

Генетическая паспортизация картофеля на основе мультиплексного анализа 10 микросателлитных маркеров

О.С. Колобова¹✉, О.П. Малюченко¹, Т.В. Шалаева¹, Е.П. Шанина², И.А. Шилов¹, Я.И. Алексеев¹, Н.С. Велишаева¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Уральский научно-исследовательский институт сельского хозяйства», пос. Исток, Екатеринбург, Россия

Генетическая паспортизация сортов картофеля является востребованным инструментом для усовершенствования системы регистрации и сертификации, защиты прав селекционеров и контроля генетической однородности сортов. Наиболее перспективным подходом для различения и идентификации сортов на генетическом уровне продолжает оставаться использование микросателлитных маркеров на основе коротких tandemных повторов STR. Их амплификация с последующим электрофорезом высокого разрешения позволяет получить индивидуальную характеристику сорта – ДНК-профиль. При анализе большого количества образцов методика получения генетических профилей требует создания мультиплексных систем фрагментного анализа, что повышает требования как к отбору маркеров, так и к протоколу анализа. Для генотипирования сортов картофеля были отобраны 10 информативных STR-маркеров: STI0032, STG0016, STI0001, STI0004, STM1104, STM5127, STI0030, STI0033, STI0014, STM5114, проведен дизайн праймеров с разделением локусов по длинам и флуоресцентным меткам, разработан протокол выделения ДНК из клубней и других частей растений картофеля на основе СТАВ-метода, оптимизирован состав реакционной смеси и условия ПЦР для эффективной мультиплексной амплификации и анализа локусов методом капиллярного электрофореза. Использование генетического анализатора позволяет определять длину аллелей с точностью до одного нуклеотида и получать оцифрованные генетические профили. В исследование были включены 41 сорт отечественной и зарубежной селекции и 26 селекционных образцов. Получены уникальные профили для каждого генотипа, позволяющие различать и идентифицировать сорта и сортообразцы, для 8 сортов проведена оценка однородности. Предложенная методика генетической паспортизации позволяет провести анализ большого количества образцов в формате 96-луночного планшета в короткие сроки.

Ключевые слова: *Solanum*; картофель; фрагментный анализ; STR; генетическая идентификация.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

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

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

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. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):124-127. DOI 10.18699/VJ17.230

УДК 633.491:575.174.015.3

Поступила в редакцию 09.01.2017 г.

Принята к публикации 24.01.2017 г.

© АВТОРЫ, 2017

Multiplexed set of 10 microsatellite markers for identification of potato varieties

O.S. Kolobova¹✉, O.P. Maluchenko¹, T.V. Shalaeva¹, E.P. Shanina², I.A. Shilov¹, Ya.I. Alekseev¹, N.S. Velishaeva¹

¹ All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

² Ural Research Institute of Agricultural Science, Istok, Ekaterinburg, Russia

Genetic identification of potato varieties is a demanded instrument for development of new cultivars registration system, protection of plant breeders' rights, and variety homogeneity control. The most perspective approach for distinction and identification of varieties continues to remain the use of short tandem repeats. STR amplification with the subsequent high resolution electrophoresis allows such a unique characteristic of a variety to be obtained as the DNA profile. A large scale of samples requires the creation of a robust and time-saving technique based on fragment sizing. We selected 10 polymorphic STR loci of potato: STI0032, STG0016, STI0001, STI0004, STM1104, STM5127, STI0030, STI0033, STI0014, STM5114 and designed a multiplex panel for potato DNA profiling. Fluorescent labelling of primers and size distinction of amplicons allowed us to use one tube for PCR and capillary electrophoresis. We also modified the CTAB-protocol for DNA extraction from tubers and other parts of potato plants, the PCR mix recipe and the amplification protocol for good results. Using Genetic Analyzer allows the length of alleles to be defined with an accuracy of one nucleotide and digitized genetic profiles to be developed. We created a unique DNA profile for each of 40 varieties and 23 breeding lines from Russia and other countries and evaluated the homogeneity of 8 varieties. The proposed technique of potato DNA profiling allows a large number of samples to be rapidly analyzed in the 96-well plate format.

Key words: *Solanum*; potato; fragment analysis; STR; genetic identification.

