

БИОТЕХНОЛОГИЯ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

2(4), 2019





НАУЧНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

БИОТЕХНОЛОГИЯ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

2019, 2(4)

ОСНОВАН В 2018 ГОДУ
ПЕРИОДИЧНОСТЬ 4 РАЗА В ГОД

*Для биотехнологов, селекционеров,
генетиков, преподавателей вузов
биологического и сельскохозяйствен-
ного профиля.*

e-mail: pbi@vir.nw.ru

190000 Россия, г. Санкт-Петербург,
ул. Б. Морская, 42, 44

© Федеральный исследовательский центр
Всероссийский институт генетических ресурсов
растений имени Н.И. Вавилова (ВИР)

DOI: 10.30901/2658-6266-2019-4
УДК: 573.6:631.527

ПИ № ФС 77–74475
ISSN: 2658-6266 (Print)
ISSN: 2658-6258 (Online)

Используемые на обложке фотографии - материал к статье О.Ю. Антонова, А.П. Ермишин*, А.В. Левый, А.С.Ареева, Е.В. Воронкова, Т.А. Гавриленко «Разработка хромосомо-специфичных ДНК-маркеров для изучения интрогрессивной гибридизации картофеля с диким мексиканским аллотетраплоидным видом *Solanum stoloniferum* Schldl.»

В левом верхнем углу - внешний вид растений дикого мексиканского вида *Solanum stoloniferum*, образец PI 205522 и клубни этого образца. **Ниже** - клубни сорта Katahdin (*Solanum tuberosum*).

В левом нижнем углу – клубни неправильной формы с глубокими глазками триплоидного межвидового гибрида 2x SvSv-линия × *S. stoloniferum*, PI 205522.

В верхнем правом углу справа – клубни пентаплоидного гибрида BC₁ IGC16/39.32;

В правом нижнем углу – клубни правильной формы с мелкими глазками гибрида BC₂ IGC17/170.30 (получен в результате опыления гибрида BC₁ сортом Quarta).

На всех рисунках представлены клубни с одного растения; материал, выращен в 2018 г. на опытном поле Института генетики и цитологии НАН Беларуси, г. Минск.

SCIENTIFIC PEER REVIEWED JOURNAL

PLANT BIOTECHNOLOGY AND BREEDING

2019, 2(4)

FOUNDED IN 2018
PUBLISHED 4 TIMES ANNUALLY

*Addressed to biotechnologists, geneticists,
plant breeders and lecturers of biological
and agricultural universities and colleges.*

e-mail: pbi@vir.nw.ru

42, 44 Bolshaya Morskaya Street,
St. Petersburg 190000, Russia

© Federal Research Center the N.I. Vavilov
All-Russian Institute of Plant Genetic Resources
(VIR)

Главный редактор:

Е. К. Хлесткина – д.б.н., профессор РАН.

Заместитель главного редактора:

Т. А. Гавриленко – д.б.н.

Ответственные секретари:

И. Н. Анисимова – д.б.н.

Л. Ю. Новикова – д.с.-х.н.

Редакционный совет:

А. И. Аbugалиева – д.б.н. (Казахстан)
О. С. Афанасенко – д.б.н., академик РАН (Россия)
Г. А. Баталова – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
Р. К. Берсимбаев – д.б.н., академик НАН РК (Казахстан)
Л. А. Беспалова – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
А. И. Грабовец – д.с.-х.н., чл.-корр. РАН (Россия)
С. И. Гриб – д.с.-х.н., академик НАНБ (Беларусь)
Е. А. Егоров – д.э.н., академик РАН (Россия)
В. Г. Еремин – д.с.-х.н., профессор РАН (Россия)
Г. В. Еремин – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
Г. И. Карлов – д.б.н., чл.-корр. РАН (Россия)
А. В. Кильчевский – д.б.н., академик НАНБ (Беларусь)
З. А. Козловская – д.с.-х.н. (Беларусь)
Н. А. Колчанов – д.б.н., академик РАН (Россия)
В. Н. Корзун – д-р (Германия)
А. В. Кочетов – д.б.н., чл.-корр. РАН (Россия)
Н. В. Кухарчик – д.с.-х.н. (Беларусь)
В. М. Лукомец – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
Л. А. Лутова – д.б.н. (Россия)
С. Мишева – д-р (Болгария)
А. И. Моргунов – д-р (Турция)
В. Ройчев – д.с.-х.н. (Болгария)
А. А. Романенко – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
А. В. Рындин – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
Е. Н. Седов – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
И. А. Тихонович – д.б.н., академик РАН (Россия)
П. Н. Харченко – д.б.н., академик РАН (Россия)
Л. В. Хотылева – д.б.н., академик НАНБ (Беларусь)
В. К. Шумный – д.б.н., академик РАН (Россия)

Редакционная коллегия:

Е. Е. Андронов – к.б.н. (Россия)
Д. А. Афонников – к.б.н. (Россия)
А. Х. Баймиев – д.б.н. (Россия)
И. А. Белан – к.с.-х.н. (Россия)
А. Г. Беседин – к.с.-х.н. (Россия)
М. А. Вишнякова – д.б.н. (Россия)
В. А. Гаврилова – д.б.н. (Россия)
С. В. Гаркуша – д.с.-х.н. (Россия)
Т. А. Гасанова – к.с.-х.н. (Россия)
С. В. Герасимова – к.б.н. (Россия)
М. С. Гинс – д.б.н., чл.-корр. РАН (Россия)
С. В. Гончаров – д.б.н. (Россия)
Р. О. Давоян – д.б.н. (Россия)
Я. Н. Демурич – д.б.н. (Россия)
М. Г. Дивашук – к.б.н. (Россия)
С. Н. Еланский – д.б.н. (Россия)
О. В. Еремина – д.с.-х.н. (Россия)
А. П. Ермишин – д.б.н. (Беларусь)
М. В. Ефимова – к.б.н. (Россия)
Р. Ш. Заремук – д.с.-х.н. (Россия)
С. В. Зеленцов – д.с.-х.н., чл.-корр. РАН (Россия)
Е. Т. Ильницкая – к.б.н. (Россия)
Р. Н. Календарь – к.б.н. (Казахстан)
Н. Н. Карпун – к.б.н. (Россия)
В. С. Ковалев – д.с.-х.н. (Россия)
Н. Н. Коваленко – д.б.н. (Россия)
Е. З. Кочиева – д.б.н. (Россия)
Б. Р. Кулуев – д.б.н. (Россия)
К. У. Куркиев – д.б.н. (Россия)
С. В. Кушнаренко – к.б.н. (Казахстан)
И. Н. Леонова – д.б.н. (Россия)
И. Е. Лихенко – д.с.-х.н. (Россия)
В. В. Лиховской – д.с.-х.н. (Россия)
П. Н. Мальчиков – д.с.-х.н. (Россия)
Т. В. Матвеева – д.б.н. (Россия)
Н. В. Мироненко – д.б.н. (Россия)
И. В. Митрофанова – д.б.н. (Россия)
Е. И. Михайлова – д.б.н. (Россия)
С. В. Осипова – д.б.н. (Россия)
В. Н. Подорожный – к.с.-х.н. (Россия)
Т. Г. Причко – д.с.-х.н. (Россия)
Т. А. Рожмина – д.б.н. (Россия)
А. В. Смыков – д.с.-х.н. (Россия)
А. А. Соловьев – д.б.н., профессор РАН (Россия)
И. И. Супрун – к.б.н. (Россия)
Е. К. Турусупеков – к.б.н. (Казахстан)
Е. В. Ульяновская – д.с.-х.н. (Россия)
О. Ю. Урбанович – д.б.н. (Беларусь)
Ю. В. Фотев – к.с.-х.н. (Россия)
Э. Б. Хатефов – д.б.н. (Россия)
Я. А. Цепилов – к.б.н. (Россия)
М. Н. Шаптуренко – д.б.н. (Беларусь)
О. Ю. Шоева – к.б.н. (Россия)
Л. А. Эльконин – д.б.н. (Россия)
Г. В. Якуба – к.б.н. (Россия)

Editor-in-Chief:

E. K. Khlestkina – Dr. Sci. in Biol., Professor.

Deputy Editor-in-Chief:

T. A. Gavrilenko – Dr. Sci. in Biol.

Executive Secretaries:

I. N. Anisimova – Dr. Sci. in Biol.

L. Yu. Novikova – Dr. Sci. in Agricul.

Editorial council:

A. I. Abugalieva – Dr. Sci. in Biol. (Kazakhstan)
O. S. Afanasenko – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)
G. A. Batalova – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
R. K. Bersimbaev – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the NAS RK (Kazakhstan)
L. A. Bepalova – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
E. A. Egorov – Dr. Sci. in Econ., Full Member of the RAS (Russia)
G. V. Eremin – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
V. G. Eremin – Dr. Sci. in Agricul., Professor (Russia)
A. I. Grabovets – Dr. Sci. in Agricul., Corr. Member of the RAS (Russia)
S. I. Grib – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the NAS of Belarus (Belarus)
G. I. Karlov – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the RAS (Russia)
P. N. Kharchenko – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)
L. V. Khotyleva – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the NAS of Belarus (Belarus)
A. V. Kilchevsky – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the NAS of Belarus (Belarus)
A. V. Kochetov – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the RAS (Russia)
N. A. Kolchanov – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)
V. N. Korzun – Dr. (Germany)
Z. A. Kozlovskaya – Dr. Sci. in Agricul. (Belarus)
N. V. Kukharchik – Dr. Sci. in Agricul. (Belarus)
V. M. Lukomets – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
L. A. Lutova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
S. Misheva – Dr. (Bulgaria)
A. I. Morgunov – Dr. (Turkey)
A. A. Romanenko – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
A. V. Ryndin – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
V. Roychev – Dr. Sci. in Agricul. (Bulgaria)
E. N. Sedov – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
V. K. Shumny – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)
I. A. Tikhonovich – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)

Editorial board:

D. A. Afonnikov – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
E. E. Andronov – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
A. H. Bajmiev – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
I. A. Belan – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
A. G. Besedin – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
R. O. Davoyan – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
Ya. N. Demurin – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
M. G. Divashuk – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
M. V. Efimova – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
S. N. Elansky – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
L. A. Elkonin – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
O. V. Eremina – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
A. P. Ermishin – Dr. Sci. in Biol. (Belarus)
Yu. V. Fotev – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
S. V. Garkusha – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
T. A. Gasanova – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
V. A. Gavrilova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
S. V. Gerasimova – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
M. S. Gins – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the RAS (Russia)
S. V. Goncharov – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
E. T. Ilnitskaya – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
R. N. Kalendar – Cand. Sci. in Biol. (Kazakhstan)
N. N. Karpun – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
E. B. Khatefov – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
E. Z. Kochieva – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
N. N. Kovalenko – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
V. S. Kovalev – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
B. R. Kuluev – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
K. U. Kurkiev – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
S. V. Kushnarenko – Cand. Sci. in Biol. (Kazakhstan)
I. N. Leonova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
I. E. Lihenko – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
V. V. Likhovskoi – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
P. N. Malchikov – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
T. V. Matveeva – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
N. V. Mironenko – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
I. V. Mitrofanova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
E. I. Mikhailova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
S. V. Osipova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
V. N. Podorozhnyi – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
T. G. Prichko – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
T. A. Rozhmina – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
M. N. Shapturenko – Dr. Sci. Biology (Belarus)
O. Yu. Shoeva – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
A. V. Smykov – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
A. A. Soloviev – Dr. Sci. in Biol., Professor (Russia)
I. I. Suprun – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
Ya. A. Tsepilov – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
E. K. Turuspekov – Cand. Sci. in Biol.
E. V. Ulyanovskaya – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
O. Yu. Urbanovich – Dr. Sci. in Biol. (Belarus)
M. A. Vishnyakova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
G. V. Yakuba – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
R. Sh. Zaremuk – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
S. V. Zelentsov – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)

Содержание

ОТ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА 5

Хлесткина Е. К.

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 6

*Воронкова Е.В., Русецкий Н.В., Лукша В.И.,
Гукасян О.Н., Жарич В.М., Ермишин А.П.*

МАРКЕР-ОПОСРЕДОВАННЫЙ
ОТБОР СЕЛЕКЦИОННЫХ ЛИНИЙ
КАРТОФЕЛЯ С КОМБИНАЦИЕЙ
ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К PVY ОТ
РАЗНЫХ ДИКИХ ВИДОВ.

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 15

*Хатефов Э.Б., Шомахов Б.Р., Кушова Р.С.,
Кудаев Р.А., Хаширова З.Т., Гяургиев А.Х.*

ХАРАКТЕРИСТИКА
РЕДИПЛОИДНЫХ ЛИНИЙ
КУКУРУЗЫ СЕЛЕКЦИИ ВИР ПО
КОМБИНАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ
И РЕАКЦИИ НА ЦМС.

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 24

*Антонова О.Ю., Ермишин А.П., Левый А.В.,
Агеева А.С., Воронкова Е.В.,
Гавриленко Т.А.*

РАЗРАБОТКА
ХРОМОСОМО-СПЕЦИФИЧНЫХ
ДНК-МАРКЕРОВ ДЛЯ
ИЗУЧЕНИЯ ИНТРОГРЕССИВНОЙ
 ГИБРИДИЗАЦИИ КАРТОФЕЛЯ
 С ДИКИМ МЕКСИКАНСКИМ
 АЛЛОТЕТРАПЛОИДНЫМ ВИДОМ
Solanum stoloniferum Schltdl.

ОБЗОР 36

*Аипова Р., Абдыкадырова А.Б.,
Курманбаев А.А.*

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ
В ОРГАНИЧЕСКОМ ЗЕМЛЕДЕЛИИ.

Contents

FROM THE EDITOR IN CHIEF 5

Khlestkina E. K.

ORIGINAL ARTICLE 6

*Voronkova E. V., Rusetskiy N. V., Luksha V.I.,
Gukasian O.N., Zharich V.M., Yermishin A.P.*

MARKER ASSISTED SELECTION
OF POTATO BREEDING LINES WITH
COMBINATION OF PVY RESISTANCE
GENES FROM DIFFERENT WILD
SPECIES.

ORIGINAL ARTICLE 15

*Khatefov E.B., Shomakhov B.R., Kushkhova
R.S., Kudaev R.A., Khashirova Z. T.,
Gyaurgiev A.Kh.*

COMBINING ABILITY AND
RESPONSE TO CMS IN REVERSE
DIPLOID MAIZE LINES
DEVELOPED AT VIR.

ORIGINAL ARTICLE 24

*Antonova O.Yu., Yermishin A.P.,
Levy A.V., Ageeva A.S., Voronkova E. V.,
Gavrilenko T.A.*

DEVELOPMENT
OF CHROMOSOME-SPECIFIC
MARKERS FOR A STUDY
ON INTROGRESSIVE HYBRIDIZATION
OF POTATO WITH THE WILD
MEXICAN ALLOTETRAPLOID SPECIES
Solanum stoloniferum Schldl.

REVIEW ARTICLE 36

*Aipova R., Abdykadyrova A.B.,
Kurmanbayev A.A.*

BIOLOGICAL PRODUCTS
IN ORGANIC AGRICULTURE.



Уважаемые читатели!

В настоящем выпуске отдельное внимание уделено вопросам гибридной селекции. Представлены результаты применения инновационного подхода для создания гетерозисных гибридов кукурузы, основанного на получении и использовании редиплоидных линий из тетраплоидной популяции.

В системе скрещиваний более 100 редиплоидных линий с 37 стерильными тестерами различных групп спелости дана оценка комбинационной способности редиплоидных линий и изучена реакция на ЦМС М- и С-типов. Выделены линии, характеризующиеся способностью закреплять стерильность или восстанавливать мужскую фертильность при М- и С-типах ЦМС с комбинационной способностью от сверхвысокой до хорошей. Выделены гибриды по результатам оценки уборочной влажности зерна.

Следующий блок статей выпуска посвящен повышению устойчивости возделываемых культур к болезням. Генетически обусловленная устойчивость и применение биологических средств защиты способствуют сниже-

нию химической нагрузки на почву и окружающую среду и экологизации земледелия.

Методы маркер-ориентированной селекции растений наиболее широкое применение получили именно в программах по созданию форм, устойчивых к различным факторам биотического стресса. Особую актуальность имеет проверка (тестирование) селекционного материала вегетативно размножаемых культур на наличие генов устойчивости к вирусным заболеваниям. Исследователи из Института генетики и цитологии НАН Беларуси (ИГЦ) и РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству», в ходе создания нового селекционного материала, устойчивого к одному из наиболее вредоносных вирусов картофеля (PVY) провели отбор на основе молекулярного скрининга около 400 селекционных клонов, полученных на основе сложных межвидовых гибридов, и фенотипическую оценку отобранных генотипов методом иммуноферментного анализа после искусственного заражения растений вирусом. Выделены устойчивые формы, предложена стратегия повышения эффективности селекции картофеля на вирусостойчивость.

В следующей статье представлены результаты межвидовой гибридизации культурного картофеля с диким мексиканским видом *Solanum stoloniferum*, устойчивым к фитофторозу и к вирусу картофеля PVY. Эти данные получены в рамках совместного российско-белорусского проекта между ВИР и ИГЦ. В статье предложены и реализованы различные схемы вовлечения *S. stoloniferum* в межвидовую гибридизацию, основанные на получении гибридов с разным уровнем ploидности и, предположительно, с различным геномным составом, что еще предстоит изучить. Авторы предложили набор SSR- и CAPS-маркеров с известной хромосомной локализацией, который будет использован для оценки эффективности интрогрессии генетического материала *S. stoloniferum*, при использовании различных схем межвидовой гибридизации.

Обзорная статья, представленная в выпуске, посвящена методам биологической защиты растений и повышению продуктивности на основе изучения микробно-растительных взаимодействий и последующего создания и использования сложных микробных препаратов с целью применения в сельскохозяйственной практике.

Главный редактор,
Профессор РАН,
Е.К. Хлесткина

МАРКЕР-ОПОСРЕДОВАННЫЙ ОТБОР СЕЛЕКЦИОННЫХ ЛИНИЙ КАРТОФЕЛЯ С КОМБИНАЦИЕЙ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К PVY ОТ РАЗНЫХ ДИКИХ ВИДОВ

Воронкова Е. В.^{1*}, Русецкий Н. В.², Лукша В. И.,¹
Гукасян О. Н.,¹ Жарич В. М.,¹ Ермишин А. П.¹

¹ Институт генетики и цитологии Национальной Академии наук Беларуси, 220072 Беларусь, Минск, ул. Академическая, 27;
✉ *E.Voronkova@igc.by

² Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству»,
223013 Беларусь, Минская обл., ул. Ковалева, 2а, п. Самохваловичи;

Y-вирус картофеля (PVY) относят к группе наиболее опасных вирусных инфекций этой культуры. Актуальным является выведение сортов картофеля, устойчивых к широкому набору штаммов PVY, создание исходного материала для такой селекции с комбинацией генов устойчивости из разных источников. Цель работы – (1) с помощью ДНК-маркеров генов устойчивости к PVY провести генотипирование коллекции, включающей 376 селекционных линий (СЛ) на основе сложных межвидовых гибридов, (2) выявить образцы с маркерами генов устойчивости от разных видов для последующего использования в маркер-опосредованной селекции (МОС или MAS), (3) оценить эффективность ДНК-маркеров генов устойчивости к PVY применительно к материалу, полученному с помощью межвидовой гибридизации. Установлено, что наиболее широко в коллекции представлены СЛ с маркерами RYSC3 гена Ry_{adg} (49,7%), Ry364 и RAPD38-530 гена Ry_{chc} (соответственно, 50,5% и 45,2%), Yes3-3A гена Ry_{sto} (29,8%). Маркеры Ryl186 гена Ry_{chc} и GPI22/*EcoRV*₇₈₀ гена Ry_{fsto} выявлены лишь у единичных образцов. Частоты СЛ, имеющих маркеры генов устойчивости к PVY от двух разных видов картофеля, колебались от 2,7% (маркер Yes3-3a гена Ry_{sto} + оба маркера гена Ry_{chc}) до 8,5-9,0% (маркер RYSC3 гена Ry_{adg} + оба маркера гена Ry_{chc} или только маркер Ry364 этого гена, соответственно). Всего в коллекции выявлено 134 СЛ (47,6%), имеющих маркеры генов устойчивости к PVY от двух разных видов. Сочетание четырех маркеров к трем генам различного происхождения (Ry_{adg} , Ry_{sto} и Ry_{chc}) было обнаружено у 27 образцов (7,2%). Крайняя или, иначе, экстремальная (от англ. ER-extremely resistant) устойчивость к PVY большинства изученных СЛ (302 из 357) очевидно обусловлена наличием у них известных генов устойчивости к этому патогену, которые выявляются с помощью использованных в работе ДНК-маркеров. Тем не менее, в коллекции была значительная доля образцов, которые не имели используемых маркеров генов устойчивости к PVY, но оказались устойчивы к вирусу (55 из 61). Также выявлено 13 (3,5%) образцов с ДНК-маркерами генов устойчивости к PVY, которые были неустойчивы к патогену, что является приемлемым уровнем для первичного маркер-опосредованного отбора исходного селекционного материала. Полученные данные о наличии маркеров генов устойчивости к PVY и комбинации генов устойчивости разного происхождения у СЛ призваны обеспечить более эффективное их использование в селекции по сравнению с устойчивыми к вирусу линиями, не имеющими соответствующих маркеров.

