

УДК 631.147:582.951.4

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПАСПОРТИЗАЦИЯ СОРТОВ И ФОРМ КАРТОФЕЛЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ SSR-МАРКЕРОВ

Есимсеитова А.К.<sup>1</sup>, Шустов А.В.<sup>1</sup>, Ахметоллаев И.А.<sup>1</sup>, Красавин В.Ф.<sup>2</sup>,  
Какимжанова А.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный центр биотехнологии

ул. Валиханова, 13/1, Астана, 010000, Казахстан

<sup>2</sup>Казахский научно-исследовательский институт картофелеводства и овощеводства

ул. Наурыз, 1, п. Кайнар, Карасайский район, 040917, Казахстан

kakimzhanova@biocenter.kz

### АБСТРАКТ

В последние годы проблема идентификации видов и сортов картофеля становится все более актуальной в связи с ускорением селекционного процесса и появлением большого числа новых форм. Особое внимание уделяется разработке эффективных методов для использования в сортоиспытании, селекции, семеноводстве и контроле семенного материала. Высокий уровень полиморфизма, выявляемый SSR-маркерами, определяет ценность этой маркерной системы и позволяет говорить о возможности ее использования для оценки генетической изменчивости между клонами и сортами картофеля, и быстрой и достоверной идентификации сортов.

Ключевые слова: картофель, ДНК, SSR-праймер, локус, аллель, сорт.

## MOLECULAR-GENETIC CERTIFICATION OF POTATO VARIETIES AND FORMS USING SSR-MARKERS

Yessimseitova A.K.<sup>1</sup>, Shustov A.V.<sup>1</sup>, Ahmetollaev I.A.<sup>1</sup>, Krassavin V.F.<sup>2</sup>,  
Kakimzhanova A.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Center for Biotechnology

13/1, Valikhanov str., Astana, 010000, Kazakhstan

<sup>2</sup>Kazakh Research Institute of Potato and Vegetable

1, Nouryz str., Kainar, Karasai District, 040917, Kazakhstan

kakimzhanova@biocenter.kz

### ABSTRACT

In recent years, the problem of identification of species and varieties of potatoes is gaining importance due to the accelerated breeding process and the emergence of many new forms. Particular attention is paid to the development of effective methods that can be used in variety trials, breeding, seed production, and control of seed. The high level of polymorphism detected using SSR-markers establishes the potential of this marker system and suggests the possibility of its use to evaluate genetic variation between clones and varieties of potato, as well as fast and reliable identification of varieties.

Keywords: potatoes, DNA, SSR-primer, locus, allele, variety.

---

### ВВЕДЕНИЕ

Микросателлитные последовательности ДНК являются наиболее доступными, простыми, удобными и относительно недорогими маркерами, пригодными, прежде всего,

для идентификации генотипов растений. Высокий уровень полиморфизма, выявляемый SSR-маркерами, определяет ценность этой маркерной системы и позволяет говорить о возможности ее использования для оценки генетической изменчивости между клонами и сортами картофеля, и быстрой и достоверной идентификации сортов [1, 2, 3].

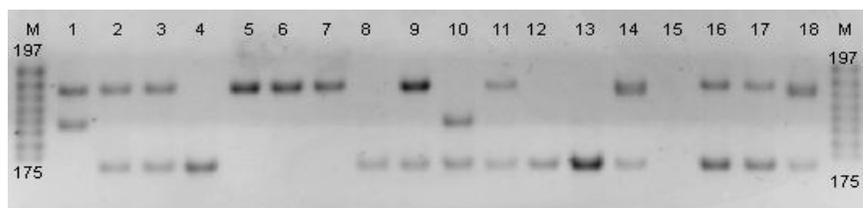
В исследовании по генотипированию использовали 49 генотипов картофеля, районированных в Казахстане. Использовали SSR-праймеры для индивидуальных картированных ядерных микросателлитов картофеля, разработанные и описанные Ghislain M. (2009) [4]. Выделение ДНК проводили по методике Edwards, 1991 [5] с дополнительной очисткой смесью фенол-хлороформ. Определение количества и качества выделенной ДНК проводили на спектрофотометре Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, США). ПЦР проводили в объеме реакционной смеси 30 мкл состава: 30 нг ДНК, 1xПЦР буфер (с 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,2 mM каждого dNTP, 0,66 мкМ каждого праймера и 2 ед. Tag ДНК-полимеразы.

