


Геномные районы *Solanum tuberosum* L., ассоциированные с глубиной залегания глазков клубней

И.В. Тоцкий^{1, 2} , И.В. Розанова^{1, 3}, А.Д. Сафонова², А.С. Батов², Ю.А. Гуреева², А.В. Кочетов¹, Е.К. Хлесткина^{1, 3}

¹ Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Сибирский научно-исследовательский Институт растениеводства и селекции – филиал Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Федеральное исследовательское учреждение Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

 e-mail: totsky@bionet.nsc.ru

Аннотация. Картофель (*Solanum tuberosum* L.) – одна из важнейших в мире продовольственных культур. Геном вида автотетраплоидный, отличается высоким уровнем гетерозиготности, этот вид является также перекрестно-опыляемым. Все это затрудняет генетический анализ и селекционный процесс. Глубина залегания глазков клубня картофеля продовольственного назначения – важный признак, влияющий на пригодность сортов картофеля для переработки. Селекция по этому признаку ведется на основе фенотипической оценки. Идентификация локусов, контролирующих данный признак, позволила бы проводить маркер-контролируемый отбор гибридов, отбраковывая формы с глубоким залеганием глазков на ранних этапах селекции. Целью настоящего исследования было выявление геномных районов, ассоциированных с глубиной залегания глазков, путем анализа сортообразцов картофеля *S. tuberosum* L. из коллекции ГенАгро Института цитологии и генетики СО РАН. При использовании 15214 SNP-маркеров, генотипированных с помощью чипа Illumina 22K SNP potato array, и обобщенной линейной модели (General Linear Model, GLM) с учетом популяционной структуры найдены 24 значимых маркера, ассоциированных с признаком «глубина залегания глазков». Полученные данные показали наличие SNP в четырех геномных районах: в хромосомах 4 (1 маркер в районе 3.92 Мб), 5 (1 маркер в районе 4.67 Мб) и 10 (1 маркер, относящийся к району 4.87 Мб, и 21 маркер в районе 48.1–48.9 Мб). Сопоставление выявленных геномных районов в нашем исследовании с более ранними работами подтвердило, что локус между 48.1–48.9 Мб был известен ранее, остальные три района обнаружены впервые. Участки ДНК, содержащие SNP, сцепленные с глубиной залегания глазков, были изучены в сборке генома картофеля SolTub_3.0 (<https://plants.ensembl.org/>), и на основе полученных данных были разработаны KASP-маркеры, при применении которых можно будет более эффективно вести скрининг селекционного материала и селекцию сортов с мелким залеганием глазков. Ключевые слова: GWAS; SNP; картофель; глубина залегания глазков.

Для цитирования: Тоцкий И.В., Розанова И.В., Сафонова А.Д., Батов А.С., Гуреева Ю.А., Кочетов А.В., Хлесткина Е.К. Геномные районы *Solanum tuberosum* L., ассоциированные с глубиной залегания глазков клубней. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(5):465-473. DOI 10.18699/VJ20.638


Genomic regions of *Solanum tuberosum* L. associated with the tuber eye depth

I.V. Totsky^{1, 2} , I.V. Rozanova^{1, 3}, A.D. Safonova², A.S. Batov², Yu.A. Gureeva², A.V. Kochetov¹, E.K. Khlestkina^{1, 3}

¹ Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Siberian Research Institute of Plant Production and Breeding – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

 e-mail: totsky@bionet.nsc.ru

Abstract. Potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the most important food crops in the world. The genome of this potato species is autotetraploid and has a high level of heterozygosity, also this potato species is a cross-pollinated plant. These characteristics complicate the genetic analysis and breeding process. The tuber's eye depth is an important trait that affects the suitability of potato varieties for processing. Potato breeding for this trait is based on phenotypic assessment. Identification of the loci that control tuber eye depth would allow diagnostic markers for the marker-assisted selection to be created. The aim of this study is to search for loci associated with the eye depth by analyzing *Solanum tuberosum* varieties from the GenAgro collection of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, genotyped using the Illumina 22K SNP potato array DNA chip. The 24 significant markers associated with the “eye depth” trait were identified using 15,214 SNP markers genotyped with the Illumina 22K SNP potato array chip and the general linear model (GLM) taking into account the population structure. Data obtained showed the presence of SNPs in four genomic regions: on chromosome 4 (1 marker in the 3.92 Mb area), 5 (1 marker in the 4.67 Mb area) and 10 (1 marker in the 4.87 Mb area and 21 markers in the region between 48.1–48.9 Mb). The results

of localization in the region 48.1–48.9 Mb of chromosome 10 correspond to previously published studies, the remaining three regions were detected for the first time. DNA sections containing SNPs linked to the tuber's eye depth were studied in the SolTub_3.0 potato genome assembly (<https://plants.ensembl.org/>). KASP markers were developed based on the data obtained. It will be possible to screen the breeding material and to breed the varieties more effectively using current markers associated with a shallow tuber's eye depth.

Key words: GWAS; SNP; potato; eye depth.

For citation: Totksy I.V., Rozanova I.V., Safonova A.D., Batov A.S., Gureeva Yu.A., Kochetov A.V., Khlestkina E.K. Genomic regions of *Solanum tuberosum* L. associated with the tuber eye depth. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(5):465-473. DOI 10.18699/VJ20.638

Введение

Картофель *Solanum tuberosum* L. – важнейшая продовольственная культура. Это перекрестноопыляемый вид, его геном является автотетраплоидным и отличается высоким уровнем гетерозиготности, что затрудняет генетический анализ и селекционный процесс (Prashar et al., 2014). Сорты картофеля размножаются вегетативно ввиду низкой фертильности и невозможности созревания плодов в климатических условиях многих стран. Такой характер размножения позволяет сохранять целостность генома сортов картофеля, несмотря на их гетерозиготное состояние.

