3') (forward and reverse primers)	Использованная T_m (°C) * / T_m (°C) used in the experiment	Авторы-разработчики праймеров / Authors who have developed primers
1	STG0016	STG0016	I	(AGA) _n	F: AGCTGCTCAGCATCAAGAGA R: ACCACCTCAGGCACCTTCATC	64→60*	Ghislain et al., 2009
2	StI004	STI0004	VI	(AAG) _n	F: GCTGTAAACACTCAAGCAGAA R: CAACTACAAGATCCATCCACAG	59→55	Feingold et al., 2005
3	StI032	STI0032	V	(GGA) _n	F: TGGGAAGAATCCTGAAATGG R: TGCTCTACCAATTAACGGCA	64→60	Feingold et al., 2005
4	StI033	STI0033	VII	(AGG) _n	F: TGAGGGTTTTCAGAAAGGA R: CATCCTTGCAACAACCTCCT	64→60	Feingold et al., 2005
5	StI046	--	XI	(GAT) _n	F: CAGAGGATGCTGATGGACCT R: GGAGCAGTTGAGGGCTTCTT	56→52	Feingold et al., 2005
6	STM0037	STM0037	XI	(TC) _n (AC) _n AA.. (AC) _n (AT) _n	F: AATTAACTTAGAAGATTAGTCTC R: ATTTGGTTGGGTATGATA	52→48*	Milbourne et al., 1998
7	STM2005	--	XI	(CTGTTG) _n	F: TTTAAGTTCAGTTCGCAAGGG R: GTCATAACCTTTACCATTGCTGGG	64→60*	Milbourne et al., 1998
8	STM5114	STM5114	XI	(ACC) _n	F: AATGGCTCTCTGTATGCT R: GCTGTCCCAACTATCTTTGA	60→56*	SCRI (не опубликовано), ссылка по Ghislain et al., 2009
9	StI001	STI0001	IV	(AAT) _n	F: CAGCAAAAATCAGAAACCCGAT R: GGATCATCAAAATTCACCCGCT	59→55	Feingold et al., 2005
10	StI014	STI0014	IX	(TGG) _n (AGG) _n	F: AGAAAAGTGAAGTTGTTGGGA R: TSAACAGTCTCAGAAAACCCCTCT	59→55	Feingold et al., 2005

Примечание. * Функция TOUCHDOWN добавлена нами

Проведение электрофореза в полиакриламидном геле

ПЦР-продукты разделяли электрофорезом в 6,5% или 8% денатурирующем полиакриламидном геле на приборе Li-Cor 4300S. Использование геля с концентрацией 8% обеспечивало более надежное (по сравнению с фирменным 6,5% матриксом) разделение ПЦР-продуктов и однозначную интерпретацию результатов. В качестве стандартов молекулярного веса служили флуоресцентно меченые маркеры фирмы Li-Cor “50-350 bp”.

При необходимости использовать денатурирующий полиакриламидный гель, имеющий концентрацию 6,5%, применяли фирменный матрикс KB Plus 6,5%, Li-Cor #827-05669. В случае 8% геля, матрикс готовили самостоятельно на основе раствора Long Ranger™ GEP Solution фирмы Lonza (#50611), состав матрикса: 8% Long Ranger™, 7М мочевины, 1 × TBE, вода до необходимого объема (раствор необходимо дегазировать при помощи водоструйного насоса). Непосредственно перед заливкой геля к 20 мл матрикса добавляли 15 мкл TEMED и 150 мкл 10% раствора персульфата аммония, после заливки гель оставляли для полимеризации на 1,5-2 часа при комнатной температуре.

Перед нанесением продуктов ПЦР на гель к ним добавляли по 7 мкл денатурирующего буфера следующего состава: 95% формамид, 0,01 М ЭДТА, 0,1% бромфеноловый синий.

Система Li-Cor4300 имеет два различных канала, детектирующих красители IRG700 и IRD800, и позволяет проводить три прогона в одном проточном геле. Соответственно, на одном геле можно разделять ПЦР-продукты с использованием как минимум двух пар праймеров. Однако для ускорения проведения анализа мы готовили мультиплексные смеси ПЦР-продуктов с учетом размеров фрагментов в анализируемых локусах. Чаще всего использовали следующие сочетания маркеров:

1 прогон:

Канал IRD700: STM0037 (70-92 пн), STG0016 (117-153 пн), STM5114 (280-304 пн)

Канал IRD800: StI004 (64-103 пн), StI014 (117-129 пн), StI001 (176-191 пн)

2 прогон:

Канал IRD700: StI033 (113-137 пн), StI046 (179-218 пн).

Канал IRD800: StI032 (109-127 пн), STM2005 (148-190 пн)

Таким образом, все анализируемые маркеры можно было проанализировать за два прогона, то есть с использованием одного геля.

Непосредственно перед нанесением на гель пробы денатурировали в течение 5 минут при 95°C и быстро охлаждали во льду. Нанесение проводили при помощи многоканального шприца фирмы Hamilton.

Генотипирование, учет результатов и их статистическая обработка

Определение размеров ПЦР-продуктов на полученных изображениях гелей проводили при помощи пакета программ Saga2. Полученные размеры фрагментов у сортов сопоставляли с данными генотипирования образцов культурных видов картофеля (Supplementary material XLS 5903kb in Ghislain et al., 2009; Gavrilenko et al., 2010). Результаты генотипирования заносили в базу в формате Excel. Наличие фрагмента определенного размера регистрировали как «1», его отсутствие, соответственно, как «0».

Для оценки полиморфизма микросателлитных локусов использовали индекс PIC (polymorphic index content), значения которого были рассчитаны по формуле:

$$PIC = 1 - \sum p_i^2$$

где p_i – частота i -й аллели (Nei, 1973).

Для изучения генетических взаимосвязей выборки из 66 номенклатурных стандартов и 11 ваучерных образцов использовали кластерный анализ, который проводили с помощью метода Weighted Neighbor Joining (WNJ) в программе DARwin5 (версия 5.0.158, URL : <http://darwin.cirad.fr/darwin>), расстояния рассчитывали по Л.Р. Дайсу (Dice, 1945):

$$d_{ij} = \frac{b + c}{2a + b + c}$$

где d_{ij} – расстояние между объектами i и j ;

a – число аллелей, где у обоих объектов 1;

b – число аллелей, где у первого объекта 1, у второго 0;

c – число аллелей, где у первого объекта 0, у второго 1.

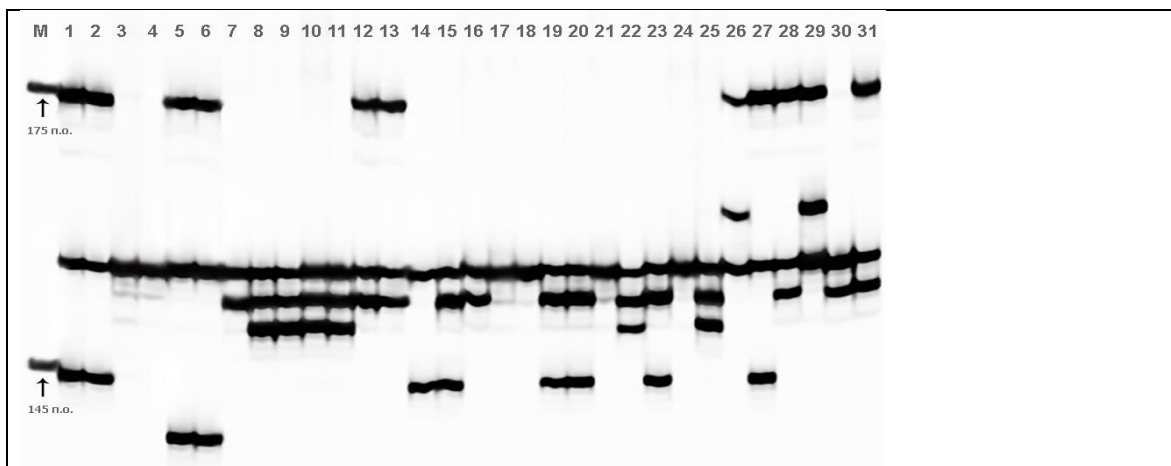


Рис. 1. Аллельный полиморфизм российских сортов картофеля по SSR-локусу STG0016
 1-2) 'Тулеевский'; 3-4) 'Майский цветок'; 5-6) 'Утро'; 7) 'Регги'; 8-9) 'Фиолетовый'; 10-11) 'Третьяковка'; 12-13) 'Фрителла'; 14) 'Колобок'; 15) 'Вымпел'; 16) 'Крепыш'; 17-18) 'Сафо'; 19-20) 'Юна'; 21) 'Накра'; 22) 'Северное сияние'; 23) 'Гранд'; 24) *S. stenotomum*, к-17483 (контроль); 25) 'Северное сияние'; 26) 'Сердолик'; 27) 'Гусар'; 28) 'Алый парус'; 29) 'Василек'; 30) 'Варяг'; 31) 'Голубизна'; М – маркер молекулярного веса. Наблюдаемый размер фрагментов на 19 пн больше реального за счет включенной в них последовательности прямого праймера M13.

Fig. 1. Allelic polymorphism of Russian potato cultivars at the nuclear SSR-locus STG0016
 1-2) 'Tuleevskij'; 3-4) 'Majskij cvetok'; 5-6) 'Utro'; 7) 'Reggi'; 8-9) 'Fioletovyj'; 10-11) 'Tret'jakovka'; 12-13) 'Fritella'; 14) 'Kolobok'; 15) 'Vympel'; 16) 'Krepyš'; 17-18) 'Safo'; 19-20) 'Ūna'; 21) 'Nakra'; 22) 'Severnoe siânie'; 23) 'Grand'; 24) *S. stenotomum*, k-17483 (the control); 25) 'Severnoe siânie'; 26) 'Serdolik'; 27) 'Gusar'; 28) 'Alyj parus'; 29) 'Vasilek'; 30) 'Varâg'; 31) 'Golubizna'; M – molecular weight marker. The observed fragment size is 19 bp bigger than the real one due to the included sequence of the forward primer M13.