Аmplification проводили в следующих условиях: предварительная денатурация при 94°C в течение 5 мин; следующие 30 циклов: 30 с. – денатурация при 94°C; 30 с. – отжиг праймера; 30 с. – синтез при 72°C; конечная элонгация при 72°C в течение 5 мин. на амплификаторе Eppendorf MasterCycler Pro (Германия). Разделение продуктов амплификации, полученных с праймерами к SSR-последовательностям, проводили в неденатурирующем 8 и 12%-ном полиакриламидном геле при использовании камеры для вертикального электрофореза VE-10 (Helicon, Россия). Гель окрашивали в растворе бромистого этидия, затем электрофореграммы фотографировали в УФ-свете с использованием аппарата GelDoc XR (BioRad, США).

Для расчета генетических расстояний по Nei между сравниваемыми генотипами картофеля построена матрица с использованием алгоритма UPGMA и компьютерной программы TREECON. В работе также рассчитывали индекс информативности маркеров PIC (*polymorphism information content*) и эффективное число аллелей ( $A_e$ ) [6].

Оценку полиморфизма 49 образцов картофеля казахстанской и зарубежной селекции, допущенных к посеву, провели с использованием 12 пар SSR-праймеров, которые в совокупности генерировали 60 аллелей длиной от 85 до 303 п.н. Число аллелей на локус в изученной выборке сортов варьировало от 2 (локус STM5121) до 8 (локус STM1052, STM1106) и в среднем составило 5,0. Число эффективных аллелей варьировало от 0,91 до 4,03, в среднем составило 2,48. Уровень полиморфизма изученных локусов оказался достаточно высоким: значения PIC варьировали от 0,190 (локус STM001b) до 0,750 (локус STM1104), в среднем PIC составил 0,530 на локус, наиболее информативными маркерами PIC выше, чем 0,729 оказались STM1106, STM1104, которые локализованы на хромосомах X, VIII.

В результате исследований по 12 микросателлитным маркерам были получены электрофореграммы для каждого сорта и формы картофеля. У 18 сортов картофеля по праймеру STM0031 выявлено 3 аллеля, из них редких аллелей 2 на локус (рисунок 1), по праймеру STM1104 – 4 аллеля, при этом редких аллелей не показано, по праймеру STG0025 – 4 аллеля, из них редких аллелей – 1 (рисунки 1, 2).

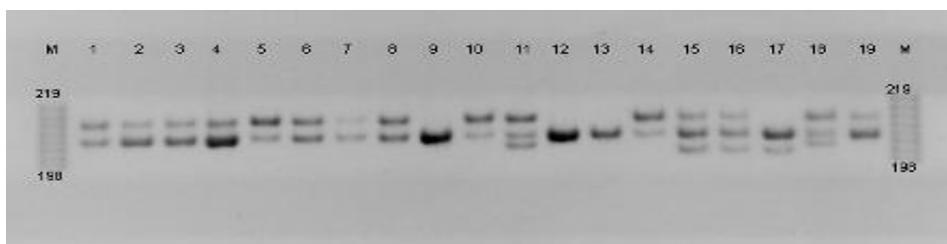


М – маркер 175-197 п.н.; 1 – Ушкoныр; 2 – Moшннякoвский; 3 – Шагалалы; 4 – Тoхтар 30% КФ; 5 – Кoкчeтaвский ранний; 6 – Мираc; 7 – Никитa; 8 – Тoхтар МС; 9 – Фирмeнный; 10 – Рeсурс; 11 – Лoрх; 12 – Жуковcкий ранний; 13 – Елизaвeтa; 14 – Брянcкий ранний; 15 – Шoртaндинский; 16 – Аккoль; 17 – Жуалы; 18 – Акcoр