Картирование генов и локусов количественных признаков (QTL) автотетраплоидного картофеля при использовании двуродительских популяций – сложная задача. При таком методе автотетраплоидное состояние генома предполагает получение многочисленного потомства, что затруднено в связи с низкой фертильностью большинства сортов картофеля, которые обычно размножаются вегетативно. Эти ограничения зачастую обходят путем получения диплоидных форм картофеля, в том числе межвидовых гибридов, уменьшая, таким образом, необходимые объемы потомства при проведении картирования. Для более эффективного применения данной методики нужно отбирать образцы с высокой фертильностью. Все это, в свою очередь, ограничивает использование селекционных сортов картофеля при картировании генов и локусов количественных признаков. Однако возможность применения полногеномного анализа ассоциаций (GWAS) с развитием методов высокопроизводительного секвенирования и генотипирования (в том числе в виде разработанных SNP-чипов) позволила активизировать работы по выявлению локусов, контролирующих количественные признаки, и избежать трудностей, возникающих при их картировании. По сравнению с другими перекрестноопыляемыми растениями, именно вегетативный способ размножения культивируемых форм картофеля дал возможность легко адаптировать метод GWAS для генетического анализа этой культуры с некоторыми модификациями, учитывающими автотетраплоидную природу и гетерозиготность генома картофеля (Prashar et al., 2014; Khlestkin et al., 2019).

Глубина залегания глазков клубня – важный признак, влияющий на пригодность сортов картофеля для переработки. От глубины залегания глазков зависит объем потерь при очистке, который не должен быть выше 15% (Земцова, Тимофеева, 2011), и, соответственно, этот признак влияет на стоимость очистки при переработке. Исходя из условий получения минимальных отходов при механизированной, абразивной очистке, глубина залегания глазков у клубней должна быть не более 1.5 мм (Пшеченков, Мальцев, 2011). Оценку глубины залегания глазков проводят с примени-

ем различных шкал. В ряде исследований использованы шкалы, разделенные на три-девять классов (Li et al., 2005; Prashar et al., 2014; Hara-Skrzypiec et al., 2018).

Первые исследования по генетике глубины залегания глазков осуществлены в начале двадцатого века. R.N. Salaman (1910) выявил, что глубокие глазки доминируют над мелкими. Позже W. Black (1930) также предположил, что глубина залегания глазков контролируется генетическими факторами. Однако он выдвинул гипотезу о том, что этот признак имеет промежуточный тип наследования или неполное доминирование, когда крайние фенотипы (очень глубокие и мелкие глазки), вероятно, гомозиготные, а промежуточные (средняя глубина залегания глазков) – гетерозиготные. В. Maris (1966) признал возможным, что глубина залегания глазков контролируется одним основным геном, имеющим кумулятивный эффект. Некоторые авторы сообщали, что мелкие глазки являются доминирующими (Howard, 1974). Н. Kukimura (1972) и Н.В. Howard (1974) указывали, что при скрещивании двух образцов с мелкими глазками в расщеплении могут появиться образцы с глубокими и средними глазками. Исследования с использованием генетического маркирования показали, что существует главный локус, контролирующий признак «глубина залегания глазков» (Li et al., 2005). Эти работы также демонстрировали, что признак глубокого залегания глазков (Eud) доминирует над мелкими глазками (eud). Локус Eud/eud, отвечающий за глубину залегания глазков, расположен на хромосоме 10 (Li et al., 2005).

W. Black (1930) впервые допустил, что глубина залегания глазков в значительной степени зависит от условий окружающей среды. Высокую подверженность этого признака изменениям под воздействием факторов окружающей среды продемонстрировал В. Maris (1966). Однако Н.В. Howard (1974) утверждал, что глубина залегания глазков определяется в основном генотипом. Позже в ряде исследований также были обнаружены высокая наследуемость глубины залегания глазков (Gopal et al., 1992; Love et al., 1997; da Silva et al., 2014; Ney et al., 2016) и незначительное влияние окружающей среды (Love et al., 1997). Другие ученые показывают, что генотип наиболее сильно влияет на признак, однако воздействие факторов окружающей среды также высоко (Hara-Skrzypiec et al., 2018). В ряде работ выявлена способность глубины залегания глазков изменяться при соматической изменчивости (Evans et al., 1986; Thieme, Griess, 2005).

В традиционной селекции глубина залегания глазков оценивается в первом поколении после скрещивания. Однако клубни гибридов, выросшие из ботанических семян, обладают слишком мелким размером, и в таком случае затруднительно адекватно оценить глубину за-

легания глазков. Для решения этой проблемы можно использовать ДНК-маркеры, которые позволят провести отбор на этапе первого поколения и уменьшить объемы последующих исследований.

Целью настоящего исследования был поиск локусов, ассоциированных с глубиной залегания глазков, путем анализа сортообразцов картофеля *S. tuberosum* из коллекции ГенАгро Института цитологии и генетики (ИЦиГ) СО РАН, генотипированных с помощью ДНК-чипа Illumina 22K SNP potato array.