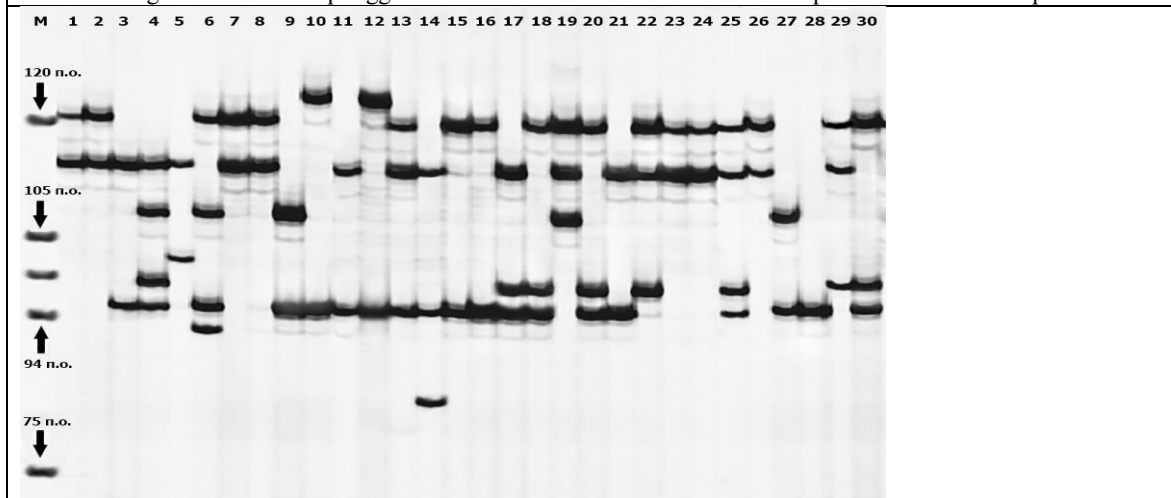


Рис. 2 Аллельный полиморфизм российских сортов картофеля по SSR-локусу StI004
 1) 'Зумба'; 2) 'Сальса'; 3) 'Варяг'; 4) 'Янтарь'; 5) 'Захар'; 6) 'Сердолик'; 7) 'Калибр'; 8) 'Вымпел'; 9) 'Накра'; 10) 'Фиолетовый'; 11) 'Метеор'; 12) 'Фиолетовый'; 13) 'Фрителла'; 14) 'Голубизна'; 15) 'Аляска'; 16) 'Танго'; 17) 'Великан'; 18) 'Кортни'; 19) 'Тулеевский'; 20) 'Самба'; 21) 'Браво'; 22) 'Красавчик'; 23-24) 'Ирбитский'; 25) 'Призер'; 26) 'Краса Мещеры'; 27) 'Накра'; 28) *S. stenotomum*, к-3640 (контроль); 29) 'Утро'; 30) 'Северное сияние'; М – маркер молекулярного веса. Наблюдаемый размер фрагментов на 19 пн больше реального за счет включенной в них последовательности прямого праймера M13.

Fig. 2 Allelic polymorphism of Russian potato cultivars at the nuclear SSR-locus StI004
 1) 'Zumba'; 2) 'Sal'sa'; 3) 'Varâg'; 4) 'Ântar'; 5) 'Zahar'; 6) 'Serdolik'; 7) 'Kalibr'; 8) 'Vympel'; 9) 'Nakra'; 10) 'Fioletovyj'; 11) 'Meteor'; 12) 'Fioletovyj'; 13) 'Fritella'; 14) 'Golubizna'; 15) 'Alâska'; 16) 'Tango'; 17) 'Velikan'; 18) 'Kortni'; 19) 'Tuleevskij'; 20) 'Samba'; 21) 'Bravo'; 22) 'Krasavčik'; 23-24) 'Irbitskij'; 25) 'Prizer'; 26) 'Krasa Mešery'; 27) 'Nakra'; 28) *S. stenotomum*, k-3640 (the control); 29) 'Utro'; 30) 'Severnoe siânie'; M – molecular weight marker. The observed fragment size is 19 bp bigger than the real one due to the included sequence of the forward primer M13.

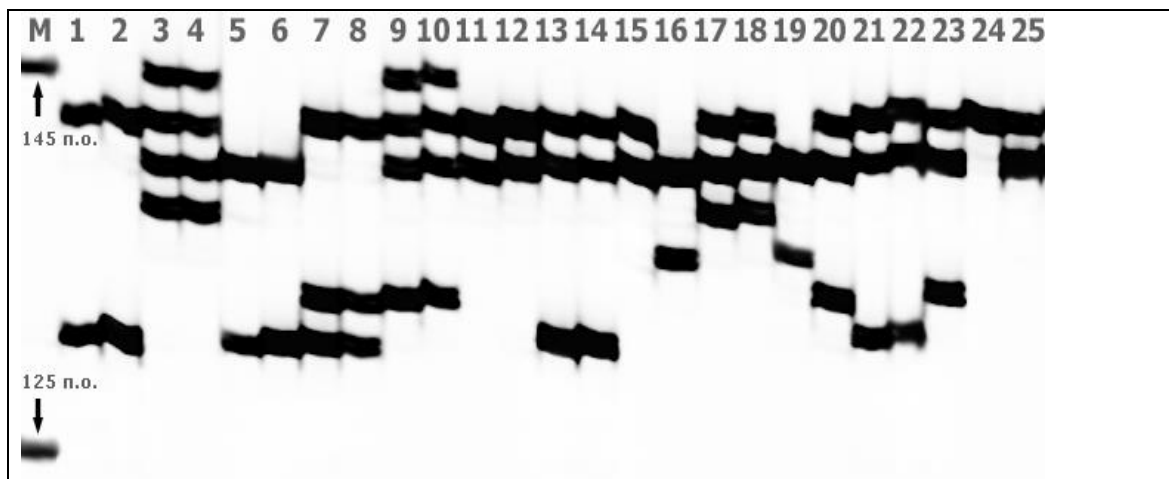


Рис. 3. Аллельный полиморфизм российских сортов картофеля по ядерному SSR-локусу StI032
 1-2) 'Антонина'; 3-4) 'Голубизна'; 5-6) 'Бабушка'; 7-8) 'Гранд'; 9-10) 'Барин'; 11-12) 'Регги';
 13-14) 'Варяг'; 15) 'Лина'; 16) 'Дебют'; 17-18) 'Василек'; 19) 'Дебют'; 20) 'Браво'; 21-22) 'Великан';
 23) 'Люкс'; 24) *S. stenotomum*, к-3640 (контроль); 25) 'Арлекин'; М – маркер молекулярного веса.
 Наблюдаемый размер фрагментов на 19 пн больше реального за счет включенной в них
 последовательности прямого праймера M13.

Fig. 3. Allelic polymorphism of Russian potato cultivars at the nuclear SSR-locus StI032
 1-2) 'Antonina'; 3-4) 'Golubizna'; 5-6) 'Babuška'; 7-8) 'Grand'; 9-10) 'Barin'; 11-12) 'Reggi'; 13-14) 'Varâg';
 15) 'Lina'; 16) 'Debût'; 17-18) 'Vasilek'; 19) 'Debût'; 20) 'Bravo'; 21-22) 'Velikan'; 23) 'Lûks';
 24) *S. stenotomum*, k-3640 (the control); 25) 'Arlekin'; M – molecular weight marker. The observed fragment
 size is 19 bp bigger than the real one due to the included sequence of the forward primer M13.

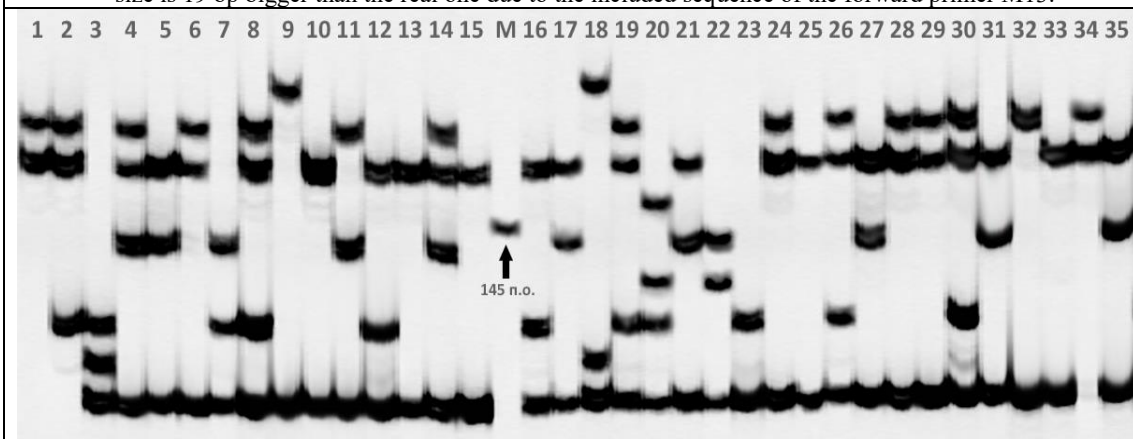


Рис. 4. Аллельный полиморфизм российских сортов картофеля по ядерному SSR-локусу StI033
 1) 'Златка'; 2) 'Метеор'; 3) 'Фиолетовый'; 4) 'Фрителла'; 5) 'Голубизна'; 6) 'Накра'; 7) 'Танго';
 8) 'Колобок'; 9) 'Памяти Рогачева'; 10) 'Тулеевский'; 11) 'Вдохновение'; 12) *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*
 к-3446 (контроль); 13) 'Аляска'; 14) 'Юбиляр'; 15) 'Сиверский'; 16) 'Сафо'; 17) 'Краса Мещеры';
 18) 'Эликсред'; 19) 'Гранд'; 20) 'Дебют'; 21) 'Браво'; 22) 'Утро'; 23) 'Антонина'; 24) 'Третьяковка';
 25) 'Великан'; 26) 'Купец'; 27) 'Варяг'; 28) 'Барин'; 29) 'Матушка'; 30) 'Регги'; 31) 'Люкс';
 32) 'Кузнечанка'; 33) 'Василек'; 34) 'Самба'; 35) 'Юна'; М – маркер молекулярного веса. Наблюдаемый
 размер фрагментов на 19 пн больше реального за счет включенной в них последовательности прямого
 праймера M13.