Ключевые слова: картофель, межвидовые гибриды, маркер-опосредованный отбор, устойчивость к PVY, R гены экстремальной (крайней) устойчивости (ER).

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/10.30901/2658-6266-2019-4-01>

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

MARKER ASSISTED SELECTION OF POTATO BREEDING LINES WITH COMBINATION OF PVY RESISTANCE GENES FROM DIFFERENT WILD SPECIES

Voronkova E. V.,^{1*} Rusetskiy N. V.,² Luksha V. I.,¹
Gukasian O. N.,¹ Zharich V. M.,¹ Yermishin A. P.¹

¹ Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, 27 Akademicheskaya Street, Minsk 220072, Belarus;
✉ *E.Voronkova@igc.by

² Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Potato, Fruit and Vegetable Growing, 2a Kovalev Street, Samokhvalovichy, 223013 Minsk region, Republic of Belarus;

Potato virus Y (PVY) is considered as one of the most harmful virus infections of this crop. Thus, it is a topical problem to breed potato varieties resistant against a wide range of PVY strains and to create initial breeding material that will have a combination of resistance genes from different species. The aim of the study was: (1) to genotype a collection of 376 breeding lines (BL), developed from complex interspecific hybrids, using DNA markers of PVY resistance genes, (2) to identify accessions with markers of resistance genes from different species for subsequent use in marker assisted selection (MAS), (3) to evaluate the suitability of DNA markers of PVY resistance genes for genotyping BL developed through interspecific hybridization. It was ascertained that the markers most widely represented in the collection were RYSC3 of the Ry_{adg} gene (49.7%), Ry364 and RAPD38-530 of the Ry_{chc} gene (50.5% and 45.2%, respectively), and Yes3-3A of the Ry_{sto} gene (29.8%). The markers Ryl186 of Ry_{chc} and GPI22/*EcoRV*₇₈₀ of Ry_{fsto} were found only in some accessions. The frequency of occurrence of BL that had markers of PVY resistance genes from two different species varied between 2.7% (Yes3-3a marker of Ry_{sto} and both two markers of Ry_{chc}) and 8.5-9.0% (RYSC3 marker of Ry_{adg} and both two markers of Ry_{chc} or only Ry364 marker of this gene). In total, the collection was found to contain 134 BL (47.6%) with markers of resistance genes from two different species. A combination of four markers for three genes of different origin (Ry_{adg} , Ry_{sto} and Ry_{chc}) was found in 27 BL (7.2%). Extreme resistance to PVY of most BL (302 out of 357) was obviously determined by the presence in them of the currently used resistance genes detected by DNA markers applied in the study. Nevertheless, a significant part of accessions (55 of 61) that did not have any markers was resistant to PVY. At the same time, 13 BL (3.5%) with the markers were susceptible to the virus. Such a level of discrepancies is considered as acceptable for the initial MAS of breeding material. The obtained data on the presence of the markers of PVY resistance genes of different origin and their combination in BL ensures a more effective use of such BL in breeding in comparison with the BL resistant to the virus, though lacking corresponding markers.

Key words: potato, interspecific hybrids, marker-assisted selection (MAS), PVY resistance, R-genes of extreme resistance (ER).

Для цитирования: Воронкова Е. В., Русецкий Н. В., Лукша В. И., Гукасян О. Н., Жарич В. М., Ермишин А. П. Маркер-опосредованный отбор селекционных линий картофеля с комбинацией генов устойчивости к PVY от разных диких видов. *Биотехнология и селекция растений*. 2019;2(4):6-14. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-4-01

For citation: Voronkova E. V., Rusetskiy N. V., Luksha V. I., Gukasian O. N., Zharich V. M., Yermishin A. P. Marker assisted selection of potato breeding lines with combination of PVY resistance genes from different wild species. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(4):6-14. (In Russ.) DOI: 10.30901/2658-6266-2019-4-01

ORCID:

Voronkova E. V. <https://orcid.org/0000-0001-9747-8622>
Yermishin A. P. <https://orcid.org/0000-0002-3106-4926>

УДК 631.524.86:635.21:632.3/4:577.21.08

Поступила в редакцию: 04.12.2019

Принята к публикации: 25.12.2019

Введение

Среди болезней картофеля особое место занимают патологии, вызванные Y-вирусом картофеля (PVY). Поражение растений этим патогеном может приводить к потере от 10 до 80% урожая, а при синергическом взаимодействии с другими вирусами (PVA, PVV, PVX, PLRV) – к практически полной его утрате (Ivanyuk et al., 2005). Высокая патогенность, повсеместная распространенность в мире, а также широкое генетическое разнообразие выделенных изолятов дали основание причислить PVY к группе наиболее опасных вирусных инфекций растений (Scholthof et al., 2011). Проблему защиты картофеля от PVY усугубляет наличие нескольких векторов переноса инфекции и достаточно быстрая реинфекция оздоровленного семенного материала.

Мониторинг разнообразия штаммов PVY, проводившийся в Беларуси несколько лет назад, показал, что преобладающим является обычный штамм PVY^O, в отличие от Западной Европы, где преобладают некротические штаммы. Не были выявлены наиболее опасные рекомбинантные некротические штаммы PVY^{NTN} и PVY^{N-wi} (Blotskaya, 2014). Однако, учитывая географическую близость Беларуси к странам Евросоюза, существует вероятность проникновения и распространения на территории республики новых опасных штаммов PVY. В связи с этим большую актуальность имеет так называемая «упреждающая селекция» сортов картофеля, устойчивых к максимально широкому набору изолятов и штаммов, а не только к циркулирующим в настоящее время, а также создание исходного материала для такой селекции: с широкой генетической базой, включающей комбинацию генов устойчивости из разных источников (Haverkort et al., 2016, Fadina et al., 2017).

Основными механизмами устойчивости к PVY являются гиперчувствительность (HR – hypersensitive response) и экстремальная (крайняя) устойчивость (ER – extreme resistance) (Cockerham, 1970; De Ronde et al., 2014). Они представляют собой два варианта R-генной устойчивости, возникающей при взаимодействии продуктов генов авирулентности патогена и специфических, как правило, доминантных моногенно наследуемых генов растения в соответствии с концепцией «ген – на – ген» (De Ronde et al., 2014). Идентифицированы восемь генов гиперчувствительности *Ny* и пять *Ry*-генов, обеспечивающих устойчивость к PVY ER-типа. Часть этих генов была картирована и маркирована. Важное преимущество устойчивости ER-типа по сравнению с HR состоит в том, что она не связана с возникновением некрозов и не имеет выраженной штаммоспецифичности, что обеспечивает достаточно длительную защиту растений от проникновения вирусной инфекции (De Ronde et al., 2014). Кроме того, некоторые из ER-генов устойчивости к PVY одновременно способны обеспечивать устойчивость и к другим вирусам той же группы (PVA и/или PVV). В част-

ности, это характерно для *Ry*-генов аллотетраплоидного дикого вида картофеля *Solanum stoloniferum* Schldtl. и гексаплоидного вида *S. hougasii* Correll (Cockerham, 1970; Solomon-Blackburn, Barker, 2001a).

Попытки интрогрессировать в культурный картофель экстремальную устойчивость к PVY от других видов известны с 1944 года. Однако долгое время существовало ограниченное число сортов с ER в силу незначительного количества генетических ресурсов, которые могли быть привлечены для гибридизации с тетраплоидным картофелем (Solomon-Blackburn, Barker, 2001b). За исключением *S. tuberosum* ssp. *andigenum* (Juz. et Bukasov) Hawkes, являющегося источником гена *Ry_{adg}*, обеспечивающего ER к PVY и HR к PVA и картированного на хромосоме XI (Sorri et al., 1999; Kasai et al. 2000; Solomon-Blackburn, Barker 2001b), другие виды картофеля, носители генов *Ry* и *Ny*, как правило, не скрещиваются напрямую с *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* Hawkes.

Кроме вышеназванного гена *Ry_{adg}*, представленного во многих сортах картофеля, известны гены *Rysto* и *Ryf-sto* аллотетраплоидного вида *S. stoloniferum*, *Ryhou* *S. hougasii*, контролирующие в различных комбинациях крайнюю устойчивость к PVY с ER или HR к PVA и PVV (Cockerham, 1970; Solomon-Blackburn, Barker, 2001a). Один из этих генов, *Rysto* обеспечивает экстремальную устойчивость к PVY и PVV в сочетании с HR к PVA, он картирован на хромосоме XII (Solomon-Blackburn, Barker 2001a; Flis et al., 2005; Song et al., 2005; Song, Schwarzfischer, 2008). Проблема его использования в селекции связана не только со сложностью интрогрессии при межвидовой гибридизации, но и с тем, что его наличие в сортах картофеля ассоциировано с цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС). Из-за этого сорта с *Rysto* как правило, могут быть использованы в скрещиваниях только в качестве материнских образцов. Ген *Ryf-sto* также картированный на хромосоме XII, в отличие от *Rysto* не связан с ЦМС. Для него не отмечена связь с устойчивостью к другим *Potyvirus* (Flis et al., 2005).

В качестве перспективного источника генов устойчивости к PVY рассматривают дикий южноамериканский вид *S. chacoense* Bitter. Этот диплоидный вид достаточно легко скрещивается с дигиплоидами культурного картофеля, что позволяет получать селекционные линии-источники устойчивости к PVY. Такие линии, хотя и менее активно, чем селекционный материал на основе *S. tuberosum* ssp. *andigenum* и *S. stoloniferum*, начали использовать селекционеры в программах на устойчивость к PVY в Европе и Северной Америке (Fulladolsa et al., 2019). Ген *Rychc* устойчивости к PVY от *S. chacoense* картирован на хромосоме IX (Hosaka et al., 2001; Sato et al., 2006). Он был успешно интрогрессирован в некоторые сорта японской селекции (Mori et al., 2012). ДНК-маркеры этого гена также были выявлены в отдельных сортах российской селекции и многочисленных селекционных линиях (Biryukova et al., 2015).

Разработан ряд ДНК-маркеров R-генов устойчивости к PVY, которые используются в селекционных программах разных стран для выявления источников соответствующих генов (преимущественно в сортах картофеля) и прослеживания их интрогрессии в селекционный материал (Flis et al., 2005; Ottoman et al., 2009; Song, Schwarzfischer, 2008; Vales et al., 2010; Mori et al., 2012; Zimnoch-Guzowska et al., 2013; Fulladolsa et al., 2019).

В Научно-практическом центре НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству в рамках специальной программы создан обширный селекционный материал с высокой устойчивостью к PVY и PVX на основе межвидовых гибридов с рядом диких и примитивных культурных видов картофеля (Rusetskiy, 2018). Целью настоящей работы было: (1) с использованием ДНК-маркеров генов устойчивости к PVY провести генотипирование коллекции, включающей 376 селекционных линий (СЛ), полученных на основе сложных межвидовых гибридов, (2) выявить образцы с маркерами генов устойчивости от разных видов для последующего использования в маркер-опосредованной селекции (МОС или MAS), (3) оценить эффективность ДНК-маркеров генов устойчивости к PVY применительно к материалу, полученному с помощью межвидовой гибридизации.

Материал и методы

Растительный материал. В качестве материала использовали 376 селекционных линий (далее СЛ), представляющих собой тетраплоидные сложные межвидовые гибриды, полученные в результате многоступенчатых скрещиваний и отбора устойчивых образцов (помимо основных, использованных в скрещиваниях видов *S. chacoense*, *S. acaule* Bitter, *S. andigenum* Juz. et Bukasov и *S. stoloniferum* в гибридах также присутствовал генетический материал *S. rybinii* Juz. et Bukasov, *S. demissum* Lindl., *S. berthaultii* Hawkes, *S. microdontum* Bitter, *S. bulbocastanum* Dunal et Poir., *S. hougassii* Correll, *S. gourlayi*, *S. kurtzianum* Bitter et Wittm., *S. brevicaulis* Bitter, *S. boergeri*, *S. etuberosum* Lindl. и др.), а также восемь сортов картофеля, известных своей устойчивостью к PVY: Esta, Bonus, Bazsta, Barycz, Гармония, Першацвет, Рубин и Юлия из коллекции Научно-практического центра Национальной академии наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству.

Фенотипическая оценка устойчивости образцов к PVY. Уровень устойчивости генотипов к вирусной инфекции определяли методом иммуноферментного анализа после искусственного заражения вирусом. Для приготовления инокулюмов листья табака сорта Samsun, инфицированные штаммами PVY^O, PVY^N и PVY^{NTN}, а также PVA, растирали в ступке с добавлением фосфатного буфера. Заражение исследуемого материала (3-5 растений каждого образца) осуществляли путем втирания

губкой суспензии в поверхность листьев, предварительно опудренных карборундом. Иммуноферментный анализ на наличие исследуемых вирусов проводили через 4-5 недель после инокуляции (Rusetskiy, 2018).

Молекулярный анализ. Выделение и очистку препаратов ДНК из свежесобраных или замороженных при -70° С листьев картофеля, взятых из среднего яруса куста, проводили после растирания образцов в жидком азоте с помощью стандартного набора для выделения ДНК из растительной ткани («Plant DNA Preparation Kit» производства фирмы «Jena Bioscience», Германия) по методике производителя китов с внесенными нами специально для картофеля незначительными модификациями. Качество и активность препаратов ДНК определяли после спектрофотометрии и электрофореза в агарозном геле, а также основываясь на результатах ПЦР с парой праймеров BCH-2 к консервативной последовательности из гена *bch* гидроксилызы бета-каротина (Brown et al., 2006). Скрининг селекционного материала на наличие R-генов устойчивости к PVY осуществляли с использованием следующих ПЦР-маркеров. Для идентификации гена *Ry_{adg}* использовали SCAR-маркер RYSC3₃₂₁ (Kasai et al., 2000). Наличие в материале гена *Ry_{sto}* выявляли с помощью STS маркера YES3-3A₃₄₁ (Song, Schwarzfischer, 2008), а гена *Ryf-sto* – с помощью CAPS-маркера GP122/*EcoRV*₇₁₈ (Flis et al., 2005). Для детекции гена *Rychc* применяли три маркера: RAPD38-530 (Hosaka et al., 2001), STS маркеры Ry186₅₈₇ (Mori et al., 2011) и Ry364₃₇₀ (Mori et al., 2012).

Для приготовления реакционной смеси для ПЦР использовали *Taq*-ДНК-полимеразу и сопутствующие реактивы производства «ДИАЛАТ» (Москва, Россия) или ОДО «Праймтех» (Минск, Беларусь). Праймеры синтезированы в ОДО «Праймтех». Реакцию рестрикции продуктов амплификации с парой праймеров GP122 проводили с помощью фермента *EcoRV* производства «Thermo Scientific» в буферной среде Red 1× при постоянной температуре 37°С в течение 16 часов.

Разделение продуктов амплификации проводили в 1,5% агарозном геле в трис-ацетатном буфере (ТАЕ) в течение 2,5-3 ч при напряжении 50-60 V и силе тока 6 mA для выявления RAPD маркера 38-530 и 1-1,5 ч при напряжении 80 V и силе тока 6 mA для SCAR, STS и CAPS маркеров. Визуализацию результатов электрофореза осуществляли с использованием трансиллюминатора или прибора для документирования гелей.

При идентификации гена *Rychc* с помощью маркера Ry364 (Mori et al., 2012) в качестве положительного сигнала принимали фрагмент размером 370 пн (размер, соответствующий секвенированной области генома), а не 289 пн, предлагавшийся разработчиками маркера (Voronkova et al., 2017a).

Статистическая обработка данных. Для оценки сопряженности наличия маркеров генов крайней устойчивости к PVY и фенотипическим проявлением признака использовали коэффициент ассоциации r_A (Lakin, 1980).

Результаты

Представленность в коллекции сортов и селекционных линий маркеров генов устойчивости к PVY.

В результате анализа использованных в работе сортов картофеля, известных своей высокой устойчивостью к PVY, установлено, что устойчивость к патогену

сорта польской селекции *Barycz*, *Bazsta* и немецкого сорта *Bonus*, очевидно, обусловлена наличием у них гена *Ryhc*, а у немецкого сорта *Esta* – гена *Rysto*. ДНК-маркер Yes3-3a гена *Rysto* также выявлен у нового сорта белорусской селекции *Першацвет*, а у сорта *Гармония* имелись маркеры генов *Ryhc* и *Ry_{adg}*. У сортов *Рубин* и *Юлия* изучаемые маркеры генов устойчивости к PVY не обнаружены. Ни у одного из сортов не были выявлены ДНК-маркеры *Ry186* гена *Ryhc* и *GP122/EcoRV718* гена *Ryf-sto* (табл. 1).

Таблица 1. ДНК-маркеры генов устойчивости к PVY, выявленные у использованных в работе сортов картофеля

Table 1. DNA markers of PVY resistance genes revealed in the studied potato varieties

Сорт	Гены устойчивости к PVY и соответствующие ДНК-маркеры*					
	<i>Ry_{hc}</i>			<i>Ry_{adg}</i>	<i>Ry_{sto}</i>	<i>Ry_{f-sto}</i>
	<i>Ry364</i>	RAPD 38-530	<i>Ry186</i>	RYSC3	Yes3-3a	GP122/EcoRV718
<i>Barycz</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Bazsta</i>	1	1	0	0	0	0
<i>Bonus</i>	1	1	0	0	0	0
<i>Esta</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Гармония</i>	0	1	0	1	0	0
<i>Першацвет</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Рубин</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Юлия</i>	0	0	0	0	0	0
Итого	3	3	0	1	1	0

*1 – маркер присутствует, 0 – маркер не выявлен

*1 – presence of the marker, 0 – absence of the marker

Оценка коллекции селекционных линий картофеля на наличие маркеров генов экстремальной устойчивости к PVY показала высокий уровень (83,8%) представленности в ней генотипов, обладающих хотя бы одним маркером из изучаемого набора. В среднем на один генотип приходилось 1,8 маркера.