Материалы и методы

Растительным материалом для фенотипирования были 88 сортообразцов картофеля из коллекции ГенАгро ИЦиГ СО РАН (табл. 1). Большую часть коллекции картофеля составляли сорта и гибриды отечественной селекции, часть коллекции была представлена сортами, созданными в ближнем и дальнем зарубежье (Украина, Германия, Китай и др.).

Растения выращивали в полевых условиях на двух участках на территории пос. Мичуринский Новосибирской области с мая по август 2017 г.

Испытания проводили по следующей схеме: количество рядков для каждого генотипа – 2; количество растений в рядке – 10 шт.; длина рядка – 3 м; расстояние между рядами – 0.75 м; расстояние между растениями в рядах – 0.30 м; способ посадки – вручную по бороздам, заделка борозд бородами; срок посадки – третья декада мая.

Агрохимическая характеристика почвы: содержание обменного калия 110.00 мг/кг; сумма обменных оснований 24.19 мг-экв/100 г; гидролитическая кислотность 3.23 мг-экв/100 г; обменная кислотность 5.60 мг-экв/100 г; содержание гумуса 2.67 %; содержание подвижного фосфора 5.14 мг/кг; степень насыщенности основаниями (V) 88.20 %.

Метеорологические условия вегетационного периода (по месяцам):

Май. Температура воздуха: среднее многолетнее 10.90 °С; средняя за месяц 12.60 °С; сумма эффективных температур 197.60 °С. Осадки: среднее многолетнее 37.00 мм; сумма за месяц 33.90 мм.

Июнь. Температура воздуха: среднее многолетнее 16.90 °С; средняя за месяц 19.30 °С; сумма эффективных температур 576.00 °С. Осадки: среднее многолетнее 55.00 мм; сумма за месяц 71.90 мм.

Июль. Температура воздуха: среднее многолетнее 19.40 °С; средняя за месяц 18.50 °С; сумма эффективных температур 1004.00 °С. Осадки: среднее многолетнее 61.00 мм; сумма за месяц 99.50 мм.

Август. Температура воздуха: среднее многолетнее 16.20 °С; средняя за месяц 16.80 °С; сумма эффективных температур 1408.00 °С. Осадки: среднее многолетнее 67.00 мм; сумма за месяц 65.60 мм.

Оценка глубины залегания глазков проведена в 2017 г. в результате фенотипирования коллекции картофеля сотрудниками лаборатории селекции, семеноводства и технологии возделывания овощных культур и картофеля Сибирского научно-исследовательского Института растениеводства и селекции в соответствии с методикой Всероссийского института генетических ресурсов растений

им. Н.И. Вавилова (Киру и др., 2010). Глубина залегания глазков определялась по шкале от 1 до 3: 1 – мелкая (менее 1–1.3 мм), 2 – средняя (1.4–1.6 мм), 3 – глубокая (более 1.7 мм). Измеряли пять типичных глазков клубня картофеля. Результаты сравнивали с оценкой глубины глазков, представленной в базе данных Государственного реестра селекционных достижений, допущенных к использованию (<http://gossortrf.ru/gosreestr.html>), и характеристиками из европейской базы данных культурного картофеля (<https://www.europotato.org/>).

Для генотипирования ДНК выделяли из кожуры клубней картофеля с использованием набора DNeasy Plant Mini (Qiagen, CA, США) согласно протоколу производителя. Концентрация и чистота тестируемых образцов была определена с помощью гель-электрофореза и с использованием аппарата Nanodrop 2000.

Все 88 сортов были генотипированы с использованием ДНК-чипа Illumina 22K SNP potato array (GGP Potato V3) в компании Traitgenetics GmbH (Гатерслебен, Германия).

Набор данных, состоявший из 21 226 SNP, был отфильтрован с применением программного обеспечения Excel. Были удалены данные низкого качества, все мономорфные маркеры и маркеры, содержащие больше чем 95 % одного аллеля. В дальнейший анализ было взято 15214 (71.7 %) SNP. Хромосомная позиция для SNP была определена по (Vos et al., 2015).

Анализ ассоциаций между глубиной залегания глазков и геномом проведен с применением программного пакета Tassel 5.2.59 (Bradbury et al., 2007). Использована обобщенная линейная модель (GLM) с учетом популяционной структуры (Q). Популяционную структуру коллекции анализировали в предыдущих работах (Khlestkin et al., 2019) посредством программы STRUCTURE v 2.3.4 (Pritchard et al., 2000), на основе данных всех 15214 маркеров, взятых для дальнейшего анализа.

Так как программный пакет TASSEL был разработан для анализа геномов диплоидных видов, для его применения к тетраплоидному геному данные были перекодированы в цифровой формат с учетом представленности эффекторного аллеля (Khlestkin et al., 2019).

Значимость ассоциаций определяли с помощью двух критериев: поправки Бонферрони – деления статистического уровня значимости (0.05) на общее число испытаний, в нашем случае на количество маркеров (15214), равной $3.28 \cdot 10^{-6}$, и критерия Бенджамини–Хохберга (Benjamini, Hochberg, 1995) (false discovery rate, FDR). Значимыми с учетом поправки метода Бенджамини–Хохберга в данном случае считались только те SNP, значение *p*-value (FDR) которых не превышало порогового значения 0.05.