Fig. 4. Allelic polymorphism of Russian potato cultivars at the nuclear SSR-locus StI033
 1) 'Zlatka'; 2) 'Meteor'; 3) 'Fioletovyj'; 4) 'Fritella'; 5) 'Golubizna'; 6) 'Nakra'; 7) 'Tango'; 8) 'Kolobok';
 9) 'Pamâti Rogaçeva'; 10) 'Tuleevskij'; 11) 'Vdohnovenie'; 12) *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* k-3446 (the
 control); 13) 'Alâska'; 14) 'Ûbilâr'; 15) 'Siverskij'; 16) 'Safo'; 17) 'Krasa Mešery'; 18) 'Ëliksred'; 19) 'Grand';
 20) 'Debût'; 21) 'Bravo'; 22) 'Utro'; 23) 'Antonina'; 24) 'Tret'âkovka'; 25) 'Velikan'; 26) 'Kupec'; 27) 'Varâg';
 28) 'Barin'; 29) 'Matuška'; 30) 'Reggi'; 31) 'Lûks'; 32) 'Kuznečanka'; 33) 'Vasilek'; 34) 'Samba'; 35) 'Ûna'.
 M – molecular weight marker. The observed fragment size is 19 bp bigger than the real one due to the included
 sequence of the forward primer M13.

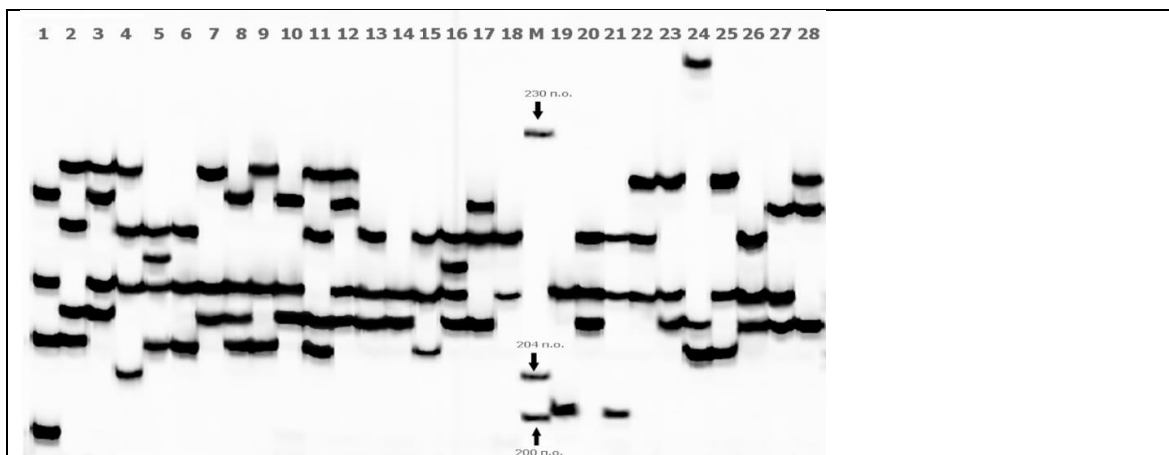


Рис. 5. Аллельный полиморфизм российских сортов картофеля по ядерному SSR-локусу StI046

1) 'Нальчикский'; 2) 'Любава'; 3) 'Сиреневый туман'; 4) 'Златка'; 5) 'Лина'; 6) 'Сафо'; 7) 'Юна'; 8) 'Солнечный'; 9) 'Арлекин'; 10) 'Крепыш'; 11) 'Любава'; 12) 'Накра'; 13) 'Вымпел'; 14) 'Ильинский'; 15) 'Колобок'; 16) 'Василек'; 17) 'Гулливер'; 18) 'Люкс'; 19) 'Старт'; 20) 'Браво'; 21) 'Ирбитский'; 22) 'Самба'; 23) 'Матушка'; 24) 'Русский сувенир'; 25) 'Арлекин'; 26) 'Бабушка'; 27) 'Танго'; 28) 'Фрителла'; M – маркер молекулярного веса.

Наблюдаемый размер фрагментов на 19 пн больше реального за счет включенной в них последовательности прямого праймера M13.

Fig. 5. Allelic polymorphism of Russian potato cultivars at the nuclear SSR-locus StI046

1) 'Nal'čikskij'; 2) 'Lûbava'; 3) 'Sirenevij tuman'; 4) 'Zlatka'; 5) 'Lina'; 6) 'Safo'; 7) 'Ûna'; 8) 'Solnečnyj'; 9) 'Arlekin'; 10) 'Krepyš'; 11) 'Lûbava'; 12) 'Nakra'; 13) 'Vympel'; 14) 'Il'inskij'; 15) 'Kolobok'; 16) 'Vasilek'; 17) 'Gulliver'; 18) 'Lûks'; 19) 'Start'; 20) 'Bravo'; 21) 'Irbitskij'; 22) 'Samba'; 23) 'Matuska'; 24) 'Russkij suvenir'; 25) 'Arlekin'; 26) 'Babuška'; 27) 'Tango'; 28) 'Fritella'; M – molecular weight marker. The observed fragment size is 19 bp bigger than the real one due to the included sequence of the forward primer M13.



Рис. 6. Аллельный полиморфизм российских сортов картофеля по ядерному SSR-локусу STM0037

1) 'Фрителла'; 2) 'Ирбитский'; 3) 'Самба'; 4) 'Матушка'; 5) 'Русский сувенир'; 6) 'Арлекин'; 7) 'Бабушка'; 8) 'Былина Сибири'; 9) 'Кузнечанка'; 10) *S. tuberosum* ssp. *andigenum* k-1746 (контроль); 11) 'Лина'; 12) 'Памяти Рогачева'; 13) 'Саровский'; 14) 'Зумба'; 15) 'Краса Мещеры'; 16) 'Эликсред'; 17) 'Северное сияние'; 18) 'Нальчикский'; 19) 'Барин'; 20) 'Гулливер'; 21) 'Садон'; 22-23) 'Любава'; M – маркер молекулярного веса. Наблюдаемый размер фрагментов на 19 пн больше реального за счет включенной в них последовательности прямого праймера M13.

Fig. 6. Allelic polymorphism of Russian potato cultivars at the nuclear microsatellite locus STM0037

1) 'Fritella'; 2) 'Irbitskij'; 3) 'Samba'; 4) 'Matuska'; 5) 'Russkij suvenir'; 6) 'Arlekin'; 7) 'Babuška'; 8) 'Bylina Sibiri'; 9) 'Kuznečanka'; 10) *S. tuberosum* ssp. *andigenum* k-1746 (the control); 11) 'Lina'; 12) 'Pamâti Rogačeva'; 13) 'Sarovskij'; 14) 'Zumba'; 15) 'Krasa Mešery'; 16) 'Èliksred'; 17) 'Severnoe siânie'; 18) 'Nal'čikskij'; 19) 'Barin'; 20) 'Gulliver'; 21) 'Sadon'; 22-23) 'Lûbava'; M – molecular weight marker. The observed fragment size is 19 bp bigger than the real one due to the included sequence of the forward primer M13.

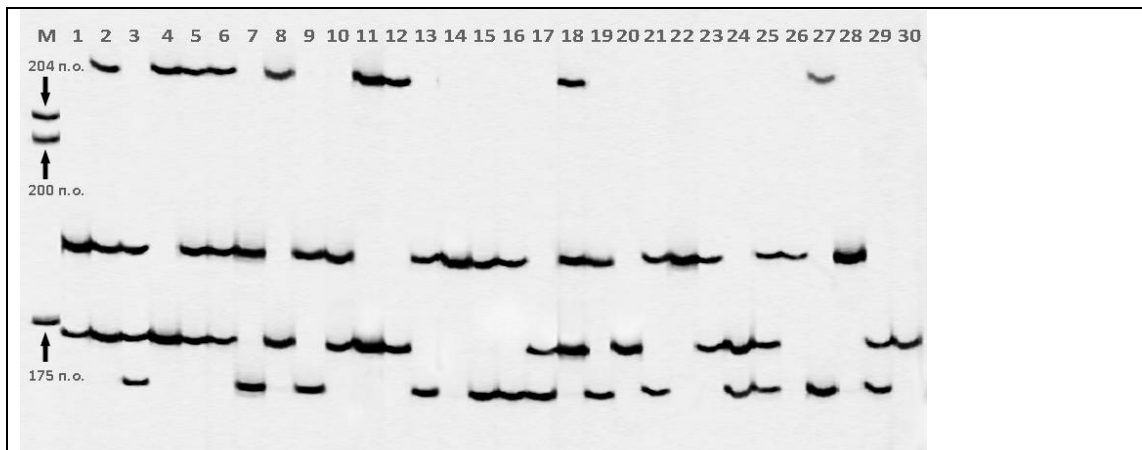


Рис. 7. Аллельный полиморфизм российских сортов картофеля по ядерному SSR-локусу STM2005
 1) 'Бабушка'; 2) 'Терра'; 3) 'Колобок'; 4) 'Сердолик'; 5-6) 'Калибр'; 7) 'Лина'; 8) 'Фиолетовый';
 9) 'Призер'; 10) 'Метеор'; 11-12) 'Фрителла'; 13) 'Голубизна'; 14) 'Тулеевский'; 15) 'Нальчикский';
 16) 'Краса Мещеры'; 17) 'Красавчик'; 18) 'Гранд'; 19) 'Дебют'; 20) 'Пламя'; 21) 'Утро';
 22) 'Северное сияние'; 23) 'Третьяковка'; 24) 'Великан'; 25) 'Купец'; 26) 'Варяг'; 27) 'Барин'; 28) 'Зумба';
 29) 'Регги'; 30) 'Матушка'; М – маркер молекулярного веса. Наблюдаемый размер фрагментов на 19 пн больше реального за счет включенной в них последовательности прямого праймера M13.