Распределение по встречаемости определенных маркеров было неравномерным. Высокой (49,7%) оказалась в коллекции доля генотипов с маркером RYSC3 гена *Ry_{adg}*. Маркер Yes3-3A гена *Rysto* интрогрессированного от аллотетраплоидного вида *S. stoloniferum*, был выявлен у 29,8% образцов. Напротив, маркер GP122/EcoRV₇₁₈

к другому гену устойчивости *Ryf-sto* от этого дико-го вида был обнаружен лишь в двух образцах: СЛ 196н-31 и 66у09-11. Также редким оказался маркер *Ry186*, способный выявлять гены устойчивости к PVY *Ryhc* от *S. chacoense* и *Ny-smira* от *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* (Tomczyńska et al., 2014). Он обнаружен лишь в восьми СЛ (2,1% коллекции). Причем в семи случаях он присутствовал одновременно с RAPD38-530. Частота двух других маркеров гена *Ryhc* (RAPD38-530 и *Ry364*) в коллекции оказалась высокой: 45,2% и 50,5%, соответственно. Частота СЛ, несущих оба названных маркера, была равной 25,5% (табл. 2).

Таблица 2. Представленность маркеров генов устойчивости к PVY у устойчивых и неустойчивых к вирусу селекционных линий картофеля

Table 2. Representation of markers for PVY resistance genes among resistant and sensitive to the virus potato breeding lines

Наличие/отсутствие маркеров	Количество выявленных образцов (шт.)		
	Имеющих маркер, доля в коллекции (%)	В том числе устойчивых	В том числе неустойчивых
RYSC3	24 (6,4)	22	2
Yes3-3a	12 (3,2)	12	
RAPD38-530	22 (6,0)	22	
Ry364	32 (8,5)	32	
Ry186	1 (0,27)	1	
RAPD38-530 + Ry186	2 (0,53)	1	1
RAPD38-530 + Ry364	27 (7,2)	26	1
RYSC3+ Yes3-3a	15 (4,0)	15	
RYSC3+ RAPD38-530	18 (4,8)	15	3 (2)*
RYSC3+ (RAPD38-530+Ry186)	2 (0,53)	2	
RYSC3+ Ry364	34 (9,0)	32	2
RYSC3+ (RAPD38-530 + Ry364)	32 (8,5)	32	
Yes3-3a+RAPD38-530	12 (3,2)	12	
Yes3-3a+ Ry364	10 (2,7)	10	
Yes3-3a+ (RAPD38-530 + Ry186)	1 (0,27)	1	
Yes3-3a+ (RAPD38-530 + Ry364)	10 (2,7)	10	
RYSC3+ Yes3-3a+RAPD38-530	15 (4,0)	15	
RYSC3+ Yes3-3a+ (RAPD38-30+Ry186)	2 (0,53)	2	
RYSC3+ Yes3-3a+ Ry364	18 (4,8)	17	1
RYSC3+ Yes3-3a+ (RAPD38-530 + Ry364)	27 (7,2)	24	3
Без маркеров	61 (16,2)	55	6
Итого:	376	357	19

* в том числе два образца с устойчивостью гиперчувствительного типа

Сочетание генов устойчивости к PVY из разных источников у образцов коллекции.

Так как частоты СЛ с маркерами Ry186 и GP122/*EcoRV*₇₁₈ были низкими, их при анализе «пирамидирования» генов устойчивости не учитывали. Частоты СЛ, имеющих маркеры генов устойчивости к PVY от двух разных видов картофеля, колебались от 2,7% (маркер Yes3-3а гена *Ry_{sto}* + оба маркера гена *Ryhc*) до 8,5-9,0% (маркер RYSC3 гена *Ry_{adg}* + оба маркера гена *Ryhc* или только маркер Ry364 этого гена, соответственно). Всего в коллекции выявлено 134 СЛ (47,6%), имеющих маркеры генов устойчивости к PVY от двух разных видов. Сочетание четырех маркеров к трем генам различного происхождения (*Ry_{adg}*, *Ry_{sto}* и *Ryhc*) было обнаружено у 27 образцов (7,2%) (табл. 2).

Корреляция между наличием маркеров у СЛ и их устойчивостью к PVY.

Выявлено 13 образцов (3,5%) с ДНК-маркерами генов устойчивости к PVY, которые были неустойчивы к патогену или имели устойчивость гиперчувствительного типа. Как правило, они несли маркер RYSC3 гена *Ry_{adg}*, либо сочетание этого маркера с одним из маркеров гена *Ryhc*. Из числа неустойчивых СЛ выявлено три линии (0,8%), имевшие все четыре маркера к трем генам устойчивости к вирусу. В изученной коллекции селекционных линий представлена значительная доля образцов, которые не имели тестируемых маркеров генов устойчивости к PVY, но оказались устойчивы к вирусу (55 из 61) (табл. 2). В целом по опыту коэффициент ассоциации между устойчивостью к PVY и наличием маркеров генов устойчивости $r_A = 0,096$ (незначим).

Обсуждение

Использованные в работе сорта картофеля по данным фенотипической оценки показали высокую экстремальную устойчивость к PVY. Из литературы известно, что у сорта Esta эта устойчивость обусловлена наличием гена *Ry_{sto}* (Song, Schwarzfischer, 2008). Предполагаемая природа устойчивости к вирусу (наличие маркеров известных генов устойчивости) остальных сортов, в том числе использованных в работе новых сортов белорусской селекции, определена впервые. Как видим, использованные сорта не отличались разнообразием имеющих у них генов устойчивости к PVY: у четырех из них выявлены маркеры гена *Ryhc*, два имели маркер гена *Ry_{sto}* и один сорт – маркер гена *Ry_{adg}*. Поскольку имеется намерение использовать их в селекционных програм-

мах в качестве источников устойчивости к PVY, полученная в работе информация позволит оптимизировать этот процесс (применять МОС к сортам, у которых выявлены маркеры генов устойчивости).

Коллекция проанализированных СЛ выгодно отличалась от сортов высокой частотой маркеров генов устойчивости к PVY, что, очевидно, является результатом селекции, включающей многоступенчатую гибридизацию с привлечением в качестве родительских форм источников соответствующих генов и жесткий отбор в соответствии с фенотипическим проявлением признака. Не была неожиданной насыщенность коллекции образцами с маркерами генов *Ry_{adg}* и *Ryhc*. Первый из этих генов происходит от *S. tuberosum* ssp. *andigenum*, который имеет давнюю историю использования в селекционной практике (Cockerham, 1970; Ross, 1986; Solomon-Blackburn, Barker, 2001b), так как относительно хорошо скрещивается с культурным картофелем. В связи с этим ген *Ry_{adg}* представлен во многих современных сортах и селекционных линиях. Источник гена *Ryhc* диплоидный вид *S. chacoense* также хорошо скрещивается с дигаплоидами культурного картофеля. Он представлен в коллекции Научно-практического центра Национальной академии наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству большим числом оцененных на устойчивость к вирусу генотипов различного происхождения и перспективных линий на их основе. Он активно включался в гибридизацию на протяжении ряда лет.

Как видно из таблицы 2, практически во всех случаях частота генотипов с двумя и более маркерами генов устойчивости к PVY от разных видов была значительно ниже по сравнению с частотами маркеров отдельных генов устойчивости (во всех случаях ниже 10%). Очевидно, эффективность «пирамидирования» генов устойчивости, происходящих из разных источников, с помощью классической селекции картофеля, проводимой на тетраплоидном уровне по данным фенотипической оценки, достаточно низкая. Применение методов МОС позволит существенно повысить эффективность селекции, направленной на создание таких линий, особенно в случае применения отбора на диплоидном уровне с последующим удвоением хромосом у отобранных линий (Vorontkova et al., 2017b).

Тем не менее, в результате скрининга коллекции удалось выделить достаточно большое количество СЛ, имеющих маркеры двух и более генов устойчивости к PVY, в том числе 27 СЛ с маркерами трех изучаемых генов (табл. 2). Среди взятых в анализ сортов картофеля оказались только один сорт с маркерами двух генов устойчивости к PVY (Гармония) (табл. 1).

Создание селекционных линий с комплексом генов, происходящих из разных источников и имеющих разную локализацию в геноме, очень перспективно. Во-первых, они удовлетворяют требованиям так называемой «упреждающей» селекции (Haverkort et al., 2016; Fadina et al., 2017). Во-вторых, использование в селекции линий

с несколькими генами устойчивости к патогену повышает вероятность того, что хотя бы один из них удастся передать потомству.

Отдельного обсуждения заслуживает проблема применимости известных маркеров генов устойчивости для исследования селекционного материала, отличного от простых межсортовых гибридов. В частности, использованную в работе коллекцию СЛ составили образцы с богатой родословной, полученные в результате многоступенчатых скрещиваний межвидовых гибридов с участием нескольких видов картофеля (в том числе *S. tuberosum* ssp. *andigenum*, *S. stoloniferum*, *S. chacoense*, а также *S. acaule*, *S. demissum*, *S. gourlai*, *S. rybinii* и др.) (Rusetskiy, 2018).

Как видно из полученных результатов, в коллекции было выявлено достаточно большое число устойчивых к вирусу образцов, у которых не были детектированы оцениваемые маркеры генов устойчивости. Напротив, наблюдали несколько случаев наличия маркеров генов устойчивости к PVY у неустойчивых образцов. Среди основных причин несовпадения оценок наличия/отсутствия маркера и фенотипического проявления признака, имеющих генетический характер и не связанных с методическими ошибками проведения эксперимента, следует выделить следующее. Очевидно, устойчивость к PVY отдельных СЛ, не имеющих соответствующих маркеров, могла определяться генами, отличными от изучаемых. Например, это могли быть HR-гены. Кроме того, гены крайней (экстремальной) устойчивости к PVY имеются у таких видов как *S. acaule*, *S. demissum* и *S. spegazzinii* Bitter (Ross, 1986), присутствие которых в родословной изученных образцов высоко вероятно. В данном исследовании не проводили анализ на наличие SSR маркера STM1031₂₇₃₊₂₇₅, позволяющего идентифицировать характерный для ряда образцов *S. stoloniferum* локус, ассоциированный с экстремальной устойчивостью к PVY, картированный на хромосоме V (Voronkova et al., 2016).

Наиболее часто встречаемый тип ДНК-маркеров – это фланкирующие ген участки ДНК, наличие которых у гибридных растений из расщепляющейся популяции косегрегирует с фенотипическим проявлением признака. Следовательно, одной из причин неправильных результатов генотипирования СЛ может быть рекомбинация между маркером и самим геном. Это может относиться, например, к маркеру RAPD38-530 гена *Ryhc*, для которого была показана частота рекомбинации 16,3% (Hosaka et al., 2001). Хотя в нашем эксперименте встречаемость маркеров гена *Ryhc* RAPD38-530 и Ry364 среди СЛ была примерно одинаковой, при анализе расщепления в гибридных популяциях, полученных с носителями обоих маркеров, их соотношение в ряде случаев оказалось примерно 2 : 1 (Rusetskiy, Voronkova, 2017). По-видимому, не во всех случаях, когда присутствует один из маркеров, особенно RAPD38-530, может происходить его совместное наследование с геном *Ryhc*. Очевидно, наибольший интерес в качестве источников гена *Ryhc* пред-

ставляют образцы, несущие одновременно оба маркера. Таких образцов в исследованной коллекции оказалось 96 (25,5%).

Появление ложно-положительных результатов, в частности, с участием образцов-носителей гена *Ryhc* может быть связано с их чувствительностью к некоторым рекомбинантным штаммам PVY. В работе Н. Зотеевой (Zoteyeva et al., 2012) было показано, что разные генотипы *S. chacoense* по-разному реагировали на комплексное заражение PVY: часть генотипов оказалась устойчивой ко всем штаммам, тогда как некоторые из них проявляли устойчивость к одним штаммам и чувствительность к другим.

В некоторых случаях ДНК-маркеры выявляют области консервативных последовательностей, характерные не только для гена, к которому они создавались, но и для других генов, связанных с устойчивостью к разным патогенам. К таким маркерам относится, например, маркер гена *Ry^{adg}* RYSC3 (Sorri et al., 1999; Kasai et al., 2000). Маркер RAPD38-530 гена *Ryhc* может проявлять специфичность не только к этому гену, но и в отношении генов гиперчувствительного типа (*Ny*). Созданный на его основе маркер Ry186 оказался пригодным для выявления гена *Nysmira*, происходящего, скорее всего, от *S. tuberosum* и впервые выявленного в сорте Sargo Mira (Tomczyńska et al., 2014).

Как маркеры, фланкирующие ген, так и внутригенные маркеры могут не выявлять аллельные варианты гена или прилегающих к нему областей генома, которые имеют структурные различия по сравнению с теми, что использовались при разработке маркеров. Следует иметь в виду, что маркеры разрабатываются для определенных случаев интрогрессии генов устойчивости. Если маркированный ген представлен в коммерческих сортах, происходящих от одной линии, то он будет эффективно выявляться с помощью соответствующего маркера. Однако этот маркер может оказаться неэффективным по отношению к сортам, ведущим свое происхождение от других образцов дикого вида. Например, маркер гена *Ry_{sto}* Yes3-3A, созданный на основе AFLP фрагмента ДНК, ассоциированного с ER в расщепляющейся популяции гибридов немецкого сорта Assia, с высокой точностью идентифицировал этот ген и в других устойчивых к PVY сортах немецкой селекции, а также некоторых венгерских и польских сортах, и в селекционных линиях, происходящих от *S. stoloniferum*. В то же время он не был обнаружен в устойчивых к PVY сортах голландской селекции Corine и Sante, ведущих свое происхождение от другого образца этого дикого вида (Song, Schwarzfischer, 2008).

Сказанное выше не ставит под сомнение возможность широкого применения ДНК-маркеров для детекции генов устойчивости из разных источников. В частности, Д. П. Т. Валконен с соавторами (Valkonen et al., 2008) показали пригодность известных маркеров ER к PVY (Song et al., 2005; Flis et al., 2005) для идентификации гена *Ry_{sto}* в селекционном материале Международно-

го центра по картофелю. Как видно из результатов настоящего исследования, экстремальная устойчивость к PVY большинства изученных СЛ (302 из 357) очевидно обусловлена наличием у них известных генов устойчивости к этому патогену, которые выявляются с помощью использованных в работе ДНК-маркеров.

Несмотря на отмеченные в работе расхождения в оценках, связанных с наличием/отсутствием маркеров генов устойчивости к PVY и фенотипическим проявлением признака, следует признать, что количество имеющих маркеры неустойчивых образцов в настоящем эксперименте оказалось относительно небольшим (13 образцов, 3,5%). Можно признать это приемлемым уровнем для первичного маркер-опосредованного отбора исходного селекционного материала. Низкий коэффициент ассоциации между этими оценками был обусловлен большим количеством устойчивых СЛ (55 образцов), не имеющих маркеров генов устойчивости к PVY. Аналогичная закономерность была отмечена в работе Е. В. Рогозиной с соавторами (Rogozina et al., 2019) при исследовании межвидовых гибридов картофеля. Устойчивые к PVY селекционные линии, не имеющие маркеров генов устойчивости к PVY, отмечены также в работах А.К. Фулладолса и К. Ни с соавторами (Fulladolsa et al., 2015; Nie et al., 2016) и других. Такие линии могут представлять интерес для селекции. Однако применительно к ним не могут быть использованы методы маркер-опосредованного отбора.

Заключение

Полученные в настоящем исследовании данные о наличии маркеров генов устойчивости к PVY и комбинации генов устойчивости разного происхождения у ряда образцов коллекции призваны обеспечить более эффективное их использование в селекции по сравнению с устойчивыми к вирусу линиями, не имеющими соответствующих маркеров. Результаты проведенного генотипирования, фенотипической оценки отобранных по маркерам генов устойчивости к PVY СЛ, а также последующая оценка аллельного состояния имеющихся у них генов устойчивости по данным анализа наследования соответствующих ДНК-маркеров у их потомства позволят отобрать наиболее ценные родительские линии для выведения устойчивых к вирусам сортов картофеля.

References/Литература

Biryukova V.A., Smyglya I.V., Abrosimova S.B., Zapkina T.I., Meleshin A.A., Mityushkin A.V., Manakov V.V. Search for sources of resistance to pathogens among the accessions of Lorch Potato Research Institute genetic and breeding collections by means of molecular markers. *Zaschita Cartofelia = Potato Protection*. 2015;(1):3-7 [in Russian] (Бирюкова В.А., Шмы-

- гля И.В., Абросимова С.Б., Запкина Т.И., Мелешин А.А., Митюшкин А.В., Манаков В.В. Поиск источников устойчивости к патогенам среди образцов селекционно-генетических коллекций ВНИИКС с использованием молекулярных маркеров. *Защита картофеля*. 2015;(1):3-7).
- Blotskaya Zh.V. Strain-specificity of potato virus Y (PVY) (Shtammospetsificheskiye osobennosti Y-virusa kartofelya (PVY)). *Zemledelie i Zaschita Rasteniy = Crop Farming and Plant Protection*. 2014;(4):49-50 [in Russian] (Блоцкая Ж.В. Штаммоспецифические особенности Y-вируса картофеля (PVY)). *Земледелие и защита растений*. 2014;(4):49-50).
- Brown C.R., Kim T.S., Ganga Z., Haynes K., De Jong D., Jahn M., Paran I., De Jong W. Segregation of total carotenoid in high level potato germplasm and its relationship to beta-carotene hydroxylase polymorphism. *American Journal of Potato Research*. 2006;83(5):365-372. DOI: 10.1007/BF02872013
- Cockerham G. Genetical studies on resistance to potato viruses X and Y. *Heredity*. 1970;25(3):309-348. DOI: 10.1038/hdy.1970.35
- De Ronde D., Butterbach P., Kormelink R. Dominant resistance against plant viruses. *Frontier of Plant Science*. 2014;5:307. DOI: 10.3389/fpls.2014.00307
- Fadina O.A., Beketova M.P., Sokolova M.A., Smetanina T.I., Rogozina E.V., Khavkin E.E. Anticipatory breeding: molecular markers as a tool in developing donors of potato (*Solanum tuberosum* L.) late blight resistance from complex interspecific hybrids. *Agricultural Biology*. 2017;52(1):84-94 [in Russian] (Фадина О.А., Бекетова М.П., Соколова Е.А., Кузнецова М.А., Сметанина Т.И., Рогозина Е.В., Хавкин Э.Е. Упреждающая селекция: использование молекулярных маркеров при создании доноров устойчивости картофеля (*Solanum tuberosum* L.) к фитофторозу на основе сложных межвидовых гибридов. *Сельскохозяйственная биология*. 2017;52(1):84-94). DOI: 10.15389/agrobiology.2017.1.84rus
- Flis B., Hennig J., Strzelczyk-Żyta D., Gebhardt C., Marczewski W. The *Ry-fsto* gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistant to *Potato virus Y* maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122₁₈ in PVY resistant potato cultivars. *Molecular Breeding*. 2005;15(1):95-101. DOI: 10.1007/s11032-004-2736-3
- Fulladolsa A.C., Navarro F.M., Kota R., Severson K., Palta J.P., Charkowski A.O. Application of marker assisted selection for *Potato virus Y* resistance in the University of Wisconsin Potato Breeding Program. *American Journal of Potato Research*. 2015;92(3):444-450. DOI: 10.1007/s12230-015-9431-2
- Fulladolsa A.C., Charkowski A., Cai X., Whitworth J., Gray S., Jansky S. Germplasm with resistance to potato virus Y derived from *Solanum chacoense*: clones M19 (39-7) and M20 (XD3). *American Journal of Potato Research*. 2019;96(4):390-395. DOI: 10.1007/s12230-019-09719-6
- Haverkort A.J., Boonekamp P.M., Hutten R., Jakobsen E., Lotz L.A.P., Kessel G.J.T., Vossen J.H., Visser R.G.F. Durable late blight resistance in potato through dynamic varieties obtained by cisgenesis: scientific and societal advances in the DuRPh Project. *Potato Research*. 2016;59(1):35-66. DOI: 10.1007/s11540-015-9312-6
- Hosaka K., Hosaka Y., Mori M., Maida T., Matsunaga H. Detection of simplex RAPD marker linked to resistance to *potato virus Y* in tetraploid potato. *American Journal of Potato Research*. 2001;78(3):191-196. DOI: 10.1007/BF02883544
- Ivanjuk V.G., Banadysev S.A., Zhuromsky G.K. Protecting potatoes from diseases, pests and weeds (*Zaschita kartofelya ot bolezney, vreditel'ey i sornyakov*). Minsk: Belprint; 2005. p.420-466 [in Russian] (Иванюк В.Г., Банадысев С.А., Журомский Г.К. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. Минск: Белпринт; 2005. С.420-466).
- Kasai K., Morikawa Y., Sorri V.A., Valkonen J.P.T., Gebhardt C., Watanabe K.N. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene *Ry^{adg}* based on a common feature of plant disease resistance genes. *Genome*. 2000;43(1):1-8. DOI: 10.1139/g99-092
- Lakin G.F. Biometrics (Биометрия). Moscow: Vysshaya shkola; 1980. p.176-177 [in Russian] (Лакин Г.Ф. Биометрия. Москва: Высшая школа; 1980. С.176-177).
- Mori K., Sakamoto Yu., Mukojima N., Tamiya S. Development of a multiplex PCR method for simultaneous detection of diagnostic