Разработку KASP-маркеров и генотипирование 86 сортов с их использованием проводили в компании LGC Genomics LLC (Теддингтон, Великобритания). Участки ДНК размером 100 н. п., содержащие SNP, ассоциированные с признаком «глубина залегания глазков», были конвертированы в KASP-маркеры (Приложение 1)¹. Данные о нуклеотидном составе этих участков представлены в сборке генома картофеля SolTub_3.0 (<https://plants.ensembl.org/>). В дальнейшем с помощью разработанных

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу:
<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2020-24/appx6.pdf>

Таблица 1. Результаты оценки глубины залегания глазков клубня картофеля

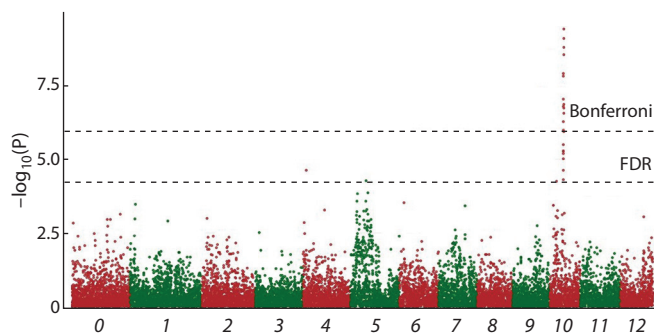
№ п/п	Название сортаобразца	Глубина залегания глазков	№ п/п	Название сортаобразца	Глубина залегания глазков
1	785/8-5	Средняя	45	Любава	Средняя
2	Агата	Мелкая	46	Люкс	Мелкая
3	Алёна	Средняя	47	Марет	Средняя
4	Антонина	»	48	Матушка	Мелкая
5	Арлекин	»	49	Метеор	Средняя
6	Бабушка	Мелкая	50	Милавица	»
7	Божедар	Глубокая	51	Монализа	Мелкая
8	Браво	Средняя	52	Накра	Средняя
9	Василёк	Мелкая	53	Наяда	Мелкая
10	Великан	Средняя	54	Невский	»
11	Вираз	»	55	Никулинский	»
12	Вымпел	»	56	Новосибирский	Глубокая
13	Г 06-08-2015	»	57	Памяти Осиповой	»
14	Г 3-43-2	Мелкая	58	Памяти Рогачёва	Мелкая
15	Г 3-43-6	Средняя	59	Пикассо	»
16	Гала	Мелкая	60	Радонежский	Средняя
17	Голубизна	»	61	Регги	Мелкая
18	Горняк	»	62	Ред Скарлет	»
19	Гранат	Средняя	63	Редстар	»
20	Гранола	Мелкая	64	Руслан	»
21	Гулливер	»	65	Русский сувенир	»
22	Гусар	»	66	С-112-03 (Дочка)	»
23	Дебрянский	Средняя	67	Самба	»
24	Ди Джон 12	Глубокая	68	Сантэ	»
25	Диамант	Мелкая	69	Саровский	Средняя
26	Жаворонок	Средняя	70	Сафо	Мелкая
27	Жигулёвский	Мелкая	71	Свитанок киевский	»
28	Жуковский ранний	»	72	Сельма	»
29	Загадка	Средняя	73	Скала	»
30	Зекура	Мелкая	74	Солнечный	Средняя
31	Зизелла	Средняя	75	Старт	Мелкая
32	Златка	»	76	Стигния	»
33	Ильинский	»	77	Сударыня	Средняя
34	Импала	Мелкая	78	Танай	Мелкая
35	Ирбитский	»	79	Танго	Средняя
36	Кемеровчанин	Средняя	80	Тулеевский	Мелкая
37	Клада	Мелкая	81	Удача	»
38	Колобок	Глубокая	82	Фаворит	»
39	Кортни	»	83	Фиолетовый	Средняя
40	Крепыш	Средняя	84	Фрителла	Мелкая
41	Кузнечанка	»	85	Хозяюшка	»
42	Ладожский	»	86	Чароит	»
43	Лина	»	87	Югана	»
44	Ломоносовский	Мелкая	88	Юна	»

KASP-маркеров можно будет более эффективно вести скрининг селекционного материала и селекцию сортов с мелким залеганием глазков.

Результаты

Фенотипирование, осуществленное на 88 образцах коллекции, показало, что 49 образцов имели малую глубину залегания глазков. Значительную часть коллекции составляли образцы со средней глубиной залегания глазков – 33 генотипа. Образцы с глубокими глазками представляли малую часть выборки – всего шесть сортообразцов (см. табл. 1).

Ассоциативный анализ данных с использованием GLM и учетом популяционной структуры позволил выявить 24 SNP, значимо связанных с глубиной залегания глазков клубня (табл. 2, см. рисунок). После применения множественной тестовой коррекции Бонферрони при 5 %



Манхэттен график, показывающий значимые SNP, сцепленные с глубиной залегания глазков, при использовании анализа GLM с учетом популяционной структуры.

1–12 – обозначения хромосом; 0 – маркеры с неопределенной хромосомной локализацией.