Fig. 7. Allelic polymorphism of Russian potato cultivars at the nuclear SSR-locus STM2005
 1) 'Babuška'; 2) 'Terra'; 3) 'Kolobok'; 4) 'Serdolik'; 5-6) 'Kalibr'; 7) 'Lina'; 8) 'Fioletovyj'; 9) 'Prizer';
 10) 'Meteor'; 11-12) 'Fritella'; 13) 'Golubizna'; 14) 'Tuleevskij'; 15) 'Nal'čikskij'; 16) 'Krasa Mešery';
 17) 'Krasavčik'; 18) 'Grand'; 19) 'Debût'; 20) 'Plamâ'; 21) 'Utro'; 22) 'Severnoe siânie'; 23) 'Tret'âkovka';
 24) 'Velikan'; 25) 'Kupec'; 26) 'Varâg'; 27) 'Barin'; 28) 'Zumba'; 29) 'Reggi'; 30) 'Matuška'; M – molecular weight marker. The observed fragment size is 19 bp bigger than the real one due to the included sequence of the forward primer M13.

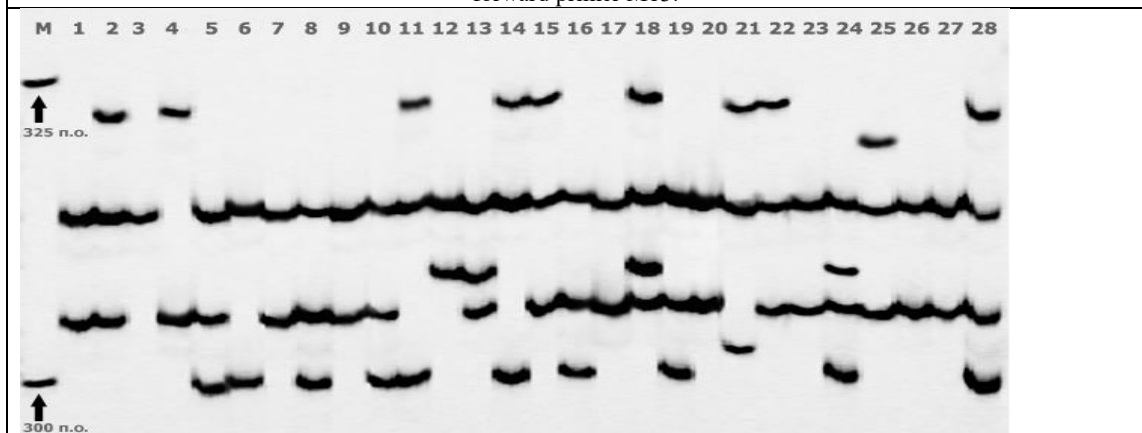


Рис. 8. Аллельный полиморфизм российских сортов картофеля по ядерному SSR-локусу STM5114
 1) *S. tuberosum* ssp. *andigenum* k-1741 (контроль); 2) 'Аляска'; 3) 'Ирбитский'; 4) 'Самба'; 5) 'Матушка';
 6) 'Русский сувенир'; 7) 'Арлекин'; 8) 'Бабушка'; 9) 'Гулливвер'; 10) 'Кузнечанка'; 11) 'Танай';
 12) 'Лина'; 13) 'Памяти Рогачева'; 14) 'Саровский'; 15) 'Юбиляр'; 16) 'Краса Мещеры'; 17) 'Эликсред';
 18) 'Северное сияние'; 19) 'Нальчикский'; 20) 'Голубизна'; 21) 'Люкс'; 22) 'Браво'; 23) 'Барин';
 24) 'Ломоносовский'; 25) 'Накра'; 26) 'Златка'; 27) 'Ильинский'; 28) 'Крепыш'; М – маркер молекулярного веса.
 Наблюдаемый размер фрагментов на 19 пн больше реального за счет включенной в них последовательности прямого праймера M13.

Fig. 8. Allelic polymorphism of Russian potato cultivars at the nuclear SSR-locus STM5114
 1) *S. tuberosum* ssp. *andigenum* k-1741 (the control); 2) 'Alâska'; 3) 'Irbitskij'; 4) 'Samba'; 5) 'Matuška';
 6) 'Russkij suvenir'; 7) 'Arlekin'; 8) 'Babuška'; 9) 'Gulliver'; 10) 'Kuznečanka'; 11) 'Tanai'; 12) 'Lina';
 13) 'Pamâti Rogaçeva'; 14) 'Sarovskij'; 15) 'Ûbilâr'; 16) 'Krasa Mešery'; 17) 'Èliksred'; 18) 'Severnoe siânie';
 19) 'Nal'čikskij'; 20) 'Golubizna'; 21) 'Lûks'; 22) 'Bravo'; 23) 'Barin'; 24) 'Lomonosovskij'; 25) 'Nakra'; 26) 'Zlatka';
 27) 'Il'inskij'; 28) 'Krepyš'; M – molecular weight marker. The observed fragment size is 19 bp bigger than the real one due to the included sequence of the forward primer M13.

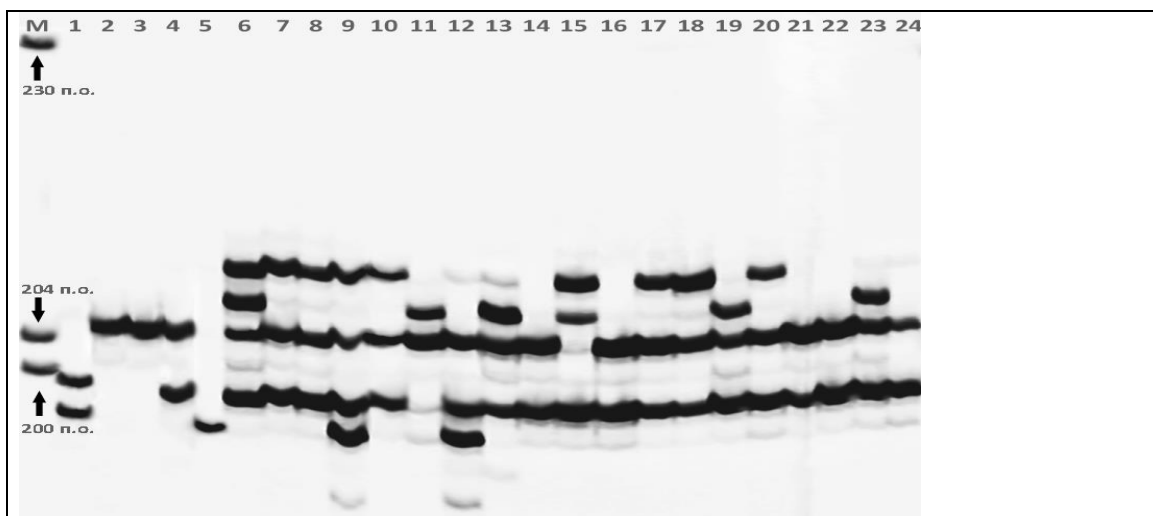


Рис. 9. Аллельный полиморфизм российских сортов картофеля по ядерному SSR-локусу StI001
 1) 'Аляска'; 2-3) 'Мариинский'; 4) 'Варяг'; 5) *S. stenotomum* k-14892 (контроль); 6) 'Нальчикский';
 7) 'Любава'; 8) 'Накра'; 9) 'Златка'; 10) 'Лина'; 11) 'Юна'; 12) 'Сафо'; 13) 'Кортни'; 14) 'Солнечный';
 15) 'Антонина'; 16) 'Крепыш'; 17) 'Ирбитский'; 18) 'Самба'; 19) 'Вымпел'; 20) 'Ильинский';
 21) 'Колобок'; 22) 'Василек'; 23) 'Бабушка'; 24) 'Люкс'; М – маркер молекулярного веса. Наблюдаемый
 размер фрагментов на 19 пн больше реального за счет включенной в них последовательности прямого
 праймера M13.

Fig. 9. Allelic polymorphism of Russian potato cultivars at the nuclear SSR-locus StI001
 'Alaska'; 2-3) 'Mariinskij'; 4) 'Varag'; 5) *S. stenotomum* k-14892 (the control); 6) 'Nal'čickij'; 7) 'Lubava';
 8) 'Nakra'; 9) 'Zlatka'; 10) 'Lina'; 11) 'Ūna'; 12) 'Safo'; 13) 'Kortni'; 14) 'Solnečnyj'; 15) 'Antonina';
 16) 'Krepyš'; 17) 'Irbitskij'; 18) 'Samba'; 19) 'Vympel'; 20) 'Il'inskij'; 21) 'Kolobok'; 22) 'Vasilek';
 23) 'Babuška'; 24) 'Lûks'; M – molecular weight marker. The observed fragment size is 19 bp bigger than the
 real one due to the included sequence of the forward primer M13.