- DNA markers of five disease and pest resistance genes in potato. *Euphytica*. 2011;180(3):347-355. DOI: 10.1007/s10681-011-0381-6.
- Mori K., Mukojima N., Nakao T., Tamiya S., Sakamoto Y., Soharu N., Hayashi K., Watanuki H., Nara K., Yamazaki K., Ishii T., Hosaka K. Germplasm release: Saikai₅₅, a male and female fertile breeding line carrying *Solanum Phureja*-derived cytoplasm and potato cyst nematode resistance (*HI*) and potato virus Y resistance (*Ryhc*) genes. *American Journal of Potato Research*. 2012;89(1):63-72. DOI: 10.1007/s12230-011-9221-4
- Nie X., Sutherland D., Dickson V., Singh M., Murphy A.M., De Koeber D. Development and validation of high-resolution melting markers derived from *Ry_{sto}* STS markers for high-throughput marker-assisted selection of potato carrying *Ry_{sto}*. *Phytopathology*. 2016;106(11):1366-1375. DOI: 10.1094/PHYTO-05-16-0204-R
- Ottoman R.J., Hane D.C., Brown C.R., Yilma S., Mosley A.R., Vales M. Validation and implementation of marker-assisted selection (MAS) for PVY resistance (*Ry_{adg}* gene) in tetraploid potato breeding. *American Journal of Potato Research*. 2009;86(4):304-314. DOI: 10.1007/s12230-009-9084-0
- Rogozina E.V., Terentjeva E.V., Potokina E.K., Yurkina E.N., Nikulin A.V., Alekseev Ya.I. Multiplex PCR-based identification of potato genotypes as donors in breeding for resistance to diseases and pests. *Agricultural Biology*. 2019;54(1):19-30 [in Russian] (Рогозина Е.В., Терентьева Е.В., Потоккина Е.В., Юркина Е.Н., Никулин А.В., Алексеев Я.И. Идентификация родительских форм для селекции картофеля, устойчивого к болезням и вредителям, методом мультиплексного ПЦР-анализа. *Сельскохозяйственная биология*. 2019;54(1):19-30). DOI: 10.15389/agrobiology.2019.1.19rus
- Ross H. Potato breeding – problems and perspectives. Berlin, Hamburg: Paul Parey, Advances in Plant Breeding series no. 13; 1986. 132 p.
- Rusetskiy N.V. Initial material assessment of potatoes for immunity to potato viruses (Otsenka iskhodnogo materiala kartofelya na immunitet k virusam kartofelya). In: *Kartofelevodstvo = Potato-Growing: proceedings*. Minsk; 2018. Vol. 26. p.101-111 [in Russian] (Русецкий Н.В. Оценка исходного материала картофеля на иммунитет к вирусам картофеля. В кн.: *Картофельводство: сборник научных трудов*. Минск; 2018. Т. 26. С.101-111).
- Rusetskiy N.V., Voronkova E.V. Initial potato material screening for resistance to PVY and PVX and study of the nature of its inheritance for the use as donor of this character in breeding for virus resistance (Vydeleniye iskhodnogo materiala kartofelya na ustoychivost k virusam PVY i PVX i izucheniye kharaktera yeye nasledovaniya dlya ispolzovaniya v kachestva donorov priznaka v selektsii na virusoustoychivost.). In: *Kartofelevodstvo = Potato-Growing: proceedings*. Minsk; 2017. Vol. 25. p.82-93 [in Russian] (Русецкий Н.В., Воронкова Е.В. Выделение исходного материала картофеля на устойчивость к вирусам PVY и PVX и изучение характера ее наследования для использования в качестве доноров признака в селекции на вирусоустойчивость. В кн.: *Картофельводство: сборник научных трудов*. Минск; 2017. Т. 25. С.82-93).
- Sato M., Nishikawa K., Komura K., Hosaka K. Potato virus Y resistance gene, *Ryhc*, mapped to the distal end of potato chromosome 9. *Euphytica*. 2006;149(3):367-372. DOI: 10.1007/s10681-006-9090-y
- Scholthof K.G., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C., Foster G.D. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 2011;12(9):938-954. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x
- Solomon-Blackburn R.M., Barker H. A review of host major-gene resistance to potato viruses X, Y, A and V in potato: genes, genetics and mapped location. *Heredity*. 2001a;86(1):8-16. DOI: 10.1046/j.1365-2540.2001.00798.x
- Solomon-Blackburn R.M., Barker H. Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a review of traditional and molecular approaches. *Heredity*. 2001b;86(1):17-35. DOI: 10.1046/j.1365-2540.2001.00799.x
- Song Ye-S., Hepting L., Schweizer G., Hartl L., Wenzel G., Schwarzfischer A. Mapping of extreme resistance to PVY (*Ry_{sto}*) on chromosome XII using anther-culture-derived primary dihaploid lines. *Theoretical and Applied Genetics*. 2005;111(5):879-887. DOI: 10.1007/s00122-005-0010-7
- Song Ye-S., Schwarzfischer A. Development of STS markers for selection of extreme resistance (*Ry_{sto}*) to PVY and maternal pedigree analysis of extremely resistant cultivars. *American Journal of Potato Research*. 2008;85(5):159-170. DOI: 10.1007/s12230-008-9044-0.
- Sorri V.A., Watanabe K.N., Valkonen J.P.T. Predicted kinase-3a motif of a resistance gene analogue as a unique marker for virus resistance. *Theoretical and Applied Genetics*. 1999;99(1):164-170.
- Tomczyńska I., Jupe F., Hein I., Marczewski W., Śliwka J. Hypersensitive response to *Potato virus Y* in potato cultivar Sarpo Mira is conferred by the *Ny-Smira* gene located on the long arm of chromosome IX. *Molecular Breeding*. 2014;34(2):471-480. DOI: 10.1007/s11032-014-0050-2
- Vales M.I., Ottoman R.J., Ortega J.A., Yilma S., Karaagac E. Marker-Assisted Selection for PVY resistance in tetraploid potato. *Acta Horticulturae*. 2010;859:409-416. DOI:10/17660/ActaHortic.2010.859.50
- Valkonen J.P.T., Wiegmann K., Hämäläinen J.H., Marczewski W., Watanabe K.N. Evidence for utility of the same PCR-based markers for selection of extreme resistance to *Potato virus Y* controlled by *Ry_{sto}* of *Solanum stoloniferum* derived from different sources. *Annual Applied Biology*. 2008;152(1):121-130. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2007.00194.x
- Voronkova E., Luksha V., Gukasian O., Levy A., Yermishin A. Novel DNA locus associated with PVY resistance in potato is mapped to chromosome V. In: *16th Triennial Meeting of the Virology Section of the EAPR and 8th Annual Meeting of PVY/WIDE Organization*; 2016 May 31 - June 3; Lubljana, Slovenia. Lubljana; 2016. p.30.
- Voronkova E.V., Luksha V.I., Rusetskiy N.V., Gukasyan O.N., Zharich V.M., Polyukhovich Yu.V., Yermishin A.P. Marker assisted selection of genotypes with *Ryhc* gene of extreme resistance to PVY in genotypes collection with *Solanum chacoense* germplasm in their pedigree. In: *Kartofelevodstvo = Potato Growing: proceedings*. Minsk; 2017a. Vol. 25. p.47-59 [in Russian] (Воронкова Е.В., Лукша В.И., Русецкий Н.В., Гукасян О.Н., Жарич В.М., Полухович Ю.В., Ермишин А.П. Маркер-опосредованный отбор на наличие гена *Ryhc* экстремальной устойчивости к PVY в коллекции генотипов, имеющих в родословной генетический материал *Solanum chacoense*. В кн.: *Картофельводство: сборник научных трудов*. Минск; 2017a. Т. 25. С.47-59).
- Voronkova E.V., Luksha V.I., Gukasyan O.N., Polyukhovich Yu.V., Zharich V.M., Yermishin A.P. Use of mitotic chromosome doubling *in vitro* for production of potato multiplex parental lines. In: *Molekulyarnaya i Prikladnaya Genetika = Molecular and Applied Genetics: proceedings*. Minsk; 2017b. Vol. 22. p.62-75 [in Russian] (Воронкова Е.В., Лукша В.И., Гукасян О.Н., Полухович Ю.В., Жарич В.М., Ермишин А.П. Использование митотической полиплоидизации *in vitro* для создания мультиплексных родительских линий картофеля. В кн.: *Молекулярная и прикладная генетика: сборник научных трудов*. Минск; 2017b. Т. 22. С.62-75).
- Zimnoch-Guzowska E., Yin Zh., Chrzanovska M., Flis B. Sources and effectiveness of potato PVY resistance in IHAR's breeding research. *American Journal of Potato Research*. 2013;90(1):21-27. DOI: 10.1007/s12230-012-9289-5
- Zoteyeva N., Chrzanovska M., Flis B., Zimnoch-Guzowska E. Resistance to pathogens of the potato accessions from the collection of N. I. Vavilov Institute of Plant Industry (VIR). *American Journal of Potato Research*. 2012;89(4):277-293. DOI: 10.1007/s12230-012-9252-5

ХАРАКТЕРИСТИКА РЕДИПЛОИДНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ СЕЛЕКЦИИ ВИР ПО КОМБИНАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ И РЕАКЦИИ НА ЦМС

Хатефов Э.Б.^{1*}, Шомахов Б.Р.², Кушхова Р.С.²,
Кудаев Р.А.², Хаширова З.Т.², Гяургиев А.Х.²

¹ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44;
✉ *haed1967@rambler.ru

² Институт сельского хозяйства – филиал Кабардино-Балкарского научного центра РАН, 360004 Кабардино-Балкарская республика, г. Нальчик, ул. Кирова, 224;
✉ kbniish2007@yandex.ru

Актуальность. Селекция гибридной кукурузы требует постоянного обновления исходного материала. В этой связи к числу приоритетных задач селекции культуры относится расширение спектра генетической изменчивости родительских линий, используемых при создании гетерозисных гибридов. Инновационным подходом для решения этой проблемы является получение редиплоидных линий из тетраплоидной популяции. **Результаты.** Материалом исследования служили 106 редиплоидных линий, которые были созданы с использованием метода разложения популяции триплоидов, полученных от скрещивания растений тетраплоидной популяции с широкой генетической основой и диплоидной линии, с последующим отбором диплоидных форм. В системе скрещиваний с 37 стерильными тестерами различных групп спелости ФАО дана оценка комбинационной способности редиплоидных линий и изучена реакция на ЦМС М- и С-типов. Полевые испытания проведены в условиях степной зоны Кабардино-Балкарии в 2019 году. Выделено 46 линий (43,3%) с комбинационной способностью в диапазоне от сверхвысокой до хорошей и 78 линий (73,6%), закрепляющих признак ЦМС. Среди них 59 линий (55,7%) закрепляли стерильность при ЦМС М-типа, 15 линий (14,1%) - при ЦМС С-типа и 4 линии закрепляли стерильность при обоих типах ЦМС, 16 линий (15,1%) восстанавливали фертильность при ЦМС М-типа, 11 линий (10,4%) - при ЦМС С-типа и одна линия оказалась универсальным восстановителем фертильности пыльцы. Ранжирование по продолжительности межфазного периода «всходы - цветение початков» показало, что большая часть линий, характеризующихся способностью закреплять стерильность или восстанавливать мужскую фертильность при М- и С-типах ЦМС (66,0%), а также комбинационной способностью от сверхвысокой до хорошей (32,6%) находится в группе с продолжительностью периода цветения початков 51-55 дней. По результатам оценки уборочной влажности зерна выделены гибриды ♀(РГС246с × OL213) × ♂92с5986_{2,3}, ♀714М × ♂1/67₁ и ♀714М × ♂92н136₄, со значениями 13,6%, 13,9%, 14,0% соответственно, а максимальными значениями селекционного индекса отличались гибриды ♀714М × ♂1/67₁, ♀(OL563С × KL1392) × ♂92с0653_{2,1,2} (5,03 и 5,13 соответственно). **Заключение.** Редиплоидные линии кукурузы перспективны для использования в качестве исходного материала для селекции гибридной кукурузы.

Ключевые слова: *Zea mays* L., гибридизация, цитоплазматическая мужская стерильность, тесткроссы, селекционная ценность, селекционно ценные признаки, урожай зерна, влажность зерна.

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/10.30901/2658-6266-2019-4-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

COMBINING ABILITY AND RESPONSE TO CMS IN REVERSE DIPLOID MAIZE LINES DEVELOPED AT VIR

Khatefov E.B.^{1*}, Shomakhov B.R.², Kushkhova R.S.²,
Kudaev R.A.², Khashirova Z.T.², Gyaurgiev A.Kh.²

¹ N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia;
✉ *haed1967@rambler.ru

² Institute of Agriculture - a branch of the Kabardino-Balkarian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, 224, Kirova Street, Nalchik 360004, Kabardino-Balkarian Republic;
✉ kbniish2007@yandex.ru

Abstract. Hybrid maize breeding requires constant renewal of the source material. In this regard, broadening of genetic variation in parental lines is one of the primary tasks in heterotic hybrid breeding programs. The use of reverse diploid inbred lines derived from a tetraploid population is considered as an innovative approach to achieve this goal. **Results.** The investigated material comprised 106 reverse diploid (rediploid) inbred lines originating from diploid plants selected in segregating selfed progenies of triploid populations and consequently subjected to inbreeding, while triploid populations resulted from a cross between plants of a tetraploid population with a broad genetic basis and a diploid line. The use of a system of crosses with 37 sterile testers belonging to different FAO maize maturity groups allowed the evaluation of the rediploid lines' combining ability and the response to M and C types of CMS. Field tests were conducted in 2019 in the steppe zone of Kabardino-Balkaria. Forty-six lines (43.3%) with the combining ability ranging from ultra-high to good, and 78 lines (73.6%) maintaining the CMS character were identified. Among them, 59 lines (55.7%) were maintainers for the M type CMS, 15 lines (14.1%) for C type CMS, and 4 lines maintained sterility for both CMS types. Sixteen lines (15.1%) restored pollen fertility of the forms with M type CMS, 11 lines (10.4%) were restorers for the C-type and one line turned out to be a universal restorer for both CMS types. Ranking by the "sprout - flowering of ears" interstage period duration showed that most of the lines (66.0%) with the ability to maintain sterility or restore male fertility of M and C CMS types, as well as with the combining ability from ultrahigh to good (32.6%) fell into the group with the flowering period duration of 51-55 days. According to the results of the harvested grain moisture assessment, the hybrids ♀(РГС246с × OL213) × ♂92с5986_{2,3}, ♀714М × ♂1/67₁ and ♀714М × ♂92н136₄, with the values of 13, 6%, 13.9%, 14.0%, respectively, were identified. The hybrids ♀714М × ♂1/67₁ and ♀(OL563С × KL1392) × ♂92с0653_{2,1,2} were characterized by the maximum value of the selection index, i.e. 5.03 and 5.13, respectively. **Conclusions.** The results of the studies showed the breeding value of rediploid lines as an initial material for hybrid maize breeding.

Keywords: *Zea mays* L., hybridization, cytoplasmic male sterility, testcrosses, breeding value, important breeding traits, grain yield, grain moisture.

Для цитирования: Хатефов Э.Б., Шомахов Б.Р., Кушхова Р.С., Кудаев Р.А., Хаширова З.Т., Гяургиев А.Х. Характеристика редиплоидных линий кукурузы селекции ВИР по комбинационной способности и реакции на ЦМС. *Биотехнология и селекция растений*. 2019;2(4):15-23. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-4-o2

For citation: Khatefov E.B., Shomakhov B.R., Kushkhova R.S., Kudaev R.A., Khashirova Z.T., Gyaurgiev A.Kh. Combining ability and response to CMS in reverse diploid maize lines developed at VIR. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(4):15-23. (In Russ.) DOI: 10.30901/2658-6266-2019-4-o2

ORCID:

Khatefov E.B. <https://orcid.org/0000-0001-5713-2328>

УДК 575.222.7:635.25/26

Поступила в редакцию: 18.11.2019

Принята к публикации: 25.12.2019

Введение

При создании гибридов кукурузы необходимо постоянно обновлять исходный материал. В этой связи одной из основных задач селекции культуры является расширение спектра генетической изменчивости родительских линий, используемых при создании гетерозисных гибридов. Поэтому поиск новых методов, направленных на расширение генетического разнообразия исходного селекционного материала весьма актуален. Для этого применяются различные методы и подходы, в том числе искусственный мутагенез и полиплоидию. В мейозе тетраплоида гомологичные хромосомы образуют мультивалентные ассоциации в виде квадριвалентов и тривалентов. При этом, происходит кроссинговер между гомологичными участками всех хромосом, вовлеченных в мультивалентную ассоциацию. Число полиморфных вариантов хромосом, возникших в результате кроссинговера в квадριвалентных ассоциациях, характерных для мейоза у тетраплоида, выше, чем у диплоидного организма, у которого кроссинговер происходит в бивалентах (Alberts et al., 1987; Rodionov, 2013). Следовательно, можно ожидать, что диплоидные (редиплоидные) линии, полученные при разложении (редиплоидизации) такой тетраплоидной популяции, будут обладать более высоким уровнем генетического полиморфизма по сравнению с производными простых парных скрещиваний.

Впервые возможность редиплоидизации тетраплоидных геномов кукурузы с использованием гаплоиндукторов была показана Э. Б. Хатефовым и О. А. Шацкой (Khatefov, Shatskaya, 2007). Практическое получение восстановленных диплоидных (редиплоидных) линий кукурузы из тетраплоидных популяций было осуществлено Э.Б. Хатефовым в 2010 г. методом разложения популяций триплоидов, полученных от скрещивания растений тетраплоидной популяции с широкой генетической основой и диплоидной линии, на редиплоидные субпопуляции (Khatefov et al., 2018). Для вовлечения в гибридную селекцию нового исходного селекционного материала необходимо всесторонне изучить его селекционно ценные признаки и, в том числе, комбинационную способность и реакцию на цитоплазматическую мужскую стерильность (ЦМС).