Таблица 2. Связанные с глубиной залегания глазков SNP, найденные с помощью анализа GLM

№	Маркер	Хромосома	Физическое положение на хромосоме (п. н.)	<i>p</i>	FDR	Алтели
1	PotVar0111687*	10	48721966	3.99E-10	6.06917E-06	T/C
2	solcap_snp_c2_25485*	10	48737840	8.22E-10	6.25189E-06	A/G
3	solcap_snp_c1_8019*	10	48863165	1.62E-09	8.21252E-06	A/G
4	solcap_snp_c2_25471*	10	48808404	2.90E-09	1.10302E-05	A/G
5	solcap_snp_c2_25526*	10	48617149	1.27E-08	3.85736E-05	A/G
6	solcap_snp_c2_25522*	10	48617457	1.53E-08	3.87577E-05	T/C
7	solcap_snp_c2_25532*	10	48591792	9.29E-08	0.000201844	C/G
8	solcap_snp_c1_8021*	10	48862950	1.41E-07	0.00026906	A/G
9	solcap_snp_c2_25529*	10	48593621	1.62E-07	0.000273091	T/G
10	solcap_snp_c1_16351*	10	48761642	1.86E-07	0.000282357	T/C
11	solcap_snp_c2_55948*	10	48982352	2.80E-07	0.000387016	A/G
12	solcap_snp_c2_25528*	10	48616808	5.26E-07	0.000667235	T/C
13	solcap_snp_c2_25527*	10	48616993	1.05E-06	0.001228589	A/G
14	solcap_snp_c2_25469*	10	48808653	1.21E-06	0.001315794	A/G
15	solcap_snp_c2_45611*	10	48203431	3.15E-06	0.003191491	A/G
16	solcap_snp_c2_25530	10	48593576	5.13E-06	0.004875707	T/C
17	solcap_snp_c1_13531	10	48149384	5.48E-06	0.004901056	A/G
18	solcap_snp_c2_45606	10	48218826	6.41E-06	0.005414409	A/G
19	solcap_snp_c2_25523	10	48617343	9.66E-06	0.007735919	T/A
20	PotVar0106879	4	3916249	2.40E-05	0.01823474	T/C
21	solcap_snp_c2_49532	10	48443334	2.40E-05	0.017394673	A/C
22	solcap_snp_c2_45612	10	48203384	4.93E-05	0.034120853	T/C
23	solcap_snp_c2_23017	5	4670373	5.39E-05	0.035637141	T/C
24	PotVar0107893	10	4870467	5.45E-05	0.034526271	A/G

Примечание. 1–15* – SNP, значимые при использовании множественной тестовой коррекции Бонферрони при 5 % ($p < 3.28 \cdot 10^{-6}$); 16–24 – SNP, значимые при использовании FDR.

Таблица 3. Соответствие аллельного состояния маркера и фенотипического проявления глубины залегания глазков

№ п/п	Маркер	Аллели	Глазки		
			мелкие	средние	глубокие
1	PotVar0111687	4 C	0	0	1
		C+T	38	29	5
		4 T	10	2	0
2	solcap_snp_c2_25526	4 C	0	0	0
		C+T	37	28	6
		4 T	11	4	0
3	solcap_snp_c1_16351	4 C	0	0	1
		C+T	35	29	4
		4 T	13	3	0
4	solcap_snp_c2_55948	4 C	0	0	1
		C+T	34	28	5
		4 T	14	3	0
5	solcap_snp_c1_8019	4 G	0	0	1
		G+A	36	30	5
		4 A	10	1	0
6	solcap_snp_c2_25471	4 G	0	0	1
		G+A	38	31	5
		4 A	10	1	0
7	solcap_snp_c2_25522	4 A	0	0	1
		G+A	38	29	5
		4 G	10	3	0
8	solcap_snp_c2_25528	4 A	0	0	1
		G+A	34	27	5
		4 G	14	5	0
9	solcap_snp_c2_25469	4 A	0	0	1
		G+A	33	28	4
		4 G	15	4	1
10	solcap_snp_c2_25529	4 A	0	0	1
		C+A	33	27	4
		4 C	15	5	1
11	solcap_snp_c2_25527	4 T	0	0	1
		C+T	33	28	4
		4 C	14	4	1

Примечание. Полужирным шрифтом выделены гаплотипы, предсказывающие мелкое залегание глазков.

($p < 3.28 \cdot 10^{-6}$) только 15 из 24 SNP оставались значимы для глубины залегания глазков клубня, остальные 9 SNP сохраняли значимость только при использовании критерия FDR ($p < 0.05$).

Ассоциированные с глубиной залегания глазков SNP обнаружены в четырех геномных регионах, два из которых находятся на хромосоме 10. Значимые при использовании множественной тестовой коррекции Бонферрони ($p < 3.28 \cdot 10^{-6}$), SNP располагались на одном из двух локусов хромосомы 10. Значимые с использованием FDR ($p < 0.05$) SNP встречаются во всех четырех локусах на

хромосомах 10, 4 и 5. На хромосомах 4 и 5 располагалось только по одному значимому SNP. На хромосоме 10 21 SNP находился на относительно небольшом участке между 48.1 и 48.9 Мб. Еще один SNP был локализован в другом районе хромосомы 10 на позиции 4.87 Мб (этот SNP значим при использовании FDR).

Наиболее значимый SNP PotVar0111687 относится к некодирующей последовательности. Из 18 значимых SNP 6 находятся в некодирующих районах генома, а 11 – в последовательностях, кодирующих белки. Аннотация генов, содержащих значимые SNP, приведена в Приложении 2.

Ввиду отсутствия точной информации по генетическому контролю глубины залегания глазков оказалось затруднительным однозначно связать выявленные гены с формированием глубины залегания глазков.

Результаты анализа KASP-генотипирования

KASP-генотипирование проводили с использованием 11 KASP-маркеров, разработанных на основе значимых при использовании множественной тестовой коррекции Бонферрони SNP, которые были сцеплены с глубиной залегания глазков и располагались на хромосоме 10 между 48.1 и 48.9 Мб (табл. 3). Восемь маркеров коррелировали с глубиной залегания глазков, а точнее, гомозиготное состояние одного из аллелей данных маркеров коррелирует с мелким залеганием глазков.