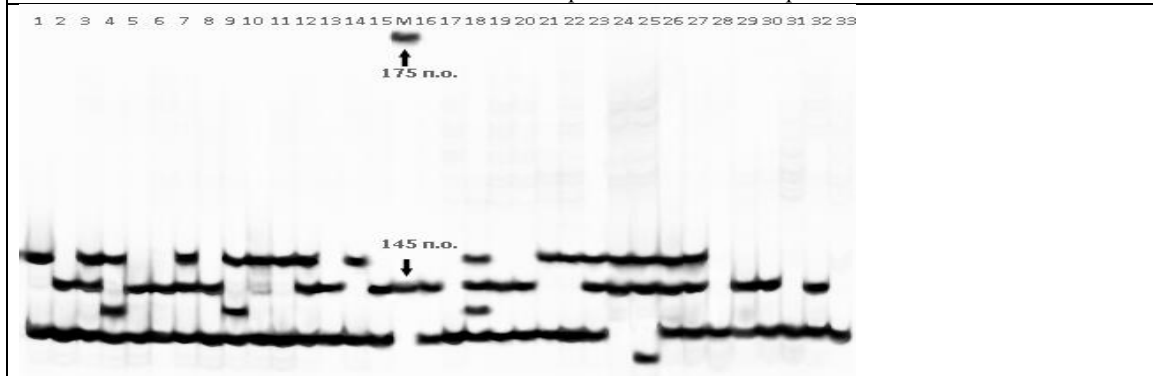


Рис. 10. Аллельный полиморфизм российских сортов картофеля по ядерному SSR-локусу StI014
 1) 'Антонина'; 2) 'Метеор'; 3) 'Фиолетовый'; 4) 'Фрителла'; 5) 'Голубизна'; 6) 'Аляска'; 7) 'Танго';
 8) 'Гулливер'; 9) 'Кузнечанка'; 10) 'Василек'; 11) 'Накра'; 12) *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* k-7528
 (контроль); 13) 'Пламя'; 14) 'Северное сияние'; 15) 'Ирбитский'; 16) 'Краса Мешеры'; 17) 'Сальса';
 18) 'Гранд'; 19) 'Терра'; 20) 'Крепыш'; 21) 'Утро'; 22) 'Великан'; 23) 'Арлекин'; 24) 'Янтарь';
 25) 'Сиверский'; 26) 'Купец'; 27) 'Колобок'; 28) 'Зумба'; 29) 'Красавчик'; 30) 'Сафо'; 31) 'Люкс';
 32) 'Старт'; 33) 'Лина'; М – маркер молекулярного веса. Наблюдаемый размер фрагментов на 19 пн
 больше реального за счет включенной в них последовательности прямого праймера M13.

Fig. 10. Allelic polymorphism of Russian potato cultivars at the nuclear SSR-locus StI014
 1) 'Antonina'; 2) 'Meteor'; 3) 'Fioletovyj'; 4) 'Fritella'; 5) 'Golubizna'; 6) 'Alaska'; 7) 'Tango'; 8) 'Gulliver';
 9) 'Kuznečanka'; 10) 'Vasilek'; 11) 'Nakra'; 12) *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* k-7528 (the control);
 13) 'Plamâ'; 14) 'Severnoe siânie'; 15) 'Irbitskij'; 16) 'Krasa Mešery'; 17) 'Sal'sa'; 18) 'Grand'; 19) 'Terra';
 20) 'Krepyš'; 21) 'Utro'; 22) 'Velikan'; 23) 'Arlekin'; 24) 'Ântar'; 25) 'Siverskij'; 26) 'Kupec'; 27) 'Kolobok';
 28) 'Zumba'; 29) 'Krasavčik'; 30) 'Safo'; 31) 'Lûks'; 32) 'Start'; 33) 'Lina'; M – molecular weight marker. The
 observed fragment size is 19 bp bigger than the real one due to the included sequence of the forward primer M13.

Таблица 3. Характеристика изученных SSR-локусов в выборке сортов картофеля, поступивших в Гербарий ВИР (WIR) для оформления номенклатурных стандартов – 77 образцов

Table 3. Characteristics of the studied SSR loci in the subset of 77 potato cultivar specimens entered into the VIR Herbarium (WIR) to be registered as nomenclatural standards

№ п/п	Локус / Locus	PIC	Число ненулевых аллелей / Number of nonnull alleles	Размеры аллельных фрагментов (пн) / PCR product size (bp)		Число редких аллелей (менее 5%) / Number of rare alleles (less than 5%)	Число уникальных для изученной выборки аллелей / Number of unique alleles for the studied subset
				Min	Max		
1	STG0016	0,751	7	117	153	1	0
2	StI001	0,734	5	176	191	0	0
3	StI004	0,773	8	64	103	2	1
4	StI014	0,706	5	117	129	0	1
5	StI032	0,796	7	109	127	0	1
6	StI033	0,886	9	113	137	4	0
7	StI046	0,836	11	179	218	2	1
8	STM0037	0,823	10	70	92	2	2
9	STM2005	0,716	4	148	190	0	0
10	STM5114	0,704	7	280	304	1	1
		Итого	73			12	7

Анализ полиморфизма SSR-локусов в выборке 66 номенклатурных стандартов и 11 ваучерных образцов

Полиморфизм десяти микросателлитных локусов в выборке из 77 образцов был изучен с использованием модифицированных методов выделения ДНК, постановки ПЦР и проведения SSR-анализа (см. табл. 2). Аллельный состав микросателлитных локусов для каждого сорта определяли по набору специфичных для него амплифицированных фрагментов. Примеры генотипирования показаны на рисунках 1-10. В совокупности в изученной выборке в десяти проанализированных SSR-локусах было выявлено 73 фрагмента размером от 64 пн (StI004) до 304 пн (STM5114) (табл. 3, рис. 1-10). Все проанализированные локусы оказались полиморфными, число аллелей на локус варьировало от четырех (локус STM2005) до 11 (локус StI046). Значения индекса PIC варьировали от 0,704 (STM5114) до 0,886 (StI033). Данный локус отличался также высокой степенью гетерозиготности: только три сорта ('Ильинский', 'Люкс', 'Северное сияние') выборки были представлены дуплексами, остальные являлись триплексами или тетраплексами. Близкие значения показателей полиморфизма отмечены также для локусов STM0037 (10 аллелей, PIC=0,823) и StI033 (9 аллелей, PIC=0,886) (см. табл. 3).

Размеры минимальных и максимальных аллельных фрагментов для большинства локусов совпадали с установленными нами ранее при анализе выборок из 113 сортов отечественной селекции (Antonova et al., 2016),

а также с данными Н.А. Швачко (Shvachko, 2012), полученными для 185 образцов сортов российской и зарубежной селекции из коллекции ВИР. Однако аллельные диапазоны для локусов STM0037, StI014 и StI046 в настоящем исследовании оказались шире, несмотря на меньший объем выборки. Так, у изученных сортов были обнаружены новые аллели STM0037_92 ('Краса Мещеры', 'Нальчикский'), StI014_117 ('Сиверский') и StI046_218 ('Русский сувенир'), а также новые аллели - STG0016_141 ('Василек', 'Сердолик') и StI004_73 ('Памяти Рогачева', 'Терра', 'Сердолик') (табл. 4).

При оценке полиморфизма отдельно учитывали частоту встречаемости редких и уникальных аллелей изученных SSR-локусов. Аллели относили к редким, если их частота в изученной выборке не превышала 5%, и к уникальным, когда аллель был выявлен только у одного образца данной выборки. Как видно из данных таблицы 4, число редких аллелей варьировало от нуля (StI001, STM2005) до четырех (StI033) на локус; число уникальных – от нуля (локусы STG0016, StI001, STM2005, StI033) до двух (STM0037). Из 73 аллелей, выявленных в 10 проанализированных SSR-локусах, редкими были 12, они детектированы у 19 сортов (см. табл. 4). Больше всего редких аллелей (три) выявлено у предсорта 'Эликсред'. Уникальные для этой выборки аллели обнаружены в шести локусах (STM5114, StI004; StI014; StI032; StI046; STM0037) у семи сортов: 'Голубизна', 'Дебют', 'Накра', 'Памяти Осиповой', 'Русский сувенир', 'Сиверский', 'Солнечный'. У сорта 'Дебют' выявлены уникальный и два редких аллеля (см. табл. 4).

Таблица 4. Редкие и уникальные аллели, выявленные у 77 образцов изучаемой выборки
Table 4. Rare and unique alleles identified in 77 specimens in the analyzed subset

№ п/п	Локус / Locus	Аллель / Alleles	Встречаемость в выборке / Occurrence in the subset	Сорта / Cultivars
1	STG0016	STG0016_141	редкий	‘Василек’; ‘Сердолик’
2	STM5114	STM5114_283	редкий	‘Люкс’; ‘Сиреневый туман’
3		STM5114_301	уникальный	‘Накра’
4	StI004	StI004_64	уникальный	‘Голубизна’
5		StI004_73	редкий	‘Памяти Рогачева’; ‘Терра’; ‘Сердолик’
6		StI004_103	редкий	‘Василек’; ‘Фиолетовый’
7	StI032	StI032_115	уникальный	‘Дебют’
8	StI033	StI033_116	редкий	‘Арлекин’; ‘Фиолетовый’; ‘Эликсред’
9		StI033_122	редкий	‘Дебют’; ‘Утро’
10		StI033_128	редкий	‘Бабушка’; ‘Дебют’
11		StI033_137	редкий	‘Памяти Рогачева’; ‘Русский сувенир’; ‘Эликсред’
12	StI046	StI046_182	редкий	‘Краса Мещеры’; ‘Терра’
13		StI046_185	редкий	‘Златка’; ‘Майский цветок’; ‘Сказка’
14		StI046_218	уникальный	‘Русский сувенир’
15	STM0037	STM0037_70	уникальный	‘Памяти Осиповой’
16		STM0037_76	уникальный	‘Солнечный’
17		STM0037_82	редкий	‘Златка’; ‘Эликсред’; ‘Вдохновение’
18		STM0037_92	редкий	‘Краса Мещеры’; ‘Нальчикский’
19	StI014	StI014_117	уникальный	‘Сиверский’
	8 локусов	12 редких и 7 уникальных аллелей		24 сорта

Полиморфизм, выявленный в 10 изученных локусах, оказался достаточен для различения практически всех образцов выборки. Исключение составили сорта ‘Сказка’ и ‘Майский цветок’, у которых SSR-профили совпадали. Данный результат был ожидаем, поскольку клон сорта ‘Майский цветок’ был отобран среди растений сорта ‘Сказка’ по измененному признаку окраски кожуры клубней (официальные документы «Описание селекционного достижения»); его происхождение является результатом соматической мутации. Гербарные листы номенклатурных стандартов этих двух сортов дополнены также фотографиями клубней (Klimenko et al., 2020).