Явление ЦМС нашло широкое применение в селекции и семеноводстве гибридной кукурузы. Она передается потомству в течение неопределенно многих поколений только по материнской линии и поэтому называется цитоплазматической. Признак мужской стерильности растений кукурузы проявляется в фенотипе в виде отсутствия выхода пыльников из мужских цветков на метелке, либо наличия в пыльниках нежизнеспособной пыльцы. В селекционной практике кукурузы описано свыше 130 различных источников ЦМС (Krupnov, 1973; Gorbacheva, 2019) из которых в практической селекции нашли широ-

кое применение техасский (Т), боливийский (Б), как один из аналогов техасского типа, молдавский (М) и си (С), обнаруженный в сорте Charrua из Бразилии (Gontarovskiy, 1980; Beckett, 1971). Различные типы стерильности различаются по фенотипическому проявлению. Контроль признаков стерильности и восстановления фертильности при каждом типе осуществляется разными генами. Для ЦМС Т-типа это гены *Rf1* и *Rf2*, для Б -типа – *Rf1* и *Rfvar*, для М-типа – *Rf3*, для С – три комплементарных доминантных гена *Rf4*, *Rf5* и *Rf6* (Beckett, 1971; Gorbacheva, 2019) при их взаимодействии с митохондрионом, который определяет тип цитоплазмы материнского растения. В настоящее время в практической селекции используется ЦМС М- и С-типа. На территории России с 1990 года Т-тип ЦМС запрещен для использования в семеноводстве гибридной кукурузы из-за его восприимчивости к расе Т *Helminthosporium maydis* Y. Nisik & C.

Селекционная ценность линий для использования в качестве родителей при создании гибридов определяется не только их реакцией на ЦМС, но и комбинационной способностью (Tarutina et al., 1991; Sprague, Tatum, 1942). Комбинационная способность – это свойство линии или сорта давать гетерозисное потомство при скрещивании с разными линиями (или гибридами). Комбинационная способность детерминирована многими генами и имеет градации от очень высокой до низкой. Различают комбинационную способность общую (ОКС) и специфическую (СКС). Влияние аддитивных эффектов генов способствует общей, а специфическая комбинационная способность зависит от доминантных и эпистатических эффектов генов (Sprague, Tatum, 1942; Anashenkov, 2012).

Цель настоящего исследования - определение селекционной ценности редиплоидных линий на основе оценки их комбинационной способности и реакции на М- и С-типы ЦМС в системе тестерных скрещиваний.

Материал и методы

Материалом исследования служили потомства от скрещиваний между 106 редиплоидными линиями селекции ВИР со стерильными тестерами на основе М- и С- типов ЦМС (25 и 12 тестеров соответственно) селекции Всероссийского научно исследовательского института кукурузы, Научного центра зерна им. П. П. Лукьяненко, агрофирмы ОТБОР и Института сельского хозяйства – филиала Кабардино-Балкарского научного центра РАН, относящихся к различным группам спелости по классификации ФАО (Food Agricultural Organization, <http://www.fao.org>, таблица 1). Всего изучены 1152 гибридные комбинации. В качестве стандартов были использованы гибриды F₁ Машук 171 МВ, P8521, Дарина МВ, Машук 220 МВ, Машук 355 МВ, Краснодарский 291 АМВ, ДКС 5007, Машук 355 МВ, Камила СВ.

Таблица 1. Стерильные линии и гибриды, использованные в качестве тестеров

Table 1. Sterile tester lines and hybrids

№ п/п	Тестер	Группа спелости ФАО	Тип ЦМС	Оригинатор
1	АльфаМ	140	М	ВНИИК
2	RG106M×OL245	150	М	ООО ИПА Отбор
3	Миленам	170	М	ВНИИК
4	МадоннаМ	170	М	ВНИИК
5	Мирт М	180	М	ВНИИК
6	703М*	200	М	НЦЗ им.П.П.Лукьяненко
7	OL273М × PH53*	200	М	ООО ИПА Отбор
8	OL273М × 346зМ*	200	М	ООО ИПА Отбор
9	РГС 246С × OL213*	200	С	ООО ИПА Отбор
10	(98с × OL245)*	200	С	ООО ИПА Отбор
11	МальвинаС*	220	С	ВНИИК
12	714М*	220	М	НЦЗ им.П.П.Лукьяненко
13	OL3104М × OL389	250	М	ООО ИПА Отбор
14	OL273М × OL3104зМ	250	М	ООО ИПА Отбор
15	OL3104М × OL213	250	М	ООО ИПА Отбор
16	P346М*	250	М	ООО ИПА Отбор
17	OL273М	250	М	ООО ИПА Отбор
18	A679М × OL320	300	М	ООО ИПА Отбор
19	SSS-2М × OL276	300	М	ООО ИПА Отбор
20	SSS-2М × OL2	300	М	ООО ИПА Отбор
21	МаяМ	350	М	ВНИИК
22	МагнолияС	400	С	ВНИИК
23	OL409М × OL563	400	М	ООО ИПА Отбор
24	OL563С × OLVO3	400	М	ООО ИПА Отбор
25	OL563С × A679зМ	400	М	ООО ИПА Отбор
26	A679М	400	М	ООО ИПА Отбор
27	OL563С × OL510	450	С	ООО ИПА Отбор
28	КалендулаС	450	С	ИСХ КБНЦ РАН
29	OL563С × SMA11*	500	С	ООО ИПА Отбор
30	OL563М × SMA11*	500	М	ООО ИПА Отбор
31	OL563С*	500	С	ООО ИПА Отбор
32	OL703М × OL510	500	С	ООО ИПА Отбор
33	OL563С × KL1392*	500	С	ООО ИПА Отбор
34	OL563С × KL1120	500	С	ООО ИПА Отбор
35	OL703М*	500	М	ООО ИПА Отбор
36	OL563М*	500	М	ООО ИПА Отбор
37	B73С*	600	С	ИСХ КБНЦ РАН

* Тестеры, показавшие в комбинации с редиплоидными линиями высокую комбинационную способность и высокую урожайность гибридного потомства.

Редиплоидные линии были получены в результате размножения потомства триплоидных растений, полученных от скрещивания растений тетраплоидной популяции МРПП-20 и диплоидной раннеспелой линии кукурузы, с последующим инцухтом и выделением из расщепляющегося потомства в F₂ истинных диплоидных генотипов, а также их длительным инцухтом до I_{7,8}. Тетраплоидная популяция МРПП-20 получена методом отбора на повышенную семенную продуктивность початка из тетрапло-

идной популяции, созданной В. С. Щербаком в КНИИСХ им. П. П. Лукьяненко на основе синтетической популяции Synthetic-B, сорта Кубанская сахарная и 1/8 *Zea perennis* Hitch (Khatfov, Scherbak, 2002).

Анализ уровня фертильности пыльцы гибридных растений проводили по 7 бальной шкале, предложенной Г. С. Галеевым (Galeev, 1962), согласно которой:

балл 0 – полная стерильность, пыльники сильно дегенерированы, не содержат жизнеспособной пыльцы и не

выходят из колосков;

балл 1 – в период цветения единичные пыльники (до 12%) выходят из колосков, но они остаются закрытыми;

балл 2 – в период цветения пыльники выходят из колосков (до 25%), но остаются закрытыми;

балл 3 – единичные пыльники открыты и выбрасывают пыльцу, метелка (мужское соцветие) почти вся (до 37%) стерильна;

балл 4 – до 50% пыльников на соцветии нормально развиты, хорошо пылят, образуют много пыльцы;

балл 5 – стерильны единичные пыльники;

балл 6 – все пыльники открыты и пылят, цветение проходит нормально.

Растениям кукурузы с полной стерильностью соответствуют баллы 0, 1, 2. Баллы 3 и 4 характеризуют полустерильные метелки с частично восстановленной фертильностью. Баллы 5 и 6 соответствуют полному восстановлению фертильности.

Исследования проводили на территории Кабардино-Балкарского опорного пункта ВИР в опытно-производственном хозяйстве (ОПХ) «Опытное» при Институте сельского хозяйства – филиале Кабардино-Балкарского (КБР) научного центра РАН в 2019 году. Семена высевали вручную, широкорядным способом (70x35см) по 2 растения в лунке с последующим ручным прореживанием до расчетной густоты стояния растений к уборке в перерасчете на 1 га 72 тыс. шт./га. Учетная площадь делянки – 4,9 м², повторность – двукратная, расположение на участке рандомизировано, число учтенных в каждом варианте растений – 15 шт. Почвенно-климатические условия опыта соответствовали требованиям роста и развития кукурузы (табл. 2). Почвы в степной зоне представлены обыкновенными черноземами (без достаточного увлажнения). Содержание в почве гумуса 3–3,5%, подвижного фосфора 15,6–28,7 мг/кг, обменного калия 200–300 мг/кг (по методу Б.П. Мачигина; Magnitsky, 1972). Реакция почвы слабощелочная (pH 7,6–8,0).

Таблица 2. Метеорологические условия в течение вегетационного периода 2019 г.

Table 2. Meteorological conditions during the growing season in 2019

Месяцы	Осадки по декадам, мм					t° воздуха за месяц, °C						
	I	II	III	всего за месяц	средне-многолетнее	I		II		III		среднее за месяц
						минимум.	максимум	минимум.	максимум	минимум.	максимум	
Апрель	1,5	33,2	15,7	50,4	44	-1,0	21,0	0,5	23,5	-2,0	27,0	23,8
Май	39,1	17,2	16,0	68,9	64	5,5	26,0	10,5	29,0	9,0	32,5	18,8
Июнь	1,2	7,7	20,0	28,9	78	14,0	36,0	15,5	36,0	14,5	38,0	25,9
Июль	6,1	34,4	16,2	56,7	60	13,0	37,0	15,5	33,0	17,0	39,5	25,5
Август	32,3	3,3	4,2	39,8	47	14,5	36,0	12,0	40,0	8,5	39,5	24,9

Фенологические наблюдения и учет урожая рецессивных линий кукурузы и их гибридов проводили по методике ВИР (Filev et al., 1980; Shmaraev, Matveeva, 1985), агротехнические мероприятия – согласно методическим указаниям по производству гибридных семян кукурузы (Sotchenko et al., 2019), систематизация групп спелости по шкале ФАО, хозяйственно ценные признаки и их описания даны согласно «Широкому унифицированному классификатору СЭВ вида *Zea mays* L.»

(Kukekov, 1977). Уборочную влажность зерна определяли в период уборки спелых початков влагомером для зерна «ФАУНА-М» в трехкратной повторности. Дисперсионный анализ проведен по методике Б.А. Доспехова (Dospikhov, 1985), оценка комбинационной способности линий по признаку «урожай зерна с делянки» проводилась по методике Г.В. Яковлева (Yakovlev, 1980). Селекционный индекс рассчитывался по методике, предложенной Н.А. Орляным (Orlyansky, 2004).

Результаты и обсуждение

В результате определения реакции редиплоидных линий на ЦМС выявлены генотипы, способные как полностью, так и частично восстанавливать фертильность пыльцы или закреплять стерильность (табл. 3). Линии с неполной закрепительной и восстановительной способностью (более 70%) были отнесены к линиям с неустановленной реакцией и исключены из общего числа линий, учтенных в опыте. Остальные линии были распре-

делены на 6 групп по длине межфазного периода «всходы – цветение початка» (выход рылец из-под оберток початка). Такой подход к определению времени фазы цветения основан на том, что учесть время цветения метелок и выброса пыльников у стерильных гибридов невозможно. При оценке закрепительной способности в выборку закрепителей стерильности включили только те линии, гибриды с участием которых показали баллы 0 и 1 по шкале Г.С. Галеева (Galeev, 1962), а в число восстановителей стерильности – линии, для которых уровень фертильности гибридов соответствовал баллам 5 и 6.

Таблица 3. Число редиплоидных линий, выделенных по реакции на ЦМС М- и С- типов в тестерных скрещиваниях

Table 3. The number of rediploid lines noted for their response to M and C type CMS in testcrosses

Реакция на тип ЦМС	Продолжительность межфазного периода «всходы - цветение початков», дни						Всего
	до 50	51-55	56-60	61-65	66-70	71-75	
Закрепитель М	1	45	8	2	3	0	59
Закрепитель С	0	7	3	3	0	2	15
Закрепитель У*	0	1	1	1	0	1	4
Восстановитель М	0	10	1	1	3	1	16
Восстановитель С	0	7	1	2	1	0	11
Восстановитель У*	0	0	1	0	0	0	1
Всего линий	1	70	15	9	7	4	106
Всего, %	0,94	66,03	14,15	8,49	6,6	3,8	100

Закрепитель У*-универсальный закрепитель, способный закреплять одновременно ЦМС М- и С-типов.

Восстановитель У*- универсальный восстановитель, способный восстанавливать фертильность при ЦМС М- и С-типов

Линии редиплоидной кукурузы со значениями уровня фертильности от 2 до 4 баллов включительно были отнесены к неполным закрепителям стерильности или неполным восстановителям фертильности. Всего по результатам тестерных скрещиваний было выделено 78 (73,6%) линий, способных закреплять ЦМС М- и С-типов. Среди них 59 линий (66,7% от числа исследованных) оказались закрепителями стерильности М-типа, 15 линий (14,1%) закрепляли стерильность С-типа, а 4 линии (3,8%) оказались закрепителями универсального типа, способными закреплять стерильность обоих типов ЦМС. 28 линий (26,4%) отнесены к восстановителям фертильности. Из них 16 линий восстанавливали мужскую фертильность при ЦМС М-типа, 11 – при ЦМС С-типа и одна линия восстанавливали фертильность при обоих типах ЦМС. Ранжирование линий по продолжительности межфазного периода всходы-цветение початков показало, что значительная часть закрепителей и восстановителей относится к группе с 51-55-дневным периодом, немногим меньше (14,5%) - к 56-60-дневным. 8,5% от числа изученных линий отнесены к 61-65-дневным, 6,6% линий - к 66-70-дневным и у 3,8% линий цветение наступало через 71-75 дней после появления всходов. Продолительно-

стью межфазного «периода всходы - цветение початка» до 50 дней характеризовалась только одна линия.

Сорок шесть линий характеризовались значениями комбинационной способности от сверхвысокой до хорошей (табл. 4). Ранжирование линий по комбинационной способности осуществлялось по значению превышения урожая зерна над стандартом соответствующей группы спелости ФАО со следующей градацией: хорошая - превышение на 1 значение НСР (наименьшей существенной разности), высокая - на 2 значения НСР и сверхвысокая - на 3 значения НСР. К группе с хорошей комбинационной способностью отнесены 27 (58,7%) линий, к группе с высокой 10 (21,7%) линий и к группе со сверхвысокой - 9 (19,6%) линий. В зависимости от продолжительности межфазного периода всходы-цветение початков линии распределились следующим образом: к группе с 51-55-дневным периодом отнесены 32,6% от числа изученных линий, а к группе с 66-70-дневным периодом - 26,1% линий. По остальным группам значений комбинационной способности и продолжительности межфазного периода всходы-цветение початков линии распределились относительно равномерно, и их доля в каждом классе не превышала 10%.

Таблица 4. Число редиплоидных линий, выделившихся по значениям комбинационной способности в тестерных скрещиваниях

Table 4. The number of rediploid lines grouped according to combining ability values in testcrosses

Тип комбинационной способности	Продолжительность межфазного периода «всходы - цветение початков, дни						Всего
	до 50	51-55	56-60	61-65	66-70	71-75	
Хорошая	2	9	1	1	12	2	27
Высокая	0	5	1	0	3	1	10
Сверхвысокая	0	1	0	0	7	1	9
Всего линий	2	15	2	1	12	4	46
Всего, %	4,34	32,6	4,34	2,17	26,1	8,69	100

43,4% от числа изученных редиплоидных линий, участвовавших в тестерных скрещиваниях, показали высокие значения урожая зерна (в пересчете на 1 га) при $НСР_{05} = 2,61$ ц/га (табл. 5). Продолжительность периода от всходов до цветения початков в группе лучших по урожаю зерна тесткроссов колебалась от 47 до 61 дней при варьировании значений урожая зерна от 5,47 до 11,14 т/га. Испытанные стандартные гибриды относятся к группам спелости по классификации ФАО от раннеспелой (ФАО 100-200) до среднеспелой (ФАО 302-400), тогда как две гибридные комбинации, полученные в тестерных скрещиваниях ((OL563C × KL1392) × 92c0653_{2,1,2}, (OL563M × SMA11) × 1/130_{1,1}), можно отнести к среднепоздней группе с показателем ФАО 401-500. Урожайность стандартов в группе ФАО 100-200 варьирует от 4,10 до 6,73 т/га, тогда как в скрещиваниях с тестерами из этой группы ФАО оно имеет значения в пределах от 5,47 до 7,81 т/га. Для стандартных гибридов, относящихся к группе ФАО 201-300, значения урожая зерна варьируют от 7,05 до 8,25 т/га. Гибриды от скрещиваний

с тестерами из той же группы ФАО характеризуются значениями урожая 6,83-9,63 т/га. Для стандартных гибридов, относящихся к группе ФАО 301-400, урожай зерна составляет от 6,63 до 7,77 т/га, а для гибридов от скрещиваний с тестерами из той же группы ФАО он варьирует в пределах 7,00–11,14 т/га. Во всей группе стандартных гибридов варьирование значения уборочной влажности зерна составляет от 13,4% до 21,3%, тогда как в группе всех тесткроссов оно варьирует от 13,6% до 30,2%. Наименьшая уборочная влажность зерна (до 14%) - один из важнейших показателей качества - отмечена в гибридных комбинациях ♀(РГС246с × OL213) × ♂92с5986_{2,3}, ♀714М × ♂1/67₁ и ♀714М × ♂92н136₄ - (13,6%, 13,9% и 14,0% влажности соответственно). Значение селекционного индекса в выборке варьирует от 2,37 до 5,11 для всей группы стандартов и от 3,28 до 5,13 для всех тесткроссов. Максимальное значение селекционного индекса было отмечено в комбинациях ♀(OL563C × KL1392) × ♂92с0653_{2,1,2} и ♀714М × ♂1/67₁ (5,13 и 5,03 соответственно).

Таблица 5. Значения основных хозяйственно ценных признаков выделившихся по урожайности зерна гибридных комбинаций ($НСР_{05} = 2,61$ ц/га, ОПХ «Опытное», КБР, 2019 г.)