На конец 2016 г. в «Государственном реестре селекционных достижений РФ, допущенных к использованию» (2016) находилось 410 сортов картофеля. Разработка методов генетической идентификации расширяет возможности регистрации, экспертизы и защиты прав в селекции и семеноводстве. Особенно актуальными методы генотипирования становятся при идентификации материала, размножаемого и сохраняемого *in vitro*, где морфологические сортовые признаки могут быть неярко выражены (Антонова и др., 2016).

Наиболее удобная и доступная технология генотипирования – использование микросателлитных маркеров на основе коротких tandemных повторов (short tandem repeat – STR). Эффективность этого метода для генотипирования сортов картофеля была неоднократно показана различными авторами (Велишаева и др., 2006; Reid, Kerg, 2007; Gishlan et al., 2009; Рыжова и др., 2010; Есимсеитова и др., 2015; Антонова и др., 2016). Однако предложенные ранее методики получения генетических профилей растений по каждому локусу отдельно являются трудоемкими и дорогостоящими для селекционной и хозяйственной практики, так как требуют большого числа постановок электрофореза с ограниченной емкостью геля и нередко затрудненной интерпретацией вследствие низкого разрешения или артефактов электрофореза. Для доступной и надежной идентификации сортов необходимо создание мультиплексных (определяющих генетический профиль по нескольким локусам одновременно) систем, адаптированных для работы на современном автоматическом оборудовании в формате 96-луночного планшета. Это предъявляет высокие требования к отбору маркеров и разработке технологии анализа.

Чаще всего для генетической идентификации применяются ядерные микросателлиты с три- или тетра-нуклеотидными повторами. Маркер должен содержать достаточное количество (от 2 до 20) простых повторов, иметь высокий уровень полиморфизма (5–8 аллельных состояний), не быть сцепленным с другими маркерами, не давать нуль-аллелей, т.е. отсутствия ПЦР-продукта в качестве признака.

Целью настоящей работы была разработка методики генотипирования сортов картофеля на основе мультилокусного фрагментного анализа с флуоресцентной детекцией, позволяющей быстро и точно проводить анализ большого количества образцов в формате 96-луночного планшета.

Материалы и методы

Исследование проводилось на 41 сорте отечественной и зарубежной селекции и 26 селекционных образцах картофеля, предоставленных Е.П. Шаниной (Уральский НИИСХ), В.И. Бирюковой (ВНИИКХ им. А.Г. Лорха), Ф.Ф. Замалиевой (Татарский НИИСХ): Алмаз, Амур, Барон, Бержерак, Бонни, Бордо, Браво, Вализа, Вега, Взрыв, Гала, Галактика, Горняк, Демон, Айл оф Джура, Инара, Ирбитский, Каменский, Карлингфорд, Катика, Ла Страда, Леон Хайт, Лидер, Люкс, Манхеттен, Маяк, Мишка, Молии, Монреаль, Монте Карло, Оригинал, Отрада, Пароли, Пироль, Рубес, Старт, Табор, Торонто, Чудесник, Эскуиза, Югра. В исследование бралось по три фрагмента биологического материала от разных растений одного сорта.

ДНК была выделена из листьев и клубней СТАВ-методом (Doyle J.J., Doyle J.L., 1987) с нашими модификациями, позволяющими проводить успешную экстракцию из любых частей растений картофеля. Выделение ДНК из молодых зеленых листьев не представляет проблемы, но для листьев в поздних стадиях вегетации и особенно клубней не получалось получить препараты достаточной спектрофотометрической чистоты, что отражалось на результатах амплификации локусов. Замена хлороформа на фенол-хлороформ в протоколе позволила решить эту проблему и получать препараты ДНК с количеством 100–150 нг/мкл и чистотой $A_{260/280}$ 1.8–2.0. Протоколы выделения ДНК, амплификации и фрагментного анализа приведены в Доп. материалах¹. Последовательности праймеров являются интеллектуальной собственностью авторов и предоставляются по запросу. Флуоресцентные метки были введены на 3'-конец обратных праймеров. Дендрограмма построена по методу UPGMA с использованием пакета статистических программ Statistica 6.0. Для создания аллельной лестницы ПЦР-продукты очищали на колонках, используя набор Cleanup Standart (Евроген, Россия), и клонировали с использованием вектора pAL2-T по инструкции к набору Quick-TA kit (Евроген, Россия). Первичную последовательность нуклеотидов определяли на генетическом анализаторе ABI PRISM 3130XL (ЦКП «Биотехнология» ФБГНУ ВНИИСБ).