Информация об аллельном составе SSR-локусов послужила основой для разработки генетических паспортов сортов, для которых были оформлены номенклатурные стандарты и ваучерные образцы.

В процессе создания генетических паспортов было проведено большое количество дополнительных ПЦР

с использованием ДНК-препаратов одноименных образцов, полученных из различных источников – образцы сортов из полевой и *in vitro* коллекций ВИР, из *in vitro* коллекций разных институтов и образцы, в разные годы (2016-2019) проходившие эколого-географические испытания в рамках Комплексного плана научных исследований (КПНИ) «Развитие селекции и семеноводства картофеля» (Fomina et al., 2020a; Klimenko et al., 2020; Rybakov et al., в этом выпуске; Fomina et al., 2020b, в этом выпуске). При этом обнаружилось, что при использовании двух пар праймеров из набора, а именно StI001 и StI014, часто образуются менее выраженные (по сравнению с основными) ПЦР-продукты, которые не воспроизводятся между повторностями опыта. Для однозначного определения аллельного состава локусов StI001 и StI014 приходилось проводить большое количество дополнительных анализов, что очень затрудняло работу. Поэтому в дальнейшем мы отказались от использования

этих двух маркеров, и остановились на наборе из восьми пар SSR-праймеров: STG0016; StI004; StI032; StI033; StI046; STM0037; STM2005 и STM5114. С использованием этого набора были разработаны генетические паспорта 66 номенклатурных стандартов российских сортов картофеля и генотипирован ряд ваучерных образцов (Fomina et al. (a), 2020; Rybakov et al., в этом выпуске; Fomina et al. (b), в этом выпуске).

Анализ генетических взаимосвязей российских сортов картофеля

Генетические взаимосвязи 66 современных российских сортов картофеля, представленных номенклатурными стандартами, и 11 ваучерных образцов были изучены с использованием оптимизированного набора из восьми хромосомспецифичных микросателлитных маркеров. Кластерный анализ был выполнен с применением взвешенного метода ближайшего соседа (Weighted Neighbor Joining, NJ), позволяющего связывать объекты по метрике расстояния, включающей расстояние между парой образцов и всеми остальными образцами выборки (рис. 11). На полученной дендрограмме не было выявлено совместной кластеризации сортов, созданных в одном и том же селекционном центре. Изученные сорта селекции ВНИИКС, Ленинградского НИИСХ «Белогорка», ТатНИИСХ-ФИЦ КазНЦ, сибирских и уральского селекционных центров распределились по девяти группам, которые не имели высоких значений бутстреп-оценки (см. рис. 11). Исключение составили несколько пар сортов общего происхождения, например, «Сиреневый туман» и «Алый Парус» (бутстреп-коэффициент составил 82%), отобранные как разные сеянцы одной гибридной комбинации (информация от авторов сортов). С более низкими значениями бутстреп-оценки (менее 70%) группировались несколько пар сортов, имеющих общее происхождение, например, «Зумба» – «Сальса» (отобраны в реципрокных скрещиваниях сорта «Удача» и гибрида 21-98); «Самба» – «Кортни» (отцовской формой которых является сорт «Аусония»); «Саровский» – «Любава» (отцовской формой которых был селекционный клон 733-65). Также можно отметить совместную кластеризацию трех белогорских сортов – «Сударыня», «Евразия», «Сиверский» и селекционного клона 1604/16 (см. рис. 11), которые произошли от гибридной формы 8889/3 (Gavrilenko et al., 2018; Klimentenko et al., 2020). В то же время другие пары сортов, имеющих общее происхождение, распределились в разные кластеры.

Сопоставление результатов SSR-генотипирования номенклатурных стандартов российских сортов с данными литературы

Часть сортов, переданных в ВИР для оформления номенклатурных стандартов и их генетической паспортизации, ранее была генотипирована с использованием материала из коллекций разных институтов. Так, 42 сорта были генотипированы во ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, микросателлитные профили этих сортов были опубликованы в брошюре «Сорта картофеля, включенные в эколого-географическое испытание 2017-2018 годов» (Potato cultivars, 2018). Из этих 42-х образцов сортов двадцать восемь («Антонина»; «Арлекин»; «Василек»; «Великан»; «Вымпел»; «Голубизна»; «Жигулевский»; «Ильинский»; «Колобок»; «Кортни»; «Лина»; «Ломоносовский»; «Любава»; «Матушка»; «Метеор»; «Накра»; «Невский»; «Памяти Рогачева»; «Регги»; «Русский сувенир»; «Самба»; «Саровский»; «Сафо»; «Тулеевский»; «Фаворит»; «Фиолетовый»; «Фрителла»; «Юна») совпали с составом нашей выборки номенклатурных стандартов, и еще два сорта («Люкс» и «Танго») были изучены в нашей выборке ваучерных образцов. Данные SSR-генотипирования уральских сортов приведены в брошюре «Картофель на Урале» (Shanina, Klyukina, 2018) и в статье О.С. Колобовой с соавторами (Kolobova et al., 2017). В наших исследованиях (Fomina et al. (b), в этом выпуске) были генотипированы пять уральских сортов («Аляска», «Браво», «Ирбитский», «Люкс», «Терра») в качестве ваучерных образцов.

В цитированных выше работах (Potato cultivars, 2018; Kolobova et al., 2017; Shanina, Klyukina, 2018) для генотипирования был использован один и тот же набор из десяти SSR-маркеров, из которых пять (STG0016, STM5114, StI004, StI032, StI033) были использованы в наших исследованиях и входили в набор для генетической паспортизации номенклатурных стандартов. Последнее обусловило возможность сопоставить полученные нами SSR-профили с ранее опубликованными данными.

В Приложениях 1 и 2 (Supplements 1 and 2¹) в виде таблиц суммированы результаты сопоставления ранее опубликованных данных с микросателлитными профилями номенклатурных стандартов и ваучерных образцов. В этих таблицах приведен общий для всех работ показатель «диапазон длин фрагментов в парах оснований», то есть границы аллельных интервалов (минимум-максимум) для каждого из пяти SSR-локусов. В таблицу Приложения 1 (Supplement 1) включены также результаты создателей праймеров (Ghislain et al., 2009; Feingold et al., 2005), которые изучали полиморфизм SSR-локусов в обширных выборках образцов культурного картофеля.

Анализируя данные Приложения 1 (Supplement 1), можно отметить несколько несовпадений диапазонов

¹ Приложения доступны в онлайн версии статьи / Supplementary materials are available in the online version of the paper: <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2020-4-02>

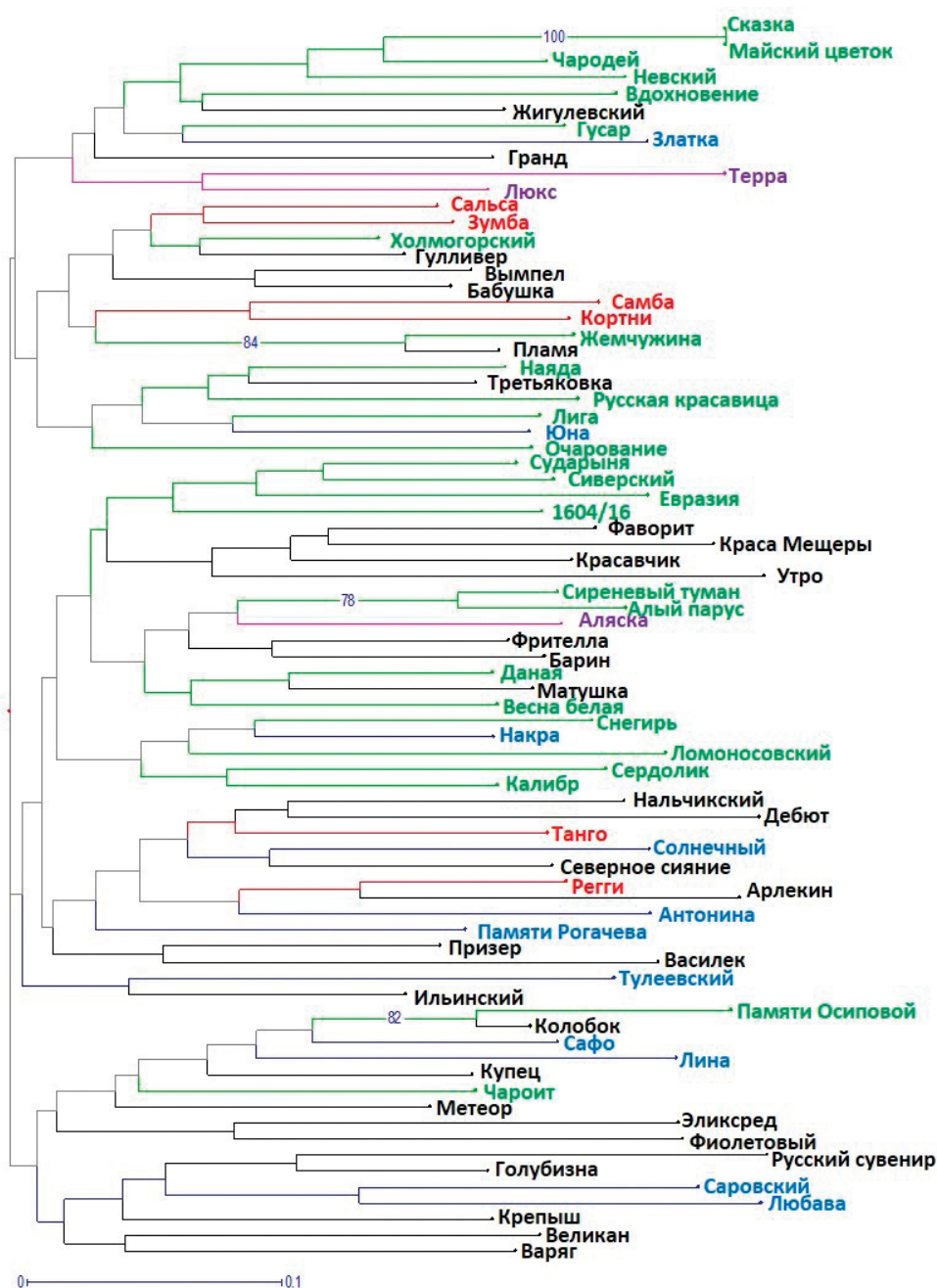


Рис. 11. Дендрограмма сортов селекции РФ, построенная с использованием метода WNJ, 1000 бутстреп, приведены значения бутстреп больше 70%

Цветовые обозначения для групп сортов: зеленый – сорта Ленинградского НИИСХ «Белогорка»; черный – сорта селекции ВНИИКХ им. А.Г. Лорха; синий – сорта, созданные в селекционных центрах Сибири (в том числе в соавторстве с ВНИИКХ); красный – сорта селекции Татарского НИИСХ; фиолетовый – сорта уральской селекции.