Table 5. Values of the main economically important traits of hybrid combinations noted for grain yield ($НСР_{05} = 0.261$ t/ha, «Opytnoye» EIF*, KBR, 2019)**

Название гибридов	Продолжительность межфазного периода «всходы - цветение початков», дни	Урожай зерна при 14% влажности, т/га	Уборочная		Селекционный индекс
			влажность зерна, %	густота, тыс. раст./га	
St - Машук 171 МВ	46	6,73	14,5	67,1	4,62
St - Р 8521	48	6,15	13,4	69,2	4,58
St - Дарина МВ	48	4,10	16,7	60,3	2,45
St - Машук 220 МВ	49	4,91	15,6	65,7	3,14

Название гибридов	Продолжительность межфазного периода «всходы - цветение початков», дни	Урожай зерна при 14% влажности, т/га	Уборочная		Селекционный индекс
			влажность зерна, %	густота, тыс. раст./га	
St - Машук 355 MB	53	7,05	15,8	64,1	4,46
St - Краснодарский 291 AMB	54	7,91	16,5	68,2	4,79
St - ДКС 5007	56	8,25	16,6	60,8	4,97
St - Машук 355 MB	58	6,63	16,5	56,4	4,01
St - ДКС 5007	59	7,77	14,5	62,2	5,11
St - Камилла СВ	59	7,06	21,3	58,0	3,32
МальвинаС × 92с6156 _{.3,1-1}	47	6,58	14,4	66,7	4,57
Р346М × 93т015 _{.1-1}	47	6,37	15,3	65,3	4,16
703М × 92с5433 _{.1}	48	5,99	16,1	64,1	3,72
(OL273М × PH53) × 92с5280 _{.2,2-3}	48	7,05	17,4	71,1	4,05
(PGC246с × OL213) × 92с5986 _{.2,3}	49	6,71	13,6	69,3	4,93
714М × 92н136 _{.4}	49	5,47	14,0	63,4	3,90
714М × 92с5530 _{.2}	49	5,61	15,6	66,7	3,59
(98С × OL245) × 92с5428 _{.2,1-4}	49	7,81	17,1	71,7	4,57
(98С × OL245) × 92с5195 _{.3,3-7}	49	7,37	17,3	66,7	4,26
(OL273М × 346зМ) × 92с5458 _{.1,3}	49	6,29	17,3	67,9	3,63
703М × 92с5003 _{.2}	50	6,52	15,6	67,9	4,17
703М × 92с5521 _{.1×2}	51	6,83	15,4	70,5	4,43
OL563М × 92с0493 _{.2,5}	56	9,63	22,5	67,9	4,28
(OL563С × KL1392) × 92с0427 _{.2,4}	58	8,88	22,5	65,3	3,94
(OL563С × KL1392) × 92с0493 _{.2,3}	58	9,02	22,9	65,3	3,94
OL563М × 92с0493 _{.2,1}	58	9,46	24,2	62,8	3,91
B73с × 92с0262 _{.2,1}	58	8,47	25,8	56,4	3,28
714М × 1/67 _{.1}	59	7,00	13,9	65,3	5,03
(OL563С × SMA-11) × 1/99 _{.3,2}	59	7,59	16,9	43,5	4,49
(OL563С × KL1392) × 92с0493 _{.2,5}	59	9,41	19,2	64,1	4,90
(OL563С × KL1392) × 92с 0546 _{.2,1-3}	59	8,44	20,5	60,2	4,12
(OL563М × SMA11) × 92с0427 _{.2,5}	59	8,72	20,9	68,5	4,17
(OL563С × KL1392) × 92с 0546 _{.2,1-1}	59	8,51	21,5	62,8	3,96
(OL563С × KL1392) × 92н 129 _{.6,3}	59	8,57	22,0	57,6	3,89
(OL563С × KL1392) × 92с0493 _{.2,3}	59	8,79	22,0	66,7	3,99
(OL563М × SMA11) × 92с0427 _{.2,6}	59	8,99	22,3	67,3	4,03
(OL563С × SMA-11) × 92с0507 _{.2,1}	59	7,45	22,4	51,2	3,32
(OL563С × SMA-11) × 1/75·3	59	9,05	22,4	47,4	4,04
(OL563С × KL1392) × 92с0427 _{.2,6}	59	8,90	23,3	71,1	3,82
(OL563М × SMA11) × 92н139 _{.9,2}	59	11,14	26,3	63,4	4,23
(OL563С × SMA-11) × 1/130 _{.6}	60	8,72	19,7	54,7	4,43
(OL563С × KL1392) × 92с0493 _{.2,4}	60	8,49	21,8	64,1	3,89
OL563С × 92с0427 _{.2,3}	60	10,33	23,3	57,6	4,43
OL703М × 92с0493 _{.2,1}	60	9,64	26,3	63,6	3,66
B73С × 92с0493 _{.2,4}	60	10,28	30,2	64,7	3,40
(OL563С × KL1392) × 92с0653 _{.2,1-2}	61	10,26	20,0	57,2	5,13
(OL563М × SMA11) × 1/130 _{.1,1}	61	8,41	20,9	60,2	4,02

*EIF – experimental-industrial farm; KBR – Kabardino-Balkar Republic

Результаты исследований селекционной ценности редиплоидных линий кукурузы показывают эффективность применения метода редиплоидизации тетраплоидных популяций для расширения генетического полиморфизма и обогащения генофонда кукурузы новым исходным материалом, обладающим высоким потенциалом продуктивности. Редиплоидные линии кукурузы, изученные в опыте, прошли через полиплоидное состояние и претерпели существенные перестройки генетического материала, которые привели к расширению спектра изменчивости хромосом, несущих гены хозяйственно ценных признаков. Возможно, что этот механизм повышения уровня генетической изменчивости был выработан в процессе длительной эволюции растений как путь для преодоления инбредной депрессии тетраплоидов, сопровождающейся снижением фертильности растений, которая угрожала его сохранности как вида в природе. Поэтому, перестройки внутри генома, возникающие в процессе редиплоидизации тетраплоидного генома, неизбежно влекут за собой возникновение новых сочетаний аллелей генов, отличных от исходных родительских форм, и появление более продуктивных генотипов (Gordei et al., 2013). Таким образом, использование механизма редиплоидизации тетраплоидных генотипов имеет перспективы в создании нового исходного материала для гибридной селекции растений.

Выводы

Результаты проведенных исследований селекционной ценности 106 линий редиплоидной кукурузы, полу-

ченной методом разложения (редиплоидизации) тетраплоидной кукурузы и их гибридизации с 37 стерильными тестерами различных селекционных центров показали их ценность в качестве исходного материала для гибридной селекции кукурузы. Выделено 46 (43,3%) линий с комбинационной способностью в диапазоне от сверхвысокой до хорошей. 78 линий (73,6%) закрепляли признак ЦМС. Среди них 59 линий (55,7%) закрепляли ЦМС М-типа, 15 линий (14,1%) отнесены к закрепителям С типа и 4 линии (3,8%) оказались закрепителями универсального типа 28 линий (26,4%) восстанавливали фертильность, из них к восстановителям фертильности при ЦМС М-типа отнесено 16 линий (15,1%), а фертильность пыльцы при ЦМС С типа восстанавливали 11 линий (10,4%) и одна линия оказалась восстановителем универсального типа. Наибольшее число селекционно-ценных линий имеет продолжительность межфазного периода «всходы - цветение початков» в диапазоне 51-55 дней. Лучшие результаты уборочной влажности зерна (до 14%), показали гибриды ♀(РГС246с × OL213) × ♂92с5986_{2,3}, ♀714М × ♂1/67₁ и ♀714М × ♂92н136₄, со значениями 13,6%, 13,9%, 14,0% соответственно, а по индексу селекционной ценности выделены комбинации ♀714М × ♂1/67₁, ♀(OL563С × KL1392) × ♂92с0653_{2,1,2} со значениями индексов селекционной ценности 5,03 и 5,13 соответственно.

Работа выполнена в рамках государственного задания ВИР № 0662-2019-0006 «Поиск, поддержание жизнеспособности и раскрытие потенциала наследственной изменчивости мировой коллекции зерновых и крупяных культур ВИР для развития оптимизированного генбанка и рационального использования в селекции и растениеводстве».

References/Литература

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. Molecular Cell Biology. Vol. 4. Moscow: Mir; 1987. p.17-18 [in Russian] (Албертс Б., Брэй Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки: [перевод с английского]. В 5 томах. Т. 4. Москва: Мир. 1987. С.17-18)
- Anashenkov S.S. Analysis of the combining ability of new self-pollinated lines and corn testers (Analiz kombinatsionnoy sposobnosti novykh samoopylennykh liniy i testerov kukuruzy). *Polythematic online scientific journal of Kuban State Agrarian University*. 2012;80(06):264-273 [in Russian] (Анашенков С.С. Анализ комбинационной способности новых самоопыленных линий и тестеров кукурузы. *Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета*. 2012;80(06):264-273. URL: <http://ej.kubagro.ru/2012/06/pdf/01.pdf> [дата обращения: 25.12.2019].
- Beckett J.B. Classification of Male-Sterile Cytoplasm in Maize (*Zea mays* L.). *Crop Science*. 1971;11(5):724-727. DOI: 10.2135/cropsci1971.0011183X001100050037x
- Dospikhov B.A. Field experiment methodology (with the basics of statistical processing of research results) (Metodika polevogo opyta (s osnovami statisticheskoy obrabotki rezultatov issledovaniy)). Moscow: Agropromizdat; 1985. [in Russian] (Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). Москва: Агропромиздат; 1985).
- Galeev G.S. The results of the study and breeding utilization of cytoplasmic male sterility of corn at the VIR Kuban experimental station (Rezultaty izucheniya i selekcionnogo ispolzovaniya citoplazmaticheskoy muzhskoy sterilnosti kukuruzy na Kubanskoj opytnoj stancii VIR). In: *Cytoplasmic male sterility in breeding and seed production of corn*. Kiev; 1962. p. 8-38 [in Russian] (Галеев Г.С. Результаты изучения и селекционного использования цитоплазматической мужской стерильности кукурузы на Кубанской опытной станции ВИР. В кн.: *Цитоплазматическая мужская стерильность в селекции и семеноводстве кукурузы*. Киев; 1962. С. 8-38.)
- Gontarovskiy V.A. Genetic control of the Bolivian type of CMS in corn (Geneticheskij kontrol' boliviyskogo tipa CMS u kukuruzy). *Russian Journal of Genetics*. 1980;16(1):143-155 [in Russian] (Гонтаровский В.А. Генетический контроль боливийского типа ЦМС у кукурузы. *Генетика*. 1980;16(1):143-155.
- Gorbacheva A.G. Discovery and genetic identification of CMS types in maize (Otkrytiye i geneticheskaya identifikatsiya tipov CMS u kukuruzy). *Kukuruza i sorgo = Corn and Sorghum*. 2019;(2):22-34 [in Russian] (Горбачева А.Г. Открытие и генетическая идентификация типов ЦМС у кукурузы. *Кукуруза и сорго*. 2019;(2):22-34. DOI: 10.25715/KS.2019.2.31830
- Gordei I.S., Belko N.B., Gordey I.A. The molecular-genetic effects of genome duplication in winter rye (*Secale cereale* L.). *Faktory eksperimentalnoi evolyutsii orhanyzmiv = Factors of the exper-*

- imental evolution of organisms*. 2013;13:156-161 [in Russian] (Гордей И.С., Белько Н.Б., Гордей И.А. Молекулярно-генетические эффекты дупликации генома у ржи (*Secale cereale* L.) Факторы экспериментальной эволюции организмов. 2013;13:156-161)
- Filev D.S., Tsikov V.S., Zolotov V.I., Logachev N.I. Guidelines for conducting field trials with corn (Metodicheskiye rekomendatsii po provedeniyu polevykh opytov s kukuruzoy). Dnepropetrovsk: All-Union Corn Research Institute; 1980 [in Russian] (Филев Д.С., Циков В.С., Золотов В.И., Логачев Н.И. Методические рекомендации по проведению полевых опытов с кукурузой. Днепропетровск: ВНИИ кукурузы; 1980).
- Khatefov E.B., Scherbak V.S. Cytogenetic studies of seed productivity in tetraploid corn (Tsitogeneticheskiye issledovaniya semennoy produktivnosti tetraploidnoy kukuruzy). *Vestnik Kabardino-Balkarskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Biologicheskkiye nauki = Bulletin of the Kabardino-Balkarian State University. Series: Biological Sciences*. 2002;(5):83-88 [in Russian] (Хатефов Э.Б., Щербак В.С. Цитогенетические исследования семенной продуктивности тетраплоидной кукурузы. *Вестник Кабардино-Балкарского государственного университета. Серия: Биологические науки*. 2002;(5):83-88).
- Khatefov E.B., Shatskaya O.A. The use of haploinductors in heteroploid crosses to expand the diversity of the genetic basis of corn. In: *Genetic resources of cultivated plants in XXI century: current status, problems, perspectives: Abstracts; 2007 November 26-30; St. Petersburg, Russia*. St. Petersburg: VIR; 2007. p.367-369 [in Russian] (Хатефов Э.Б., Шацкая О.А. Применение гаплоиндукторов в гетероплоидных скрещиваниях для расширения разнообразия генетической основы кукурузы. В кн.: *Генетические ресурсы культурных растений в XXI веке: состояние, проблемы, перспективы: тезисы докладов II-й Вавиловской международной конференции; 26-30 ноября 2007; Санкт-Петербург, Россия*. Санкт-Петербург: ВИР; 2007. С.367-369).
- Khatefov E.B., Kerv Yu.A., Boyko V.N., Golovina M.A., Appaev S.P. Expansion of the genetic polymorphism of the initial selection material of corn by the method of rediploidization of tetraploid populations. *Taurida Herald of the Agrarian Sciences*. 2018;16(4):192-203 [in Russian] (Хатефов Э.Б., Керв Ю.А., Бойко В.Н., Головина М.А., Аппаев С.П. Расширение генетического полиморфизма исходного селекционного материала кукурузы методом редиплоидизации тетраплоидных популяций. *Таврический вестник аграрной науки*. 2018;16(4):192-203. DOI: 10.25637/TVAN.2018.04.18)
- Krupnov V.A. Genic and cytoplasmic male sterility (Gennaya i tsitoplazmaticheskaya muzhskaya sterilnost.). Moscow: Kolos; 1973 [in Russian] (Крупнов В.А. Генная и цитоплазматическая мужская стерильность. Москва: Колос, 1973).
- Kukekov V.G. A comprehensive unified COMECON list of descriptors and the international COMECON list of descriptors for the species of *Zea mays* L. (Shirokiy unifikirovannyi klassifikator SEV i mezhdunarodnyy klassifikator vidov SEV *Zea mays* L.). Leningrad: VIR; 1977 [in Russian] (Кукеков В.Г. Широкий унифицированный классификатор СЭВ и международный классификатор СЭВ видов *Zea mays* L. Ленинград: ВИР; 1977).
- Magnitsky K.P. Diagnostics of plant fertiliser requirements (Diagnosticska potrebnosti rasteniy v udobreniyakh). Moscow: Moskovskiy Rabochiy; 1972. [In Russian] (Магницкий К.П. Диагностика потребности растений в удобрениях. Москва: Московский рабочий; 1972).
- Orlyansky N.A. Breeding and seed production of grain corn to increase adaptability in the conditions of the Central Black Earth Region (Selekciya i semenovodstvo zernovoy kukuruzy na povyshenie adaptivnosti v usloviyah Centralnogo Chernozemya) [dissertation]. Voronezh; 2004 [in Russian] (Орлянский Н.А. Селекция и семеноводство зерновой кукурузы на повышение адаптивности в условиях Центрального Черноземья: дис. ... д-ра с.-х. наук. Воронеж; 2004).
- Rodionov AV. Polyploidy and interspecific hybridization in the evolution of flowering plants (Poliploidiya i mezhydivovaya gibridizatsiya v evolyucii cvetkovykh rasteniy). *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17(4/2):916-929 [in Russian] (Родионов А.В. Полиплоидия и межвидовая гибридизация в эволюции цветковых растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(4/2):916-929). URL: <https://vavilov.elpub.ru/jour/article/view/212> [дата обращения: 25.12.2019].
- Sotchenko V.S., Gorbacheva A.G., Bagrinceva V.N., Sotchenko E.F., Lavrenchuk N.F., Suprunov A.I., Toloraya T.R., Zhukov N.I., Smirnova L.A. Guidelines for the production of hybrid corn seed (Metodicheskie ukazaniya po proizvodstvu gibridnykh semyan kukuruzy). Pyatigorsk: All-Russian Corn Research Institute; 2019 [in Russian] (Сотченко В.С., Горбачева А.Г., Багринцева В.Н., Сотченко Е.Ф., Лавренчук Н.Ф., Супрунов А.И., Толорая Т.Р., Жуков Н.И., Смирнова Л.А. Методические указания по производству гибридных семян кукурузы. Пятигорск: Всероссийский научно-исследовательский институт кукурузы; 2019).
- Shmaraev G.E., Matveeva G.V. Methodical guidelines for studying and maintaining accessions of the corn collection (Metodicheskiye ukazaniya po izucheniyu i podderzhaniyu obraztsov kolektsii kukuruzy). Leningrad: VIR; 1985 [in Russian] (Шмараев Г.Е., Матвеева Г.В. Методические указания по изучению и поддержанию образцов коллекции кукурузы. Ленинград: ВИР; 1985).
- Sprague G.F., Tatum L.A. General vs. combining ability in single crosses of corn. *Journal of the American Society of Agronomy*. 1942;34(10):923-932.
- Tarutina L.A., Poskannaya S.I., Kapusta I.B., Khotyleva L.V. Nature of the expression of combining ability in inbred lines of maize during ontogeny. *Agricultural Biology*. 1991;(1):65-69 [in Russian] (Тарутина Л.А., Посканная С.И., Капуста И.Б., Хотылева Л.В. Характер проявления комбинационной способности самоопыленных линий кукурузы в онтогенезе. *Сельскохозяйственная биология*. 1991;(1):65-69).
- Yakovlev G.V. Concerning methods of evaluating combining ability of onion sterile lines and varieties (K metodike otsenki kombinacionnoy sposobnosti sterilnykh liniy i sortov repchatogo luka). *Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding*. 1980;66(2):62-72 [in Russian] (Яковлев Г.В. К методике оценки комбинационной способности стерильных линий и сортов репчатого лука. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 1980;66(2):62-72).

РАЗРАБОТКА ХРОМОСОМО-СПЕЦИФИЧНЫХ ДНК-МАРКЕРОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИНТРОГРЕССИВНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ КАРТОФЕЛЯ С ДИКИМ МЕКСИКАНСКИМ АЛЛОТЕТРАПЛОИДНЫМ ВИДОМ *SOLANUM STOLONIFERUM* SCHLTDL.

Антонова О.Ю.,¹ Ермишин А.П.,^{2*} Левый А.В.,²
Агеева А.С.,² Воронкова Е.В.,² Гавриленко Т.А.^{1*}

¹ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44;
✉ *tatjana9972@yandex.ru

² Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 220072 Республика Беларусь, г. Минск, ул. Академическая, 27;
✉ *ermishin@igc.by

Для вовлечения в селекцию дикого аллотетраплоидного мексиканского вида картофеля *Solanum stoloniferum* Schldl. (геномный состав AABB) обычно используют пентаплоидные межвидовые гибриды (AAAAB) с культурным картофелем *S. tuberosum* L. (AAAA), которые в дальнейшем включают в программу возвратных скрещиваний. Поскольку у таких гибридов в мейозе ожидается синاپсис гомологичных хромосом А генома, возникает вопрос о перспективах интрогрессивной гибридизации генетического материала суб-генома В *S. stoloniferum*. В связи с этим актуальна разработка различных схем селекционного процесса, позволяющих повысить вероятность интрогрессии генетического материала суб-генома В в геном культурного картофеля. В предыдущих исследованиях были разработаны четыре схемы вовлечения *S. stoloniferum* в селекционный процесс, которые включают возвратные скрещивания с культурным картофелем различных межвидовых гибридов: гексаплоидного (геномный состав AAAABB, традиционная схема интрогрессии), тетраплоидного гибрида (предполагаемый геномный состав AAAB) и потомства, полученного от его самоопыления, а также пентаплоидного межвидового гибрида (предполагаемый геномный состав AAABB). В настоящей работе представлены первые результаты исследований по разработке хромосомоспецифичных маркеров для идентификации у межвидовых гибридов генетического материала *S. stoloniferum*. В скрещиваниях был использован перспективный образец *S. stoloniferum* PI 205522, высокоустойчивый к фитофторозу и Y-вирусу картофеля, у которого выявлен ряд ДНК-маркеров генов устойчивости к этим патогенам. Для изучения особенностей интрогрессии генетического материала *S. stoloniferum* был создан набор из 23 SSR- и CAPS-маркеров с известной хромосомной локализацией в геноме А *S. tuberosum*, выявляющих полиморфизм родительских генотипов - диплоидного клона IGC 10/1.21 культурного картофеля *S. tuberosum* и образца PI 205522 *S. stoloniferum*. Все маркеры, специфичные для родительского образца дикого вида, были выявлены как у триплоидного (AAB), так и у пентаплоидного (AAABB) гибридов *S. stoloniferum* × *S. tuberosum*. Созданный набор маркеров будет использован для оценки эффективности различных схем интрогрессии генетического материала *S. stoloniferum*, в которых получены гибриды второго и третьего поколений беккроссов межвидовых гибридов с культурным картофелем.

Ключевые слова: картофель, *Solanum tuberosum*, межвидовая гибридизация, *S. stoloniferum* интрогрессия, маркеры SSR, CAPS, STS, SCAR.

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/10.30901/2658-6266-2019-4-03>

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

DEVELOPMENT OF CHROMOSOME-SPECIFIC DNA MARKERS FOR A STUDY ON INTROGRESSIVE HYBRIDIZATION OF POTATO WITH THE WILD MEXICAN ALLOTTETRAPLOID SPECIES *SOLANUM STOLONIFERUM* SCHLTDL.