Результаты и обсуждение

Разными исследователями были рекомендованы панели для генотипирования картофеля, включающие 24 локуса (Gishlan et al., 2009), 12 локусов (Есимсеитова и др., 2015), 14 локусов (Антонова и др., 2016), 9 локусов (Рыжова и др., 2010), 6 локусов (Reid, Kerg, 2007). Однако в этих работах локусы амплифицировались индивидуально и фрагменты анализировались в ПААГ (Велишаева и др., 2006; Рыжова и др., 2010; Есимсеитова и др., 2015) или смешивались и разгонялись попарно на системе генотипирования Li-Cor (Gishlan et al., 2009; Антонова и др., 2016), что создавало проблемы при анализе большого числа образцов. В начале нашего исследования мы выбрали 16 локусов, имеющих наибольший PIC и рекомендованных для генотипирования. По результатам эксперимента на 20 сортах картофеля мы исключили мономорфные, дающие артефакты и плохо амплифицирующиеся локусы и оставили 10 наиболее информативных локусов (см. таблицу).

Анализ 41 сорта картофеля и 26 селекционных образцов обнаружил значительное генетическое разнообразие по исследуемым локусам. Количество выявленных аллелей составляло 5–8 на локус. Поскольку геном картофеля является тетраплоидным, мы получали от 1 до 4 фрагментов ДНК в каждом локусе. Размер аллелей варьировал от 69 до 313 п. н. Все локусы имели четкие профили амплификации без образования статторов – дополнительных пиков, отличающихся на плюс-минус повтор, и других артефактов ПЦР (рис. 1). Основные аллели были секвенированы, подтверждена генетическая структура повторов и выявлен точный размер аллелей. Для проверки вос-

¹ Дополнительные материалы см. в Приложении 3 по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2017-21/appx3.pdf>

Локусы, входящие в систему для мультиплексного генотипирования сортов картофеля

№ п/п	Локус	Краситель	Длина, п. н.	Повтор	Кол-во выявленных аллелей	PIС*	Хромосома
1	STI0032	FAM	69–90	(GAG)n	6	0.699	V
2	STG0016	FAM	120–153	(AGA)n	7	0.761	I
3	STI0001	FAM	175–193	(AAT)n	6	0.645	IV
4	STI0004	R6G	82–109	(AAG)n	6	0.673	VI
5	STM1104	R6G	167–191	(TTC)n	5	0.774	VIII
6	STM5127	R6G	239–269	(CTT)n	5	0.735	I
7	STI0030	ROX	88–121	(AAT)n	8	0.801	XII
8	STI0033	ROX	128–149	(AGG)n	7	0.790	VII
9	STI0014	ROX	172–190	(AGG)n	5	0.683	IX
10	STM5114	ROX	289–313	(TCT)n	6	0.781	II

* PIC (polymorphic index content) – индекс полиморфизма, по (Nei, 1973).