Гаплотип, на 100 % предсказывающий мелкое залегание глазков: PotVar0111687 (гомозигота по T), solcap_snp_c2_25526 (гомозигота по T), solcap_snp_c1_16351 (гомозигота по T), solcap_snp_c2_55948 (гомозигота по T), solcap_snp_c1_8019 (гомозигота по A), solcap_snp_c2_25471 (гомозигота по A), solcap_snp_c2_25522 (гомозигота по G), solcap_snp_c2_25528 (гомозигота по G). Носители этого гаплотипа – сорта Василек, Гулливер, Люкс, Матушка, Няяда, Дочка, Тулеевский, Фаворит, Чароит.

Обсуждение

В работе (Li et al., 2005) проведено генетическое картирование локуса, отвечающего за глубину залегания глазков. В результате локус *Eud* был картирован на хромосоме 10 проксимальнее маркера CT240 (12 сМ) и дистальнее маркера STM0051 (13 сМ). Это позволяет рассчитать расстояние между маркерами CT240 и STM0051, которое составляет 25 сМ. BLAST-анализ последовательностей этих маркеров показывает позицию CT240 в районе 51 Мб, а STM0051 – в районе 23.4 Мб. Можно предположить, что найденный нами на хромосоме 10 локус, расположенный в пределах между 48.1 и 48.9 Мб, соответствует гену *Eud*. В ряде работ (Śliwka et al., 2008; Prashar et al., 2014; Rosyara et al., 2016; и др.) в этом районе регулярно выявлялся локус, сцепленный с глубиной залегания глазков.

Так, А. Prashar с коллегами (2014) с применением чипа Infinium 8303 Potato Array, имеющего 8303 маркера однонуклеотидного полиморфизма (SNP), составляли генетическую карту диплоидного картофеля. После отбора наиболее ценных SNP карта содержала 1355 различных локусов и 2157 SNP. В их работе показано, что основной локус для глубины залегания глазков клубня расположен на хромосоме 10 (SNP: c1_8020) и сцеплен с локусом формы клубня. Этот SNP локализован на хромосоме 10 в районе 48.8 Мб, так же как выявленный нами локус 4. Исследователи обнаружили два SNP, сцепленных с глубиной залегания глазков на хромосомах 2 (c2_7422) и 3 (c2_37119), которые были не столь значимы и, вероятнее всего, могли иметь вспомогательное действие (Prashar et al., 2014).

U.R. Rosyara с коллегами (2016) также использовали GWAS для поиска SNP, сцепленных с глубиной залегания глазков. В их исследовании ДНК-чип имел 3.5 тыс. маркеров. В этой работе SNP, высоко значимый для глубины залегания глазков (совпадающий с локусом, установлен-

ным А. Prashar с коллегами (2010), и локусом 4, выявленным в нашей работе), находился на позиции 48.9 Мб на хромосоме 10. Менее значимый SNP, который также был сцеплен с глубиной залегания глазков клубня, c2_11685, был на хромосоме 5 в позиции 2.3 Мб. В нашей работе также был обнаружен SNP, ассоциированный с глубиной залегания глазков, расположенный на хромосоме 5, но в другом районе – 4.7 Мб.

В работе Н. Lindqvist-Kreuzе с коллегами (2015) на хромосоме 10 в позиции 49.4 Мб выявлен QTL, отвечающий за глубину залегания глазков клубня картофеля, и еще один локус на хромосоме 12. Исследователи идентифицировали ряд генов-кандидатов, лежащих в основе значимого QTL и сцепленных с глубиной залегания глазков. Один из них – BEL-1-подобный ген гомеобокса, обнаруженный на расстоянии 1.37 Мб от QTL-маркера toPt-437059 на хромосоме 10. Второй – ген α -экспансина, который был идентифицирован в области значимого QTL на хромосоме 10 на расстоянии 1.78 Мб от QTL-маркера toPt-437059. Некоторые гены, связанные с продукцией и модификацией пектинов, выявлены в непосредственной близости от маркера toPt-437059 на хромосоме 10.

А. Hara-Skrzybiec с коллегами (2018) также составляли генетическую карту картофеля для ряда признаков, в том числе и для глубины залегания глазков. Они выявили семь QTL, сцепленных с глубиной залегания глазков: по одному на хромосомах 1, 4 и 11 и по два на хромосомах 3 и 5. Однако, в отличие от других исследований, основной, наиболее значимый QTL находился на хромосоме 4 (в позиции 68.8 Мб) и объяснял 22.6 % дисперсии в среднем наборе данных. Мы обнаружили в нашем исследовании значимый SNP PotVar0106879, расположенный на хромосоме 4 в позиции 3.9 Мб.

Таким образом, ключевой локус, отвечающий за глубину залегания глазков, находится на хромосоме 10, тогда как локусы с минорным эффектом – на хромосомах 1, 2, 3, 4, 5, 11 и 12, а также на других участках хромосомы 10.

Заключение

Несмотря на широкий спектр генетических исследований признака «глубина залегания глазков клубней картофеля» и идентификацию генов и локусов, ассоциированных с изменчивостью по этому признаку, в селекции картофеля на глубину залегания глазков до сих пор не применяются ДНК-маркеры. Между тем использование диагностических ДНК-маркеров позволяет как более эффективно вести пребридинговые исследования – проводить скрининг генетических ресурсов картофеля для идентификации доноров ценных аллельных вариантов, так и осуществлять маркер-контролируемый отбор в селекционных программах (Gebhardt et al., 2006; Клименко и др., 2017, 2019; Chen et al., 2017).