Antonova O. Yu.,¹ Yermishin A. P.,^{2*} Levy A. V.,²
Ageeva A. S.,² Voronkova E. V.,² Gavrilenko T. A.^{1*}

¹ N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia;
✉ *tatjana9972@yandex.ru

² Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, 27 Akademicheskaya Street, Minsk 220072, Republic of Belarus;
✉ *ermishin@igc.by

In order to involve valuable germplasm of the wild Mexican allotetraploid potato species *Solanum stoloniferum* Schldl. (genomic composition AABB) into breeding, pentaploid interspecific hybrids (AAAAB) with cultivated potato *S. tuberosum* L. (AAAA) and their backcross progenies are usually used. Homologous synapsis in meiosis of such hybrids is expected only between chromosomes of the A subgenome, therefore a question arose about a possibility of introgressing genetic material of the subgenome B into the A genome of cultivated potato. In this connection, development of various schemes for the B subgenome introgression into the genome of cultivated potato is considered as a topical issue. The previous research has yielded four schemes of *S. stoloniferum* involvement into breeding, which imply backcrossing with cultivated potato of the following interspecific hybrids: (1) hexaploids (genomic composition AAAABB, the conventional introgression scheme), (2) tetraploids (putatively, AAAB), (3) self-pollination progeny of a 4x hybrid and (4) pentaploid hybrids with a putative genome composition of AAABB. The present paper presents the first results of the development of chromosome-specific DNA markers for the identification of *S. stoloniferum* chromosomes in interspecific hybrids. An *S. stoloniferum* accession PI 205522 with a high degree of resistance to late blight and PVY had been found to possess several DNA-markers of the R-genes conferring resistance to these pathogens and was used in hybridization as a promising parent. A set of 23 SSR- and CAPS markers with the known chromosome location in *S. tuberosum* was generated. These markers detect polymorphism between parent genotypes, i.e., the diploid clone IGC 10/1.21 of cultivated potatoes *S. tuberosum*, and accession PI 205522 of *S. stoloniferum*. All the markers specific for the wild species were found in triploid (AAB) and pentaploid (AAABB) hybrids of *S. stoloniferum* × *S. tuberosum*. This set of markers will be used for efficiency assessment of different schemes for *S. stoloniferum* genetic material introgression into the obtained BC2-BC3 generations after crossing the interspecific hybrids with cultivated potato.

Key words: potato, *Solanum tuberosum*, interspecific hybridization, *S. stoloniferum* introgression, SSR, CAPS, STS, SCAR markers.

Для цитирования: Антонова О.Ю., Ермишин А.П., Левый А.В., Агеева А.С., Воронкова Е.В., Гавриленко Т.А. Разработка хромосомо-специфичных ДНК-маркеров для изучения интрогрессивной гибридизации картофеля с диким мексиканским аллотетраплоидным видом *Solanum stoloniferum* Schldl. *Биотехнология и селекция растений*. 2019;2(4):24-35. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-4-03

For citation: Antonova O. Yu., Yermishin A. P., Levy A. V., Ageeva A. S., Voronkova E. V., Gavrilenko T. A. Development of chromosome-specific markers for a study on introgressive hybridization of potato with the wild Mexican allotetraploid species *Solanum stoloniferum* Schldl. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(4):24-35. (In Russ.) DOI: 10.30901/2658-6266-2019-4-03

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

Yermishin A. P. <https://orcid.org/0000-0002-3106-4926>

Voronkova E. V. <https://orcid.org/0000-0001-9747-8622>

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

УДК 631.524.86:[633.11+635.21]:632.3/4:577.21.08

Поступила в редакцию: 04.11.2019

Принята к публикации: 19.12.2019

Введение

Мексиканский аллотетраплоидный дикий вид картофеля *Solanum stoloniferum* ($2n=4x=48$, геномная формула AABB) представляет значительный интерес для селекции в качестве источника ценных генов устойчивости к фитофторозу, крайней устойчивости к вирусам PVY, PVX и PVA, ряду бактериальных заболеваний, высоким температурам, вредителям картофеля (нескольким видам тлей) (Ross, 1986; Hawkes, 1990; Yermishin, 2014). Из-за ряда межвидовых репродуктивных барьеров, осложняющих интрогрессивную гибридизацию, в практической селекции использовалось сравнительно небольшое число образцов этого вида. Так, при гибридизации *S. stoloniferum* с тетраплоидными сортами культурного картофеля - *S. tuberosum* ($2n=4x=48$, геномная формула AAAA) гибридные семена не образуются из-за нарушения развития эндосперма. В соответствии с теорией EBN (Johnston et al., 1980) эти виды относят к разным группам скрещиваемости, так как они имеют разные значения балансового числа эндосперма (соответственно EBN=2 и EBN=4). Однако образцы *S. stoloniferum* могут скрещиваться в качестве материнских форм с дигаплоидами *S. tuberosum* ($2x$, 2 EBN) и многими диплоидными ($2x$, EBN=2) видами картофеля с образованием триплоидных гибридов (Ramanna, Abdalla, 1970; Adiwilaga, Brown, 1991; Bamberg, 1994). Такие триплоидные гибриды являются жизнеспособными, однако в силу значительных нарушений мега- и микроспоорогенеза полностью стерильны, что не позволяет осуществлять их беккроссирование культурным картофелем.

Для скрещиваний *S. stoloniferum* с культурным картофелем характерна односторонняя несовместимость, при которой гибридные семена удается получить при использовании данного дикого вида в качестве материнской формы, а реципрокные скрещивания оказываются неудачными (Jackson, Hanneman, 1999; Hayes et al., 2005). С цитоплазмой *S. stoloniferum* связана мужская стерильность межвидовых гибридов (Ross, 1986; Lössl et al., 2000; Song, Schwarzfischer, 2008; Gavrilenko et al., 2019).

Одним из существенных факторов, которые могут затруднять интрогрессию ценного генофонда дикого аллотетраплоидного вида картофеля *S. stoloniferum* (геномный состав AABB) в селекционный материал, являются геномные различия с культурным картофелем *S. tuberosum* (геномный состав AAAA). Большинство методов вовлечения *S. stoloniferum* в селекцию основано на увеличении уровня пloidности этого дикого вида или триплоидных межвидовых гибридов [*S. stoloniferum* × дигаплоиды *S. tuberosum* – геномная формула AAB] и на последующем многократном беккроссировании полученных полиплоидных межвидовых гибридов с культурным картофелем (Swaminathan, 1951; Lamm, 1953; von Wangenheim, 1954; Camadro, Espinillo, 1991; Watanabe et al., 1992; Yermishin et al., 2017b; Brown, 1988; Adiwilaga, Brown, 1991; Bamberg et al., 1994). Полученные в результате беккроссирования

(BC₁) пентаплоидные межвидовые гибриды (AAAAB), имеют субгеном В дикого вида в гаплоидном состоянии. У таких межвидовых гибридов в мейозе ожидается синапсис гомологичных хромосом А генома, а не имеющие гомологов хромосомы субгенома В будут наследоваться случайным образом и в последовательных возвратных скрещиваниях элиминироваться. В связи с этим актуальна разработка различных схем селекционного процесса, позволяющих повысить вероятность гомеологичной рекомбинации и интрогрессии генетического материала субгенома В *S. stoloniferum* в геном А культурного картофеля.

Разрабатывая стратегию интрогрессивной гибридизации отдаленных видов семейства пасленовых, Т.А. Гавриленко с соавторами (Gavrilenko et al., 2015) продемонстрировали возможность существенного повышения частоты синапсиса гомеологичных хромосом у модельных гибридных генотипов, несущих гомеологичные геномы в гаплоидном состоянии. Для повышения вероятности спаривания хромосом субгенома В *S. stoloniferum* и генома А *S. tuberosum*, в настоящей работе предлагается получать тетраплоидные межвидовые гибриды (AAAB), у которых вероятность гомеологичной рекомбинации может быть выше, чем у пентаплоидных гибридов с геномным составом AAAAB (Adiwilaga, Brown, 1991; Watanabe et al., 1992; Bamberg et al., 1994; Spooner et al., 2008). В ряде работ удалось получить тетраплоидные гибриды между аллотетраплоидными дикими видами и культурным картофелем благодаря большому объему скрещиваний и использованию приема «двойного опыления» (rescue pollination) в сочетании с культурой *in vitro* незрелых зародышей или семян (Iwanaga et al., 1991; Singsit, Hanneman, 1991; Watanabe et al., 1992; Janssen et al., 1997; Panahandeh et al., 2008). Следует заметить, что эффективность гибридизации между аллотетраплоидными видами и сортами культурного картофеля очень низкая, прежде всего, из-за различий их эффективной пloidности (EBN). В цитированных выше работах отмечена зависимость успеха гибридизации от генотипа родительских форм и от условий окружающей среды при проведении скрещиваний. В то же время, тетраплоидные межвидовые гибриды имеют эффективную пloidность EBN=3, что затрудняет их дальнейшее беккроссирование с *S. tuberosum* (эффективная пloidность EBN=4). Поскольку в литературе описаны только единичные случаи получения тетраплоидных межвидовых гибридов и успешного их беккроссирования культурным картофелем, эффективность такой схемы интрогрессии генов дикого вида *S. stoloniferum* в селекционный материал не оценивалась, ее сравнение с традиционными схемами интрогрессии не проводилось.

Для идентификации хромосом А и В субгеномов *S. stoloniferum* эффективно использование методов молекулярной цитогенетики (Pendinen et al., 2008). Для решения этой задачи, а также изучения особенностей интрогрессии в селекционный материал генетического материала *S. stoloniferum* также эффективно использование полиморфных

хромосома-специфичных маркеров. В литературе описано большое число монолокусных хромосома-специфичных последовательностей генома картофеля, для которых разработаны различные серии ДНК маркеров (RFLP-, SSR-, STS- и CAPS-маркеры) (Milbourne et al., 1998; Oberhagemann et al., 1999; Chen et al., 2001; Feingold et al., 2005; Ghislain et al., 2009). Также в качестве хромосома-специфичных маркеров можно рассматривать и маркеры картированных генов устойчивости к болезням, интродуцированных в культурный картофель от *S. stoloniferum*, например, маркеры генов *Ry_{sto}*, *Ry-f_{sto}*, *Rpi-stol* (Song, Schwarzfischer, 2008; Flis et al., 2005; Valkonen et al., 2008; Zhu et al., 2012).

В настоящей работе представлены результаты реализации четырех схем вовлечения в селекцию перспективного образца *S. stoloniferum* PI 205522, а также первые результаты по разработке хромосома-специфичных маркеров, перспективных для идентификации хромосом субгеномов А и В этого дикого вида в гибридном материале.

Материал и методы

Образец PI 205522 был выделен на основании результатов молекулярного скрининга 26 коллекционных образцов *S. stoloniferum*, полученных из генбанка картофеля США (NRSP 6) с маркерами *R* генов устойчивости к патогенам. У этого образца выявлены ДНК-маркеры генов устойчивости к Y-вирусу картофеля (PVY) - *Ry_{adg}*, *Ry_{sto}*, *Ry-f_{sto}* и к фитофторозу - *Rpi-stol*, *R3b* (Levy et al., 2017; Yermishin et al., 2017a). Растения этого образца практически не поражались фитофторозом в течение четырех лет полевых испытаний (2015-2018 гг., Минск), а также PVY при искусственном заражении.

В исследования по отбору хромосома-специфичных полиморфных маркеров дополнительно был включен и другой образец *S. stoloniferum* – к-17152, полученный из коллекции ВИР.

С участием образца PI 205522 *S. stoloniferum* в 2015 г. были получены гибриды с диплоидными клонами *S. tuberosum* и диплоидными линиями-посредниками (*SvSv*-линиями) (рис. 1) (Yermishin et al., 2017a; Yermishin et al., 2017b), уровень ploидности которых первоначально был определен по числу хлоропластов в замыкающих клетках устьиц. В рамках настоящей работы у гибридов было определено число хромосом и проведено ДНК-маркирование.

Определение числа хромосом гибридов. Бутоны (длиной 2–5 мм) межвидовых гибридов фиксировали в фиксаторе Ньюкомера (Pausheva, 1970). Подсчет числа хромосом проводили в материнских клетках пыльцы на стадиях МI – ранняя АI и МII – ранняя АII (рис. 2) по методике, описанной в руководстве Л.И. Абрамовой (Abramova, 1981), используя микроскоп NU 2E (Carl Zeiss, Jena).

Межвидовые гибриды и их потомство были использованы в реализации различных схем интрогрессии (см. рис. 1):

Схема 1. В результате митотического удвоения хромосом триплоидного межвидового гибрида ($2x SvSv$ -линия *S. tuberosum* × *S. stoloniferum* PI 205522) получен гексаплоидный клон IGC 15/118.3.C6.2016 (предполагаемый геномный состав AAAABB), который был использован в 2016 г. в качестве материнской формы для гибридизации с селекционным сортом картофеля Katahdin (Yermishin et al., 2017b). Для последующего беккроссирования пентаплоидных гибридов (BC₁, предполагаемый геномный состав AAAAB) в 2017 и 2018 гг. использовали в качестве опылителей сорта: Carlita, Quarta, Satina, Манифест, Свитанок Киевский, Уладар, а в реципрокных скрещиваниях в качестве материнских форм – сорта Katahdin, Весна Белая, Фальварак, Чарауник, Янка. Эта схема – традиционная для вовлечения в селекционный процесс *S. stoloniferum*. Она рассматривается в качестве контрольной (см. рис. 1).

Схемы 2 и 3. При опылении гексаплоидного клона IGC 15/118.3.C6.2016 диплоидной линией *S. tuberosum* IGC 10/1.21 в 2015 г. получен тетраплоидный межвидовой гибрид IGC 16/36.1 (Yermishin et al., 2017b) (BC₁, предполагаемая геномная формула - AAAB) (см. рис. 1). Для беккроссирования этого гибрида и его потомства от самоопыления в 2016-2019 гг. использовали сорта картофеля: Alcmaria, Carlita, Katahdin, Labadia, Lemchi Russet, Quarta, Satina, Манифест, Свитанок Киевский, Уладар, а также диплоидную линию *S. tuberosum* IGC 17n8 (AA, $2n=24$, EBN=2). Благодаря образованию нередуцированных гамет диплоидная линия IGC 17n8 ведет себя в скрещиваниях как сорта картофеля ($2n=4x$, EBN=4).

Схема 4. При получении триплоидных гибридов (*S. stoloniferum* PI 205522 × $2x S. tuberosum$ IGC 10/1.21) выделен пентаплоидный гибрид IGC 15/103.53 (Yermishin et al., 2017a) с предполагаемым геномным составом AAABB. Для его беккроссирования были использованы сорта: Alcmaria, Labadia, Lemchi Russet, Quarta, а также линия IGC 17n8.

Получение поколений BC1-BC3: скрещивания и определение фертильности гибридов. Для проведения гибридизации растения родительских форм выращивали при естественном освещении в условиях закрытого грунта Биологической опытной станции Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Условия окружающей среды в 2017-2018 гг. были типичными для летнего периода в Беларуси. В 2019 г условия для гибридизации картофеля были оптимальными: температура около 20°C, относительно высокая влажность воздуха из-за частых дождей. Для предотвращения самоопыления проводили кастрацию цветков материнских образцов (нераскрывшиеся бутоны), все неопыленные бутоны и раскрывшиеся неопыленные цветки в соцветии удаляли. Перед проведением гибридизации оценивали функциональную фертильность пыльцы (ФФП) путем определения частоты прорастания пыльце-

<p><u>Схема интрогрессии 1</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. SvSv-линия (2n=2x, геномная формула AA) × <i>S. stoloniferum</i> PI 205522 (2n=4x, sto, AABB) = IGC 15/118.3 (F₁, 3x, AAB). 2. IGC 15/118.3 (2n=3x, AAB) → митотическое удвоение хромосом = IGC 15/118.3.C6.2016 (2n=6x, AAAABB). 3. IGC 15/118.3.C6.2016 (2n=6x, AAAABB) × Katahdin (2n=4x, tbr, AAAA) = IGC 16/N.n (BC₁, 5x, AAAAB). 4. IGC 16/N.n (BC₁, 2n=5x, AAAAB) × Quarta (2n=4x, tbr, AAAA) = BC₂; Янка (2n=4x, tbr, AAAA) × IGC 16/N.n (BC₁, 2n=5x, AAAAB) = BC₂. <p><u>Схема интрогрессии 2</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. IGC 15/118.3.C6.2016 (2n=6x, AAAABB) × IGC10/1.21 (2n=2x, tbr, AA) = IGC 16/36.1 (BC₁, 2n=4x, AAAB). 2. IGC16/36.1(BC₁, 2n=4x, AAAB) × Quarta (2n=4x, tbr, AAAA) = BC₂. <p><u>Схема интрогрессии 3</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. IGC 16/36.1 (2n=4x, AAAB) → самоопыление = IGC 18/71.1 и IGC 18/71.2 (2n=4x, AAAB). 2. IGC 18/71.1(2) (2n=4x, AAAB) × Alcmaria (2n=4x, tbr, AAAA) = BC₂. <p><u>Схема интрогрессии 4</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. PI 205522.2 (2n=4x, sto, AABB) × IGC10/1.21 (2n=2x, tbr, AA) = IGC 15/103.53 (F₁, 2n=5x, AAABB). 2. IGC 15/103.53 (F₁, 5x, AAABB) × Quarta (2n=4x, tbr, AAAA) = BC₁ (IGC 17/192.2, IGC 17/192.4, IGC 17/192.5). 3. IGC 17/192.2(4,5) × Quarta (2n=4x, tbr, AAAA) = BC₂.

Рис. 1. Схемы интрогрессии *S. stoloniferum* (sto) PI 205522 в селекционный материал с использованием межвидовых гибридов с различным уровнем пloidности и геномным составом. Трехбуквенные обозначения названия видов: *S. stoloniferum* (sto), *S. tuberosum* (tbr).

Fig.1. Schemes of *S. stoloniferum* (sto) PI 205522 introgression into breeding stock using interspecific hybrids with different ploidy levels and genomic composition. Designation of species: *S. stoloniferum* (sto), *S. tuberosum* (tbr).

вых зерен в течение двух часов при 25°C на питательной среде (Pallais et al., 1985). Учитывали по 300 пыльцевых зерен на образец в нескольких полях зрения микроскопа (увеличение 600×).

Выделение ДНК. Препараты тотальной ДНК были выделены из листьев тепличных или *in vitro*-растений с использованием модифицированного метода СТАВ-экстракции (Gavrilenko et al., 2013) с последующей очисткой PVPP.

Отбор полиморфных хромосомо-специфичных ДНК-маркеров. Хромосомо-специфичные SSR-праймеры были подобраны по литературным источникам (Milbourne et al., 1998; Oberhagemann et al., 1999; Chen et al., 2001; Feingold et al., 2005; Ghislain et al., 2009), ряд CAPS-

маркеров был разработан сотрудниками отдела биотехнологии ВИР на основе информации о картированных монолокусных последовательностях генома А картофеля (<http://www.gabipd.org/database/maps.shtml>). В предварительных экспериментах праймеры апробировали на выборке из 48 генотипов образцов ди- и тетраплоидных культурных видов (*S. ajanhuirii* Juz. & Bukasov, *S. phureja* Juz. & Bukasov и *S. tuberosum*), обладающих ядерным А-геномом, диких диплоидных мексиканских видов картофеля с различным геномным составом: *S. verrucosum* Schltdl. (2n=2x, геном AA); *S. bulbocastanum* Dunal & Poir., *S. cardiophyllum* Lindl., *S. pinnatisectum* Dunal, *S. tarnii* Hawkes & Hjert. (2n=2x, геном BB) и *S. stoloniferum* (2n=4x, геном AABB) (неопубликованные данные). В дальнейший анализ межвидовых гибридов были включены праймеры, генерировав-

шие маркерные фрагменты, подвижность которых у образцов диких видов с геномом ВВ резко отличалась от таковой у образцов А-геномных видов (рис. 3, 4).