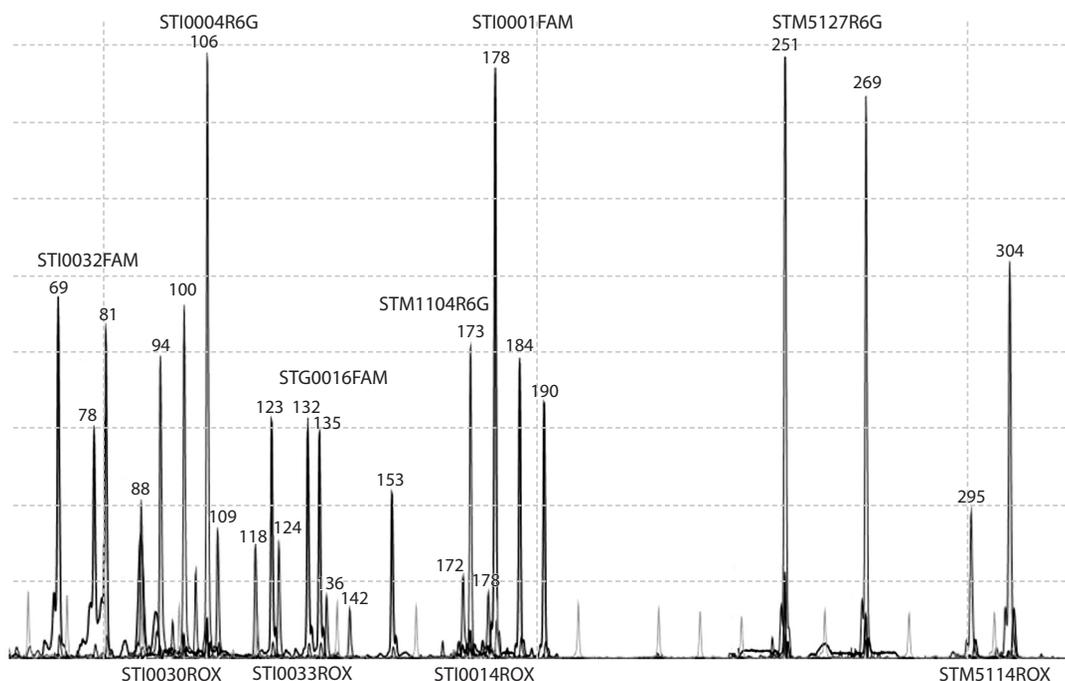


Рис. 1. Пример результата мультиплексного фрагментного анализа сорта картофеля Старт.

Название локуса дано рядом с группами пиков. Размер пиков указан в парах нуклеотидов.

производимости результатов было проанализировано по 10 клубней от разных растений каждого сорта для 8 сортов Уральского НИИСХ. Для 23 сортообразцов исследовано по 5 растений, выращенных на различных селекционных участках двух учреждений и после процедуры оздоровления и получения генерации мини-клубней *in vitro*. Воспроизводимость составила 100 %.

Результаты кластерного анализа (рис. 2) показали выделение с высокой вероятностью селекционных образцов, происходящих от *S. bulbocastanum*. С высокой степенью поддержки сформировали отдельную кладу сорта цветного картофеля Bergerac и Чудесник, а также других селек-

ционных образцов с фиолетовой мякотью. Наблюдается кластеризация сортов, выведенных в одном селекционном учреждении и имеющих в родословной общих родителей (Табор, Bravo, Амур, Люкс или Взрыв и Маяк, Ирбитский и Старт). В отдельную группу попали сорта Bordeaux и Rubesse с красной кожурой и белой мякотью. Таким образом, несмотря на интенсивный обмен селекционным материалом в современной селекции картофеля и низкую степень кластеризации сортов по странам (Антонова и др., 2016), наблюдается выделение сортов с окрашенной кожурой или мякотью, содержащих относительно недавно привнесенный генетический материал диких андийских форм.