Нам удалось разработать ряд новых ПЦР-маркеров, которые могут быть удобными для скрининга генетических ресурсов картофеля и селекционного материала. После дополнительной проверки этих маркеров на расширенной выборке с их помощью можно будет осуществлять отбор путем анализа на уровне ДНК. Отобранные нами ПЦР-маркеры расположены на хромосоме 10 на позициях между 48.62 и 48.98 Мб. Эти данные совпадают с резуль-

татами других исследователей по локализации предполагаемого гена, отвечающего за глубину залегания глазков, однако за счет большего количества обнаруженных нами маркеров позволяют уточнить локализацию интересующего нас гена и предположить, что он расположен на позиции между 48.0 и 49.0 Мб. Оптимальным, по нашим данным, является отбор по гаплотипу 8 SNP хромосомы 10 (PotVar0111687 (гомозигота по T), solcar_snp_c2_25526 (гомозигота по T), solcar_snp_c1_16351 (гомозигота по T), solcar_snp_c2_55948 (гомозигота по T), solcar_snp_c1_8019 (гомозигота по A), solcar_snp_c2_25471 (гомозигота по A), solcar_snp_c2_25522 (гомозигота по G), solcar_snp_c2_25528 (гомозигота по G)). Носители этого гаплотипа – сорта Василек, Гулливер, Люкс, Матушка, Няда, Дочка, Тулеевский, Фаворит, Чаронт – характеризуются мелким залеганием глазков. Использование этих сортов в качестве доноров данного признака, являющихся вместе с тем донорами и ряда других ценных свойств, в сочетании с ПЦР-анализом потомства для выбора носителей соответствующего гаплотипа обеспечит более экономичный и ускоренный способ создания картофеля с мелким залеганием глазков клубней.

Список литературы / References

- Земцова М.А., Тимофеева И.И. Технологическая оценка сортов картофеля на пригодность для переработки на хрустящий картофель и картофель «фри». *Защита картофеля*. 2011;1:17-20. [Zemtcova M.A., Timofeeva I.I. Technological assessment of potato varieties for suitability for conversion to crisps and French fries. *Zaschita Kartofelya = Potato Protection*. 2011;1:17-20. (in Russian)]
- Киру С.Д., Костина Л.И., Трускинов Э.В., Зотеева Н.М., Рогозина Е.В., Королева Л.В., Фомина В.Е., Палеха С.В., Косарева О.С., Кирилов Д.А. Методические указания по поддержанию и изучению мировой коллекции картофеля. СПб., 2010. [Kiru S.D., Kostina L.I., Truskinov E.V., Zoteeva N.M., Rogozina E.V., Koroleva L.V., Fomina V.E., Palekha S.V., Kosareva O.S., Kirilov D.A. Guidelines on the Maintenance and Study of the World Potato Collection. St. Petersburg, 2010. (in Russian)]
- Клименко Н.С., Антонова О.Ю., Костина Л.И., Мамадбокирова Ф.Т., Гавриленко Т.А. Маркер-опосредованная селекция отечественных сортов картофеля с маркерами генов устойчивости к золотистой картофельной нематоде (патотип Ro1). *Труды по прикл. ботан., генет. и селекции*. 2017;178(4):66-75. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2017-4-66-75>. [Klimenko N.S., Antonova O.Yu., Kostina L.I., Mamadbokirova F.T., Gavrilenko T.A. Marker-associated selection of Russian potato varieties with using markers of resistance genes to the golden potato cyst nematode (pathotype Ro1). *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2017;178(4):66-75. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2017-4-66-75>. (in Russian)]
- Клименко Н.С., Гавриленко Т.А., Костина Л.И., Мамадбокирова Ф.Т., Антонова О.Ю. Поиск источников устойчивости к *Globodera pallida* и к PVX в коллекции отечественных сортов картофеля с использованием молекулярных маркеров. *Биотехнология и селекция растений*. 2019;2(1):42-48. DOI 10.30901/2658-6266-2019-1-42-48. [Klimenko N.S., Gavrilenko T.A., Kostina L.I., Mamadbokirova F.T., Antonova O.Y. Search for resistance sources to *Globodera pallida* and potato virus X in the collection of potato varieties using molecular markers. *Biotechnologiya i Seleksiya Rasteniy = Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(1):42-48. DOI 10.30901/2658-6266-2019-1-42-48. (in Russian)]
- Пшеченков К.А., Мальцев С.В. Оценка сортов картофеля селекции ВНИИХ на пригодность к промпереработке. *Защита картофеля*. 2011;1:38-40. [Pshechenkov K.A., Mal'tsev S.V. Assessment of potato varieties bred at the All-Russia Institute of Potato Industry for suitability for industrial processing. *Zashhita Kartofelya = Potato Protection*. 2011;1:38-40. (in Russian)]
- Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Stat. Methodol.* 1995;57(1):289-300.
- Black W. Notes on the progenies of various potato hybrids. *J. Genet.* 1930;22(1):27-43. DOI 10.1007/BF02983366.
- Bradbury P.J., Zhang Z., Kroon D.E., Casstevens T.M., Ramdoss Y., Buckler E.S. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*. 2007;23:2633-2635. DOI 10.1093/bioinformatics/btm308.
- Chen S., Borza T., Byun B., Coffin J., Peters R., Wang-Pruski G. DNA markers for selection of late blight resistant potato breeding lines. *Am. J. Plant Sci.* 2017;8(6):1197-1209.
- da Silva G.O., Ney V.G., da Silva Pereira A., Terres L.R. Relationships among potato tuber traits in early generations of selection. *Rev. Ceres*. 2014;61(3):370-376. DOI <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2014000300011>.
- Evans N.E., Foulger D., Farrer L., Bright S.W.J. Somaclonal variation in explant-derived potato clones over three tuber generations. *Euphytica*. 1986;35(2):353-361. DOI 10.1007/BF00021843.
- Gebhardt C., Bellin D., Henselewski H., Lehmann W., Schwarzfischer J., Valkonen J.P.T. Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. *Theor. Appl. Genet.* 2006;112:1458-1464.
- Gopal J., Gaur P.C., Rana M.S. Early generation selection for agronomic characters in a potato breeding programme. *Theor. Appl. Genet.* 1992;84(5-6):709-713. DOI 10.1007/BF00224173.
- Hara-Skrzypiec A., Śliwka J., Jakuczun H., Zimnoch-Guzowska E. QTL for tuber morphology traits in diploid potato. *J. Appl. Genet.* 2018;59(2):123-132. DOI 10.1007/s13353-018-0433-x.
- Howard H.W. Factors influencing the quality of ware potatoes. 1. The genotype. *Potato Res.* 1974;17(4):490-511. DOI <https://doi.org/10.1007/BF02362167>.
- Khlestkin V.K., Rozanova I.V., Efimov V.M., Khlestkina E.K. Starch phosphorylation associated SNPs found by genome-wide association studies in the potato (*Solanum tuberosum* L.). *BMC Genet.* 2019;20(1):29. DOI 10.1186/s12863-019-0729-9.
- Kukimura H. Effects of gamma-rays on segregation ratios in potato families. *Potato Res.* 1972;15(2):106-116. DOI 10.1007/BF02355958.
- Li X.Q., De Jong H., De Jong D.M., De Jong W.S. Inheritance and genetic mapping of tuber eye depth in cultivated diploid potatoes. *Theor. Appl. Genet.* 2005;110(6):1068-1073. DOI 10.1007/s00122-005-1927-6.
- Lindqvist-Kreuzer H., Khan A., Salas E., Meiyalaghan S., Thomson S., Gomez R., Bonierbale M. Tuber shape and eye depth variation in a diploid family of Andean potatoes. *BMC Genet.* 2015;16:57. DOI 10.1186/s12863-015-0213-0.
- Love S.L., Werner B.K., Pavak J.J. Selection for individual traits in the early generations of a potato breeding program dedicated to producing cultivars with tubers having long shape and russet skin. *Am. Potato J.* 1997;74(3):199-213. DOI 10.1007/BF02851598.
- Maris B. The modifiability of characters important in potato breeding. *Euphytica*. 1966;15(1):18-31. <https://doi.org/10.1007/BF00024076>.
- Ney V.G., Terres L.R., da Silva G.O., da Silva Pereira A. Expected response to early-generation selection for yield and tuber appearance traits in potatoes. *Semin. Cienc. Agrar.* 2016;37(5):2849-2857. DOI 10.5433/1679-0359.2016v37n5p2849.
- Prashar A., Hornyik C., Young V., McLean K., Sharma S., Dale M.F., Bryan G.J. Construction of a dense SNP map of a highly heterozygous diploid potato population and QTL analysis of tuber shape