Fig. 11. Russian released cultivars dendrogram constructed using the WNJ method, 1000 bootstrap, showing bootstrap values higher than 70%

Color designations for the cultivar groups: green – cultivars bred in the “Belogorka” Leningrad research institute for agriculture, black – cultivars bred in the A.G. Lorkh All-Russian research institute of potato farming (VNIKH), blue – cultivars bred in the Siberian breeding centers, red – cultivars bred by the Tatar Research Institute of Agriculture, purple – cultivars bred in the Ural breeding center.

длин фрагментов (в таблице выделены подчеркиванием) в работах разных авторов. Так, для локуса StI032 размеры аллельных интервалов, полученные с применением капиллярного электрофореза, резко отличаются от выявленных в нашей работе. В то же время, аллельные границы, установленные в нашей работе, совпадают с указанными авторами-разработчиками праймеров (Feingold et al., 2005) и с границами, установленными при генотипировании обширных выборок образцов южно-американских аборигенных сортов и образцов селекционных сортов картофеля (Ghislain et al., 2009; Gavrilenko et al., 2010; Shvachko, 2012; Antonova et al., 2016). Самое большое число (80%) отличий номенклатурных стандартов от одноименных образцов сортов отмечено для локуса StI032 (см. Приложение 2 / Supplement 2).

Следует отметить, что для SSR-генотипирования отечественных сортов были использованы разные технологии разделения SSR-фрагментов – электрофорез в проточном полиакриламидном геле на секвенаторе Li-Cor (Shvachko, 2012; Antonova et al., 2016; Klimenko et al., 2020; Fomina et al., 2020 (a); Rybakov et al., в этом выпуске; Fomina et al. (b), в этом выпуске) и капиллярный электрофорез (Kolobova et al., 2017; Shanina, Klyukina, 2018; Potato cultivars, 2018). При использовании техники капиллярного электрофореза в локусе StI033 наблюдалось превышение значения минимального размера фрагментов – 128 пн (Potato cultivars, 2018; Kolobova et al., 2017) и 118 пн (Shanina, Klyukina, 2018) по сравнению с нашими данными – 113 пн (см. Приложение 1 / Supplement 1). В результате такого превышения в SSR-профилях образцов сортов (Potato cultivars, 2018) отсутствует аллель 113(112) пн, который наиболее характерен для образцов культурных видов и селекционных сортов картофеля. Например, в работе по созданию набора PGI аллель STI0033_112 был выявлен у 98,5% из 742 изученных образцов культурных видов (Ghislain et al., 2009), а в выборке из 113 отечественных сортов частота встречаемости этого аллеля превышала 95% (Antonova et al., 2016).

Для локусов STM5114, StI004 и STG0016 несоответствия диапазонов длин SSR-фрагментов могут быть объяснены различиями в составе изученных выборок. Однако данные по этим локусам у целого ряда одноименных образцов существенно отличались от соответствующих микросателлитных профилей номенклатурных стандартов (см. Приложение 2 / Supplement 2). Следует также отметить существенные отличия границ диапазонов длин фрагментов для локуса StI004 в брошюре «Картофель на Урале» (Shanina, Klyukina, 2018) от всех остальных данных (см. Приложение 1 / Supplement 1). Наилучшее совпадение было отмечено для локуса STG0016 – различия наблюдали только у ваучерного образца сорта ‘Аляска’, который отличался от образца этого сорта в работе уральских коллег (Shanina, Klyukina, 2018) только по одному из четырех аллелей.

В отдельных случаях причиной различий между

SSR-спектрами образцов одного сорта могли быть технические ошибки (засорение растительного материала) в выборках КПНИ_ЭГИ (Klimenko et al., 2020; Rybakov et al., в этом выпуске). Однако очевидно, что большая часть различий объясняется использованием разных методических подходов. Тем большее значение приобретает возможность использования номенклатурных стандартов сортов в качестве эталонов. Препараты ДНК, полученные из растительного материала номенклатурных стандартов, и данные генетической паспортизации стандартов позволяют проводить сравнение тестируемого материала даже в условиях лабораторий с принципиально разным оборудованием.

Заключение

В настоящей работе представлены протоколы модифицированных методов выделения ДНК, постановки ПЦР и проведения SSR-анализа, которые позволяют проводить генотипирование сортов картофеля без применения дорогостоящих наборов реагентов. Использован оптимизированный набор из восьми хромосомспецифичных монолокусных микросателлитных маркеров для изучения полиморфизма и генетических взаимосвязей современных российских сортов картофеля, представленных 66 номенклатурными стандартами и 11 ваучерными образцами.

Благодарности / Acknowledgments

Статья подготовлена при поддержке подпрограммы «Развитие селекции и семеноводства картофеля в РФ» (2017-2018), темы НИР № 0662-2019-0004, номер государственной регистрации (РК) – АААА-А19-119013090158-8 «Коллекции ВИР вегетативно размножаемых культур и их диких родичей - изучение и рациональное использование» (2019-2020) и темы № 0481-2019-0002 «Изучение генетических ресурсов культурных растений, их диких родичей и форм собственной селекции при помощи комплекса современных методов ДНК-диагностики».

The paper was prepared with the support from the subprogram “Development of potato breeding and seed production in the Russian Federation” (2017-2018), the R&D Topic No. 0662-2019-0004, State Registration No. AAA-A-19-119013090158-8 “VIR collections of vegetatively propagated crops and their wild relatives, their study and rational use” (2019-2020), and the Topic No. 0481-2019-0002 “The study of genetic resources of cultivated plants and own-created forms using a complex of modern methods of DNA diagnostics”.

Литература / References

Antonova O.Y., Shvachko N.A., Novikova L.Y., Shuvalov O.Y., Kostina L.I., Klimenko N.S., Shuvalova A.R., Gavrilenko T.A.