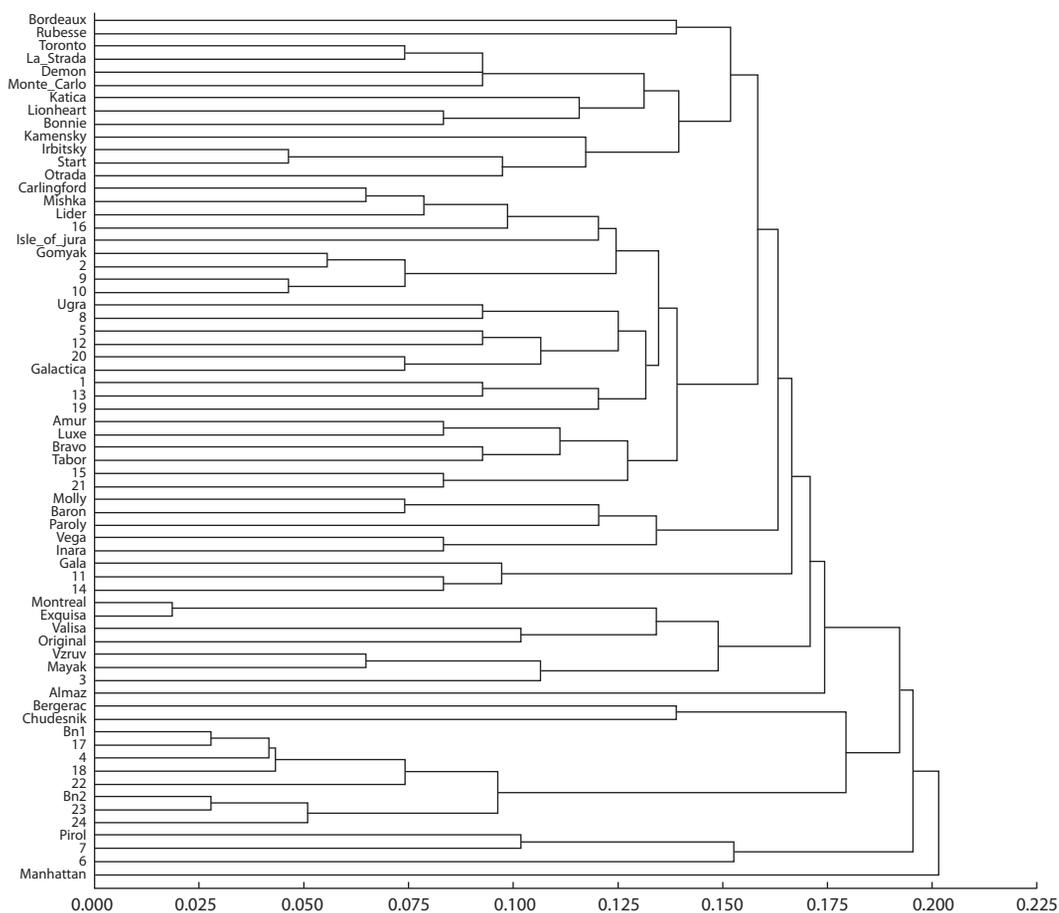


Рис. 2. Дендрограмма кластерного анализа по методу UPGMA (программа Statistica 6.0).

Заключение

Предложенный способ генотипирования может быть использован для генетической паспортизации картофеля. Достаточное количество определяемых локусов и разнообразие аллелей позволяют получить уникальные профили по каждому сорту. Методика мультилокусного анализа дает возможность провести исследование в короткие сроки и минимизировать издержки на анализ. Клонирование основных фрагментов, изучение структуры повтора и создание аллельной лестницы – контрольного образца, содержащего смесь ДНК наиболее распространенных аллелей, позволяют получать точные аллельные профили сортов и снижают вероятность ошибок генотипирования.

Благодарности

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Разработка технологий нового поколения для масштабного генетического анализа растительных форм сельскохозяйственных культур с целью ускорения селекционного процесса» (проект № 0574-2015-0001).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

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.

Велишаева Н.С., Хавкин Э.Е., Шилов И.А. Генотипирование картофеля и его дикорастущих сороридей методом полиморфизма микросателлитов. Докл. РАСХН. 2006;5:3-5.

Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т. 1. Сорта растений (офиц. издание). М.: Росинформагротех, 2016;110-119. http://reestr.gossort.com/docs/reestr_2016.pdf.

Есимсеитова А.К., Шустов А.В., Ахметоллаев И.А., Красвин В.Ф., Какимжанова А.А. Молекулярно-генетическая паспортизация сортов и форм картофеля с использованием SSR-маркеров. Eurasian J. Appl. Biotechnol. (Биотехнология: теория и практика). 2015;2. <http://www.biotechlink.org/2-2015/article6>.

Рыжова Н.Н., Мартиросян Е.В., Кочиева Е.З. Анализ полиморфизма микросателлитных локусов картофеля *Solanum tuberosum* отечественной селекции. Генетика, 2010;46(4):481-487.

Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 1987;19:11-15.

Gishlan M., Nunez J., Herrera M., Pignataro J., Guzman F., Bonierbale M., Spooner D.M. Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. Mol. Breeding. 2009;23:377-388. DOI 10.1007/s11032-008-9240-0.

Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1973;70:3321-3323.

Reid A., Kerr E.M. A rapid simple sequence repeat (SSR)-based identification method for potato cultivars. Plant Genet. Resources. 2007; 5(1):7-13. DOI 10.1017/S1479262107192133.