**Рис. 1.** Электрофореграмма микросателлитного анализа с праймером STM0031

M – marker 175-197 bp; 1 – Ushkonyr; 2 – Moshnyakovskiy; 3 – Shagalaly; 4 – Tokhtar 30% CF; 5 – Kokchetavskiy ranniy; 6 – Miras; 7 – Nikita; 8 – Tokhtar MS; 9 – Firmennyu; 10 – Resurs; 11 – Lorkh; 12 – Zhukovskiy ranniy; 13 – Elizaveta; 14 – Bryanskiy ranniy; 15 – Shortandy; 16 – Akkol; 17 – Jualy; 18 – Aksor

**Fig. 1.** Electrophoregram of the microsatellite analysis with primer STM0031



М – маркер 198-219 п.н. ; 1 – Ушкoныр; 2 – Шагалалы; 3 – Тoхтар 30% КФ; 4 – Аладин; 5 – Мираc; 6 – Никитa; 7 – Тoхтар МС; 8 – Фирмeнный; 9 – Рeсурс; 10 – Лoрх; 11 – Жуковcкий ранний; 12 – Елизaвeтa; 13 – Брянcкий ранний; 14 – Шoртaндинский; 15 – Аккoль; 16 – Жуалы; 17 – Акcoр; 18 – Кoстанайские нoвoсти; 19 – Кoкчeтaвский ранний

**Рис. 2.** Электрофореграмма микросателлитного анализа с праймером STG0025

M – marker 198-219 bp; 1 – Ushkonyr; 2 – Shagalaly; 3 – Tokhtar 30% CF; 4 – Aladin; 5 – Miras; 6 – Nikita; 7 – Tokhtar MS; 8 – Firmennyu; 9 – Resurs; 10 – Lorkh; 11 – Zhukovskiy raniy; 12 – Elizaveta; 13 – Bryanskiy raniy; 14 – Shortandy; 15 – Akkol; 16 – Jualy; 17 – Aksor; 18 – Kostanayskie novosti; 19 – Kokchetavskiy ranniy

**Fig 2.** Electrophoregram of the microsatellite analysis with primer STG0025

Частота встречаемости различных аллелей 12 микросателлитных локусов в изученных сортах и селекционных клонах картофеля варьировала от 2 до 94%. При этом подавляющее большинство 42 аллелей встречалось с частотой до 50%.

В результате исследований у 49 генотипов картофеля выявлено 6 сортов с референтными аллелями, из них 4 сорта казахстанской селекции – Альянс, Ушкoныр, которые выведены методом межвидовой гибридизации, оригинаторами этих сортов являются КазНИИКО и Международный центр картофелеводства (CIP), также сорта картофеля Кoгалы и Карасайский.

Из всех аллелей, обнаруженных в 8 локусах, 17 были редкими (общее число 60 аллелей). Таким образом, у анализируемых образцов оценивали полиморфизм по 12 локусам, учитывали частоту встречаемости редких аллелей, которая не превышала 10%.

С использованием полученных данных методом кластерного анализа были определены генетические расстояния между 49 генотипами картофеля и построена дендрограмма. Генетические расстояния между изученными генотипами картофеля варьировали от 0,1 до 0,5. На основе таблицы попарных генетических расстояний была построена дендрограмма по методу UPGMA, отражающая филогенетические отношения сортов картофеля казахстанской, российской и белорусской селекции.

Для изученных сортов и селекционных клонов картофеля были получены наборы аллелей и составлены молекулярно-генетические паспорта для использования в селекционных программах. Эти молекулярно-генетические паспорта могут использоваться для поддержания и совершенствования коллекций сортов, для охраны авторских прав, сертификации семян и контроля подлинности сортового материала.

На основе 8 микросателлитных локусов составлены общие молекулярно-генетические паспорта для 49 сортов и форм картофеля казахстанской, российской и белорусской селекции. Для каждого сорта в молекулярно-генетическом паспорте указан оригинатор, происхождение, морфофизиологические маркеры, хромосома, локус, аллель.