- Genetic diversity of potato varieties bred in Russia and near-abroad countries based on polymorphism of SSR-loci and markers associated with resistance R-genes. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2016;20(5):596-606. [in Russian] (Антонова О.Ю., Швачко Н.А., Новикова Л.Ю., Шувалов О.Ю., Костина Л.И., Клименко Н.С., Шувалова А.Р., Гавриленко Т.А. Генетическое разнообразие сортов картофеля российской селекции и стран ближнего зарубежья по данным полиморфизма SSR-локусов и маркеров R-генов устойчивости. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016;20(5):596-606). DOI: 10.18699/VJ16.181
- Bali S., Sathuvalli V., Brown C., Novy R., Ewing L., Debons J., Douches D., Coombs J., Navarre D., Whitworth J., Charlton B., Yilma S., Shock C., Stark J., Pavak M., Knowles N.R. Genetic fingerprinting of Potato Varieties from the Northwest Potato Variety Development Program. *American Journal of Potato Research*. 2017;94(1):54-63. DOI: 10.1007/s12230-016-9547-z
- DARwin5 версия 5.0.158 – программа. URL: <http://www.darwin.cirad.fr/darwin> [дата обращения: 13.11.2020]
- Implen: [website]. URL: <https://www.implen.de/nanophotometer> [дата обращения: 13.11.2020]
- Dice L. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*. 1945;26(3):297-302. DOI: 10.2307/1932409
- Favoretto P., Veasey E.A., Melo P.C.T. Molecular characterization of potato cultivars using SSR markers. *Horticultura Brasileira*. 2011;29(4):542-547. DOI: 10.1590/S0102-05362011000400017
- Feingold S., Lloyd J., Norero N., Bonierbale M., Lorenzen J. Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 2005;111(3):456-466. DOI: 10.1007/s00122-005-2028-2
- Fomina N.A., Antonova O.Yu., Chukhina I.G., Gimaeva E.A., Stashevski Z., Gavrilenko T.A. Nomenclatural standards and genetic passports of potato cultivars bred by the Tatar Research Institute of Agriculture “Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences”. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020a;3(3):55-67. [in Russian]. (Фомина Н.А., Антонова О.Ю., Чухина И.Г., Гимаева Е.А., Сташевски З., Гавриленко Т.А. Номенклатурные стандарты и генетические паспорта сортов картофеля селекции Татарского НИИСХ «Казанский научный центр РАН». *Биотехнология и селекция растений*. 2020a;3(3):55-67). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-3-04
- Gavrilenko T., Antonova O., Ovchinnikova A., Novikova L., Krylova E., Mironenko N., Pendinen G., Islamshina A., Shvachko N., Kiru S., Kostina L., Afanasenko O., Spooner D. A microsatellite and morphological assessment of the Russian National cultivated potato collection. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2010;57(8):1151-1164. DOI: 10.1007/s10722-010-9554-8
- Gavrilenko T., Antonova O., Shuvalova A., Krylova E., Alpatyeva N., Spooner D.M., Novikova L. Genetic diversity and origin of cultivated potatoes based on plastid microsatellite polymorphism. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2013;60(7):1997-2015. DOI: 10.1007/s10722-013-9968-1
- Gavrilenko T.A., Chukhina I.G. Nomenclatural standards of modern Russian potato cultivars preserved at the VIR herbarium (WIR): A new approach to cultivar gene pool registration in a genebank. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(3):6-17. [in Russian]. (Гавриленко Т.А., Чухина И.Г. Номенклатурные стандарты современных российских сортов картофеля, хранящиеся в гербарии ВИР (WIR): новые подходы к регистрации сортового генофонда в генбанках. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(3):6-17). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-3-02
- Gavrilenko T.A., Klimenko N.S., Antonova O.Yu., Lebedeva V.A., Evdokimova Z.Z., Gadjiyev N.M., Apalikova O.V., Alpatyeva N.V., Kostina L.I., Zoteyeva N.M., Mamadbokirova F.T., Egorova K.V. Molecular screening of potato varieties bred in the northwestern zone of the Russian Federation. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(1):35-45. [in Russian] (Гавриленко Т.А., Клименко Н.С., Антонова О.Ю., Лебедева В.А., Евдокимова З.З., Гаджиев Н.М., Апаликова О.В., Алпатьева Н.В., Костина Л.И., Зотеева Н.М., Мамадбокирова Ф.Т., Егорова К.В. Молекулярный скрининг сортов и гибридов картофеля северо-западной зоны Российской Федерации. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(1):35-45). DOI: 10.18699/VJ18.329
- Ghebresslassie B.M., Githiri S.M., Mehari T., Kasili R.W., Ghislain M., Magembe E. Genetic diversity assessment of farmers' and improved potato (*Solanum tuberosum*) cultivars from Eritrea using simple sequence repeat (SSR) markers. *African Journal of Biotechnology*. 2016;15(35):1883-1891. DOI: 10.5897/AJB2016.15237
- Ghislain M., Andrade D., Rodríguez F., Hijmans R., Spooner D.M. Genetic analysis of the cultivated potato *Solanum tuberosum* L. Phureja Group using RAPDs and nuclear SSRs. *Theoretical and Applied Genetics*. 2006;113:1515-1527. DOI: 10.1007/s00122-006-0399-7
- Ghislain M., Nunez J., Herera M. del R., Pignataro J., Guzman F., Bonierbale M., Spooner D.M. Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. *Molecular Breeding*. 2009;23:377-388. DOI: 10.1007/s11032-008-9240-0
- Ghislain M., Spooner D.M., Rodriguez F., Villamon F., Nunez J., Vasquez C., Waugh R., Bonierbale M. Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004;108(5):881-890. DOI: 10.1007/s00122-003-1494-7
- Kandratiuk A., Kilchevsky A., Kusminova E. Analysis of microsatellite locus polymorphism in potato cultivars of Belarusian and foreign breeding. *Molecular and Applied Genetics: Proceedings*. 2012;13:25-29. [in Russian] (Кондратюк А.В., Кильчевский А.В., Кузьминова Е.И. Анализ полиморфизма микросателлитных локусов сортов картофеля белорусской и иностранной селекции. *Молекулярная и прикладная генетика: сборник научных трудов*. 2012;13:25-29).
- Kawchuk L.M., Lynch D.R., Thomas J., Penner B., Sillito D., Kulcsar F. Characterization of *Solanum tuberosum* simple sequence repeats and application to potato cultivar identification. *American Potato Journal*. 1996;73:325-335. DOI: 10.1007/BF02849164
- Klimenko N.S., Gavrilenko T.A., Chukhina I.G., Gadzhiev N.M., Evdokimova Z.Z., Lebedeva V.A. Nomenclatural standards and genetic passports of potato cultivars bred in the Leningrad Scientific Research Institute of Agriculture “Belogorka”. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(3):18-54. [in Russian] (Клименко Н.С., Гавриленко Т.А., Чухина И.Г., Гаджиев Н.М., Евдокимова З.З., Лебедева В.А. Номенклатурные стандарты и генетические паспорта сортов картофеля селекции Ленинградского НИИСХ «Белогорка». *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(3):18-54). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-3-03
- Kolobova O.S., Maluchenko O.P., Shalaeva T.V., Shanina E.P., Shilov I.A., Alekseev Ya.I., Velishaeva N.S. Multiplexed set of 10 microsatellite markers for identification of potato varieties. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(1):124-127. [in Russian] (Колобова О.С., Малюченко О.П., Шалаева Т.В., Шанина Е.П., Шилов И.А., Алексеев Я.И., Велишаева Н.С. Генетическая паспортизация картофеля на основе мультиплексного анализа 10 микросателлитных маркеров. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(1):124-127). DOI: 10.18699/VJ17.230
- Li-Cor: [website]. URL: <https://www.licor.com> [дата обращения: 13.11.2020]
- Milbourne D., Meyer R.C., Collins A.J., Ramsay L.D., Gebhardt C., Waugh R. Isolation, characterisation and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Molecular and General Genetics*. 1998;259:233-245. DOI: 10.1007/s004380050809
- Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 1973;70(12):3321-3323. DOI: 10.1073/pnas.70.12.3321
- Potato cultivars included in the 2017-2018 ecological-geographic test (Sorta kartofelya vlyuchennyye v ekologo-geograficheskoye ispytaniye 2017-2018 godov) Novosibirsk: SB RAS; 2018 [in Russian] (Сорта картофеля, включенные в эколого-географическое испытание 2017-2018 годов. Новосибирск: Издательство СО РАН; 2018).
- Provan J., Powell W., Waugh R. Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theoretical and Applied Genetics*. 1996;92:1078-1084. DOI: 10.1007/BF00224052
- Prisyazhniuk L.M., Klyachenko O.L., Dikhtiar I.O., Symonenko N.V. Analysis of diversity and genetic interactions of potato varieties (*Solanum tuberosum* L.) based on morphological character-

- istics and SSR markers. *Plant Varieties Studying and protection*. 2018;14(3):277-284. DOI: 10.21498/2518-1017.14.3.2018.145292
- Reid A., Hof L., Felix G., Ruecker B., Tams S., Milczynska E., Esselink D., Uenk G., Vosman B., Weitz A. Construction of an integrated microsatellite and key morphological characteristic database of potato varieties on the EU Common Catalogue. *Euphytica*. 2011;182:239-249. DOI: 10.1007/s10681-011-0462-6
- Ryzhova N.N., Martirosyan E.V., Kochieva E.Z. Analysis of microsatellite locus polymorphism in potato (*Solanum tuberosum*) cultivars of Russian breeding. *Russian Journal of Genetics*. 2010;46(4):481-487. [in Russian] (Рыжова Н.Н., Мартиросян Е.В., Кочиева Е.З. Анализ полиморфизма микросателлитных локусов сортов картофеля *Solanum tuberosum* отечественной селекции. *Генетика*. 2010;46(4):481-487).
- Shanina E.P., Klyukina E.M. Potatoes in the Urals (Kartofel na Urale) Ekaterinburg; 2018. [in Russian] (Шанина Е.П., Ключкина Е.М. Картофель на Урале. Екатеринбург; 2018).
- Shvachko N.A. Genetic diversity of potato varieties of VIR collection detected by SSR analysis (Geneticheskoe raznoobrazie selektsionnykh sortov kartofelya kolleksii VIR, vyyavlennoe SSR analizom) [dissertation]. St. Petersburg: VIR; 2012. [in Russian] (Швачко Н.А. Генетическое разнообразие селекционных сортов картофеля коллекции ВИР, выявленное SSR анализом: дис. ... канд. биол. наук. Санкт-Петербург: ВИР; 2012).
- Spooner D.M., Nuñez J., Rodríguez F., Naik P.S., Ghislain M. Nuclear and chloroplast DNA reassessment of the origin of Indian potato varieties and its implications for the origin of the early European potato. *Theoretical and Applied Genetics*. 2005;110:1020-1026. DOI: 10.1007/s00122-004-1917-0
- Spooner D.M., Nunez J., Trujillo G., Herera M. del R., Guzman F., Ghislain M. Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2007;104(49):19398-19403. DOI: 10.1073/pnas.0709796104
- Tang J., Baldwin S.J., Jacobs J.M., Linden C.G., Voorrips R.E., Leunissen J.A.M., Eck H., Vosman B. Large-scale identification of polymorphic microsatellites using an in silico approach. *BMC Bioinformatics*. 2008;9:374. DOI: 10.1186/1471-2105-9-374
- Tiwari J.K., Ali N., Devi S., Kumar V., Zinta R., Chakrabarti S.K. Development of microsatellite markers set for identification of Indian potato varieties. *Scientia Horticulturae*. 2018;231:22-30. DOI: 10.1016/j.scienta.2017.11.027
- Veilleux R.E., Shen L.Y., Paz M.M. Analysis of the genetic composition of anther-derived potato by randomly amplified polymorphic DNA and simple sequence repeats. *Genome*. 1995;38 (6):1153-1162.
- Yessimseitova A.K., Shustov A.V., Ahmetollaev I.A., Krassavin V.F., Kakimzhanova A.A. Molecular-genetic certification of potato varieties and forms using SSR-markers. *Biotechnology. Theory and Practice*. 2015;2:51-54. [in Russian] (Есимсеитова А.К., Шустов А.В., Ахметоллаев И.А., Красавин В.Ф., Какимжанова А.А. Молекулярно-генетическая паспортизация сортов и форм картофеля с использованием SSR-маркеров. *Биотехнология. Теория и практика*. 2015;2:51-54). DOI: 10.11134/btp.2.2015.6