- and eye depth. *Theor. Appl. Genet.* 2014;127(10):2159-2171. DOI 10.1007/s00122-014-2369-9.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 2000;155(2):945-959.
- Rosyara U.R., De Jong W.S., Douches D.S., Endelman J.B. Software for genome-wide association studies in autopolyploids and its application to potato. *Plant Genome.* 2016;9(2). DOI 10.3835/plantgenome2015.08.0073.
- Salaman R.N. The inheritance of colour and other characters in the potato. *J. Genetics.* 1910;1(1):7-46. DOI <https://doi.org/10.1007/BF02981567>.
- Śliwka J., Wasilewicz-Flis I., Jakuczun H., Gebhardt C. Tagging quantitative trait loci for dormancy, tuber shape, regularity of tuber shape, eye depth and flesh colour in diploid potato originated from six *Solanum* species. *Plant Breed.* 2008;127(1):49-55. DOI 10.1111/j.1439-0523.2008.01420.x.
- Thieme R., Griess H. Somaclonal variation in tuber traits of potato. *Potato Res.* 2005;48(3-4):153-165. DOI 10.1007/BF02742373.
- Vos P.G., Uitdewilligen J.G.A.M.L., Voorrips R.E., Visser R.G.F., van Eck H.J. Development and analysis of a 20K SNP array for potato (*Solanum tuberosum*): an insight into the breeding history. *Theor. Appl. Genet.* 2015;128(12):2387-2401. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2593-y>.

ORCID ID

I.V. Totsky orcid.org/0000-0001-5565-9097
A.V. Kochetov orcid.org/0000-0003-3151-5181
E.K. Khlestkina orcid.org/0000-0002-8470-8254

Благодарности. Исследование фенотипических характеристик сортов картофеля в полевых условиях и в теплице поддержано бюджетным проектом Института цитологии и генетики СО РАН (проект № 0259-2019-0011). Анализ генетических ассоциаций проведен в рамках Комплексного плана научных исследований «Развитие картофелеводства и семеноводства». Разработка новых аллель-специфических маркеров выполнена в рамках Российского научного фонда (проект № 16-16-04073).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 02.12.2019. После доработки 12.05.2020. Принята к публикации 13.05.2020.