### **Финансирование**

Работа выполнена по проекту «Разработка технологии генетической паспортизации картофеля на основе молекулярно-генетических маркеров» в рамках реализации Межгосударственной целевой программы ЕврАзЭС.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Yumiko F., Hiroyuki F., Hiroshi Y. Identification of wheat cultivars using EST-SSR markers // *Breeding Science*. – 2009. – Vol. 59. – P. 159-167.
2. Gavrilenko T.O., Antonova A., Ovchinnikova L., Novikova E., Krylova N., Mironenko G., Pendinen A., Islamshina N., Shvachko S., Kiru L., Kostina O., Afanasenko D., Spooner A. Microsatellite and morphological assessment of the Russian National Potato Collection // *Genetic Resources and Crop Evolution*. – 2010. – Vol. 57, №8. – P. 1151-1164.
3. Kawchuk L.M., D.R. Lynch J. Thomas B., Penner D., Sillito and F. Kulcsar. Characterization of *Solanum tuberosum* simple sequence repeats and application to potato cultivar identification // *American Potato Journal*. – 1996. – Vol. 73. – P. 325-335.
4. Ghislain M., Nunez J., Rosario Herrera M., Pignataro J., Guzman F., Bonierbale M., Spooner D.M. Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato // *Molecular Breeding*. – 2009. – Vol. 23. – P. 377-388.
5. Edwards S.K., Johnstone C., Thompson C. Simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis // *Nucleic Acids Res.* – 1991. – Vol. 19, №6. – 1349 p.
6. Nei M. Analyses of gene diversity in subdivided populations // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1973. – Vol. 70. – P. 3321-3323.

### **REFERENCES**

1. Yumiko F., Hiroyuki F., Hiroshi Y. Identification of wheat cultivars using EST-SSR markers. *Breeding Science*, 2009, vol. 59, pp. 159-166. <http://dx.doi.org/10.1270/jsbbs.59.159>.
2. Gavrilenko T., Antonova O., Ovchinnikova A. et al. A microsatellite and morphological assessment of the Russian National cultivated potato collection. *Genetic Resources Crop Evolution*, 2010, vol.57, no. 8, pp. 1151-1164. DOI:10.1007/s10722-010-9554-8.
3. Kawchuk L.M., D.R. Lynch J., Thomas B., Penner D., Sillito and F. Kulcsar. Characterization of *Solanum tuberosum* simple sequence repeats and application to potato cultivar identification. *American Potato Journal*, 1996, vol. 73, pp. 325-335.
4. Ghislain M., Nunez J., Rosario Herrera M. et al. Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. *Molecular Breeding*, 2009, vol. 23, pp. 377-388. DOI:10.1007/s11032-008-9240-0.

5. Edwards S.K., Johnstone C., Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis // *Nucleic Acids Res.* 1991. – Vol. 19, no. 6. – P. 1349.

6. Nei M. Analyses of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, vol. 70, pp. 3321-3323.

## **SSR-МАРКЕРЛЕРІН ҚОЛДАНЫП КАРТОП СОРТТАРЫ МЕН ТҮРЛЕРІН МОЛЕКУЛАЛЫ-ГЕНЕТИКАЛЫҚ ПАСПОРТТАУ**

**Есімсейітова А.Қ.<sup>1</sup>, Шустов А.В.<sup>1</sup>, Ахметоллаев И.Ә.<sup>1</sup>, Красавин В.Ф.<sup>2</sup>,  
Кәкімжанова А.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Ұлттық биотехнология орталығы

Уәлиханов көш., 13/1 үй, Астана, 010000, Қазақстан

<sup>2</sup>Қазақ қартоп және көкөніс шаруашылығы ғылыми-зерттеу институты

Наурыз көш., 1, Қайнар, Карасай ауданы, Алматы облысы, 040917, Қазақстан

*kakimzhanova@biocenter.kz*

### **АБСТРАКТ**

Соңғы жылдарда картоптың сорттарын және түрлерін ұқсастандыру мәселесі сұрыптау процессінің шапшаңдауына және көптеген жаңа түрлердің пайда болуына байланысты барынша өзекті болып отыр. Селекцияда, сорт сынауда, тұқым шаруашылығы мен тұқым материалын бақылауда пайдалану үшін тиімді әдістерді әзірлеуге ерекше назар аударылуда. SSR-маркерлер анықтайтын жоғары көптүрлілік деңгейі осы маркерлік жүйенің құндылығын анықтайды және картоп клондары мен сорттары арасындағы генетикалық өзгергіштікті бағалау үшін оны пайдалануға, сорттарды жылдам және анық ұқсастандыруға мүмкіндік береді.

**Негізгі сөздер:** картоп, ДНК, SSR-праймер, локус, аллель, сорт.