В рамках данной работы отбирали праймеры по их способности генерировать ПЦР-продукты, отличающиеся по размеру (непосредственно или после рестрикции) у родительских генотипов, использованных в межвидовой гибридизации. Наряду с микросателлитными и CAPS-маркерами в набор входил маркер blb1F/R гена *Rpi-blb1* (хромосома VIII) (Wang et al., 2008), детерминирующего устойчивость к широкому спектру рас возбудителя фитофтороза, и маркер локуса CP60, который у культурного картофеля сцеплен с геном *Rx1* (хромосома XII), контролирующим устойчивость к вирусу PVX картофеля (Gebhardt et al., 2006).

ПЦР, рестрикция, электрофорез. Анализ полиморфизма хромосома-специфичных локусов у родительских форм и у гибридов проводили методом ПЦР со специфичными праймерами, в ряде случаев сопряженным с рестрикционным анализом. ПЦР осуществляли в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10 нг тотальной ДНК сортов картофеля, 1× реакционный буфер («Диалат», Москва), 3.0 mM MgCl₂, 0.6 mM каждого из dNTPs, 0.2 мкМ прямого и обратного праймера и 1 ед. Таq-полимеразы («Диалат»). При анализе микросателлитных маркеров реакционная смесь имела объем 10 мкл и дополнительно включала прямой праймер M13, содержащий флуоресцентную метку IRD700 или IRD800. Соответственно, эта же последовательность была включена в состав каждого прямого праймера на 5'-конце.

В рестрикционном анализе использовали ферменты

фирмы NEB (<https://international.neb.com/products/restriction-endonucleases>). Рестрикцию проводили согласно протоколу фирмы-изготовителя. Фрагменты ДНК в случае CAPS- и SCAR-маркеров разделяли электрофорезом в агарозных гелях с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в УФ-свете. Разделение ампликонов при анализе микросателлитных районов осуществляли путем электрофореза в проточных 6,5% полиакриламидных гелях в системе с лазерной детекцией фрагментов Li-Cor 4300S DNA Analyzer System, фрагменты детектировали по флуоресцентному сигналу IRD700/IRD800. В этом случае для определения размеров амплифицированных фрагментов использовали пакет программ SAGA Generation 2 (<http://www.licor.com/>).

Результаты

Определение числа хромосом гибридов. Подсчет числа хромосом в мейозе триплоидных ($2n=3x$) межвидовых гибридов подтвердил наличие у них 36 хромосом; у гексаплоидного ($2n=6x$) клона IGC 15/118.3.C6.2016, полученного в результате митотического удвоения триплоидного гибрида IGC 15/118.3, – 72 хромосомы и у растений первого беккрасса, полученного от опыления этого гексаплоидного клона культурным картофелем, – 60 хромосом ($2n=5x$). Также 60 хромосом ($2n=5x$) было выявлено у гибрида IGC 15/103.53 (*S. stoloniferum* PI 205522 × 2x *S. tuberosum* IGC 10/1.21), а у гибрида IGC 16/36.1 (6x IGC 15/118.3.C6.2016 × 2x IGC 10.21) было определено 48 хромосом ($2n=4x$) (см. рис. 2).

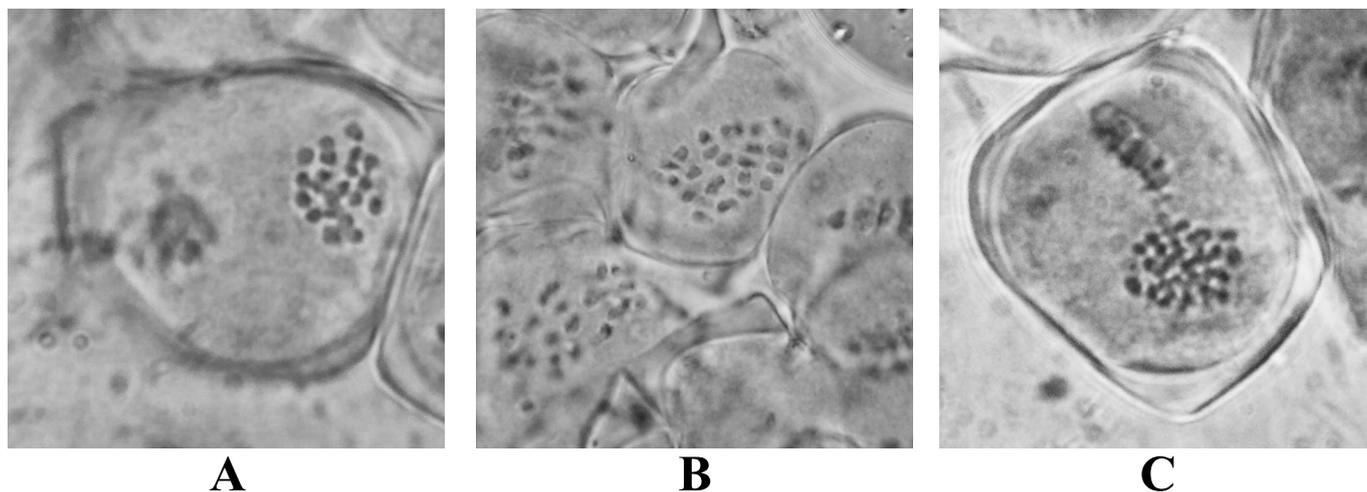


Рис. 2. Уровень ploидности межвидовых гибридов:
А – Метафаза 2 у тетраплоидного гибрида IGC 16/36.1;
В – Метафаза 1 у пентаплоидного гибрида IGC 15/103.53;
С – Метафаза 2 у гексаплоидного гибрида IGC 15/118.3.C6.2016.

Fig. 2. Ploidy of interspecific hybrids:
А – Metaphase 2 in tetraploid hybrid IGC 16/36.1;
В – Metaphase 1 in pentaploid hybrid IGC 15/103.53;
С – Metaphase 2 in hexaploid hybrid IGC 15/118.3.C6.2016

Создание набора полиморфных хромосомо-специфичных маркеров ДНК *S. stoloniferum* и *S. tuberosum*, их выявление у межвидовых гибридов.

Задача исследований состояла в создании набора SSR-, STS-, SCAR- и CAPS- маркеров, специфичных к монокусным последовательностям с известной хромосомной локализацией, для изучения интрогрессивных процессов у межвидовых гибридов *S. stoloniferum* (геном AABB) и *S. tuberosum* (геном AAAA). На первом этапе были отобраны праймеры, генерировавшие маркерные фрагменты, подвижность которых у образцов диких видов с геномом BB резко отличалась от таковой у образцов А-геномных видов. У образцов тетраплоидного вида

S. stoloniferum (геном AABB) в большинстве случаев наблюдали несколько вариантов ПЦР-продуктов, причем подвижность одних соответствовала подвижности маркерных фрагментов у изученных образцов А-геномных видов (*S. ajanhuirii*, *S. phureja* и *S. tuberosum*), а других – подвижности фрагментов у образцов диплоидных В-геномных видов (*S. bulbocastanum*, *S. cardiophyllum*, *S. pinnatisectum*, *S. tarnii*) (см. рис. 3, 4).

На следующем этапе проводили отбор хромосомо-специфичных маркеров, позволявших различать родительские генотипы – диплоидный клон IGC 10/1.21 культурного картофеля *S. tuberosum* и образец PI 205522 *S. stoloniferum* (см. рис. 3, 4).

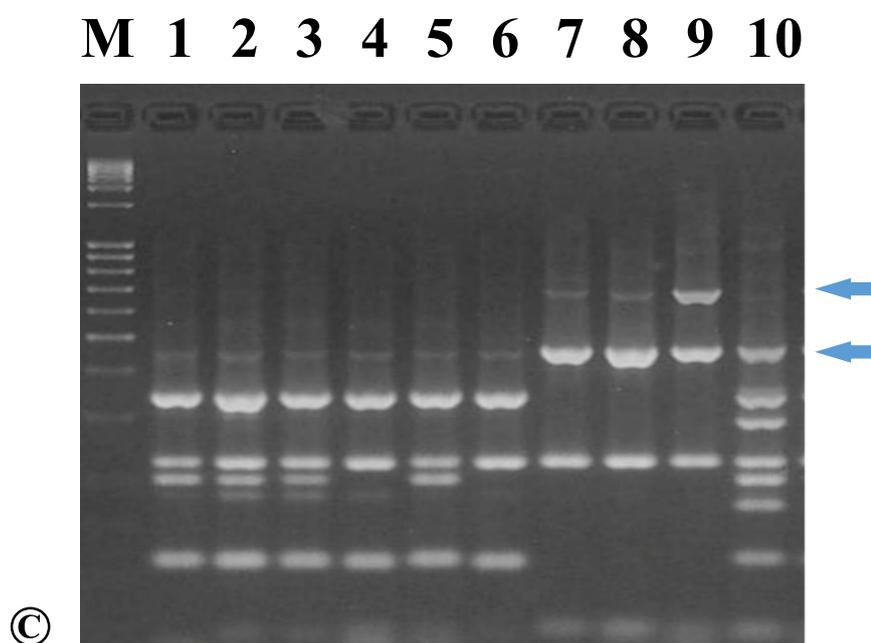


Рис. 3. Пример отбора CAPS-маркера GP83_HinfI для детекции хромосом субгенома В мексиканского аллотетраплоидного вида *S. stoloniferum* (AABB) и его гибридов.

Дорожки 1-6: образцы диплоидных культурных видов с ядерным А геномом - *S. ajanhuirii* (GLKS 2308), *S. phureja* (k-16530) и селекционных сортов *S. tuberosum* (сорта Atlantic, Rasant, Romanze, Sonate); дорожки 7-9: образцы диплоидных мексиканских видов – носителей генома В: *S. bulbocastanum*, *S. cardiophyllum*, *S. pinnatisectum* соответственно; дорожка 10: *S. stoloniferum*.

Fig. 3. An example of the GP83_HinfI CAPS marker selection for the detection of chromosomes in the B subgenome of the Mexican allotetraploid species *S. stoloniferum* (AABB) and its hybrids.

Lanes 1-6 – accessions of cultivated species with nuclear genome A - *S. ajanhuirii*, *S. phureja*, and varieties of *S. tuberosum* (cv. Atlantic, Rasant, Romanze, Sonate); lanes 7-9 – accessions of diploid Mexican species with nuclear genome B: *S. bulbocastanum*, *S. cardiophyllum*, *S. pinnatisectum*, respectively; lane 10 – *S. stoloniferum*.

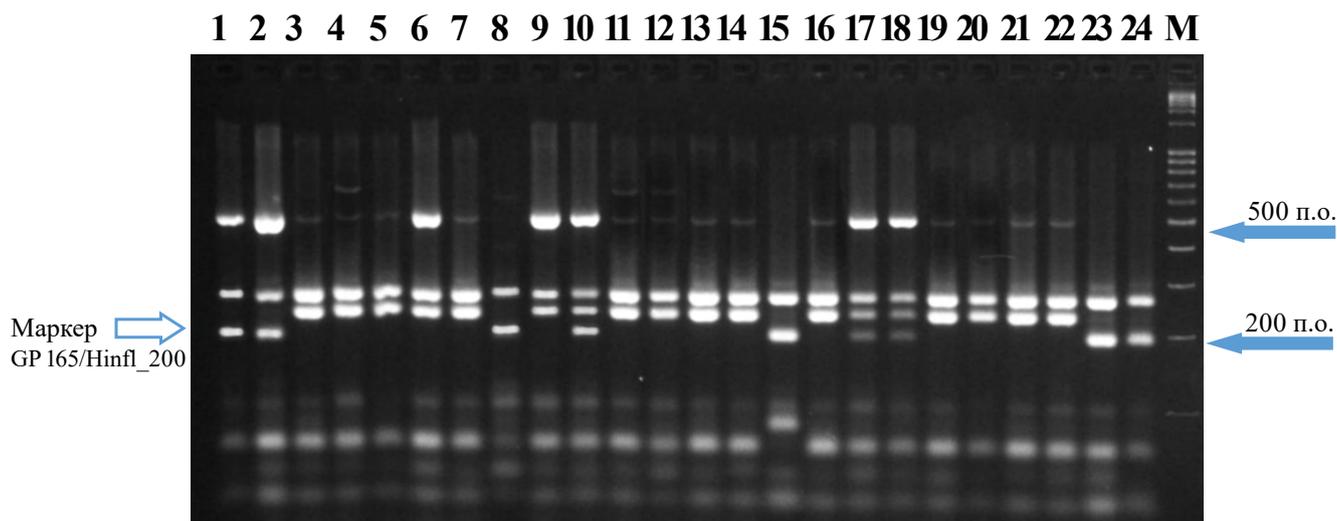


Рис. 4. Апробация потенциального маркера GP165_Hinfl_200 на выборке селекционных сортов и образцов видов картофеля – носителей ядерных геномов А и В.
 1) *S. stoloniferum*, PI 205522; 2) *S. stoloniferum*, k-17152; 3) *S. phureja*, k-9836; 4) *S. phureja*, k-11291; 5-7) *S. tuberosum*, селекционный клон 90N; сорта Baltica и Sonate, соответственно; 8) *S. cardiophyllum*, GLKS-108; 9) *S. tuberosum*, 10/1.21; 10) гибрид 2027.53; 11) *S. phureja*, k-12789; 12) *S. phureja*, k-9889; 13-14) *S. tuberosum*, сорта Delikat и Quarta; 15) *S. bulbocastanum*, GLKS-1741; 16) *S. etuberosum*, k-9141; 17) гибрид 2037.1; 18) гибрид 2053.52; 19) *S. phureja*, IVP35; 20-22) *S. tuberosum*, селекционный клон T67, сорта Rasant и Romanze; 23) *S. pinnatisectum*, GLKS-1607; 24) *S. tarnii*, GLKS-2870.

Fig. 4. Testing a potential marker using a set of released varieties and potato species with A and B nuclear genomes (GP165_Hinfl_200 marker).

- 1) *S. stoloniferum*, PI 205522; 2) *S. stoloniferum*, k-17152; 3) *S. phureja*, k-9836; 4) *S. phureja*, k-11291; 5-7) *S. tuberosum*, breeding clone 90N, cvs. Baltica and Sonate; 8) *S. cardiophyllum*, GLKS-108, 9) *S. tuberosum*, 10/1.21; 10) hybrid 2027.53; 11) *S. phureja*, k-12789; 12) *S. phureja*, k-9889; 13-14) *S. tuberosum*, cvs. Delikat and Quarta; 15) *S. bulbocastanum*, GLKS-1741; 16) *S. etuberosum*, k-9141; 17) hybrid 2037.1; 18) hybrid 2053.52; 19) *S. phureja*, IVP35; 20-22) *S. tuberosum*, breeding clone T67, cvs. Rasant and Romanze; 23) *S. pinnatisectum*, GLKS-1607; 24) *S. tarnii*, GLKS-2870.

В результате проведенных исследований удалось отобрать 23 хромосомо-специфических маркера, выявляющих полиморфизм родительских генотипов *S. tuberosum*, клон IGC 10/1.21, и образец PI 205522 дикого мексиканского вида *S. stoloniferum*; список отобранных маркеров приведен в таблице. Для хромосом V и VI нам пока не удалось подобрать полиморфные маркеры, отличающие исходные родительские генотипы. Отметим, что результаты амплификации отобранных маркеров у двух образцов дикого вида *S. stoloniferum* – PI 205522 и k-17152 – не отличались.

Созданный набор маркеров был использован для изучения хромосомного состава три- и пентаплоидных гибридов (*S. stoloniferum* × 2х *S. tuberosum*), полученных при реализации схем 1 и 4, и идентификации у них генетического материала субгенома В родительского образца PI 205522 дикого вида *S. stoloniferum*. У межвидовых гибридов IGC 15/103.52 (2n=36) и IGC 15/103.53 (2n=60) (*S. stoloniferum* PI 205522.3 × *S. tuberosum* IGC 10/1.21) были выявлены все изученные хромосомо-специфические фрагменты десяти хромосом дикого вида (см. таблицу). Обращают внимание различия

в результатах идентификации отдельных маркеров хромосом II и IX культурного вида *S. tuberosum* у этих гибридов, имеющих полные хромосомные наборы генома А культурного картофеля. Так, например, маркер STM 2022, специфичный к одноименному SSR-локусу хромосомы II генома А культурного картофеля (*tbr* IGC 10/1.21), детектирован у триплоидного межвидового гибрида IGC 15/103.52, но не выявлен у пентаплоидного - IGC 15/103.53; тот же результат получен с CAPS маркером GP 39/Hinfl-250+150, специфичным к фрагменту хромосомы IX генома А (см. таблицу). Можно предположить, что эти маркеры представлены у родительского клона *S. tuberosum* IGC 10/1.21 в гетерозиготном состоянии.

Наряду с хромосомо-специфическими SSR- и CAPS-маркерами в набор входил и аллель-специфичный маркер blb1F/R гена *Rpi-blb1* (хромосома VIII) диких мексиканских видов, детерминирующего устойчивость к широкому спектру рас возбудителя фитофтороза; этот маркер был выявлен у обоих межвидовых гибридов.

Таблица. Маркеры хромосом культурного картофеля *S. tuberosum* (клон IGC 10/1.21) и дикого мексиканского вида *S. stoloniferum* (образец PI 205522), выявленные у три- и пентаплоидного межвидовых гибридов IGC 15/103.52 и IGC 15/103.53.

Table. Chromosome markers of cultivated potato *S. tuberosum* (clone IGC 10/1.21) and the wild Mexican species *S. stoloniferum* (accession PI 205522) revealed in tri- ($2n=3x=36$) and pentaploid ($2n=5x=60$) interspecific hybrids IGC 15/103.52 and IGC 15/103.53.

Chromosome	Marker Name	<i>sto</i> * к-17152	<i>sto</i> PI 205522	<i>tbr</i> IGC 10/1.21	3x hybrid <i>sto</i> × <i>tbr</i> IGC 15/103.52	5x hybrid <i>sto</i> × <i>tbr</i> IGC 15/103.53
I	GPI75/MnII_200	1	1	0	1	1
I	GP264/MnII_460	1	1	0	1	1
I	GP264/MnII_400	0	0	1	1	1
II	STM 2022_198	0	0	1	1	0
II	STM 2022_204	1	1	0	1	1
III	Chr3-1/HaeIII_1400	0	0	1	1	1
III	Chr3-1/HaeIII_2500	1	1	0	1	1
III	GP 256/DdeI_250+350	1	1	0	1	1
III	GP 256/DdeI_550	0	0	1	1	1
IV	GP 165/HinfI_250	0	0	1	1	1
IV	GP 165/HinfI_200	1	1	0	1	1
VII	STM3009_106	1	1	0	1	1
VIII	Sti 048_191	1	1	0	1	1
VIII	blb 1 F/R	1	1	0	1	1
IX	GP 101/MnII	1	1	0	1	1
IX	GP 39/HinfI-400+350	1	1	0	1	1
IX	GP 39/HinfI-250+150	0	0	1	1	0
X	GP266-o/HpaII_800	1	1	0	1	1
X	GP218/RsaI_800	1	1	0	1	1
XI	Sti 028_201	1	1	0	1	1
XI	Chr11-2/RsaI_300+180	1	1	0	1	1
XII	CP60/DdeI_180	1	1	0	1	1
XII	Sti063_110	1	1	0	1	1

* В таблице указаны трехбуквенные коды названий видов: *sto* - *S. stoloniferum*, *tbr* - *S. tuberosum*.

Реализация схемы интрогрессии 1. В 2016 г. было получено около ста семян в результате опыления гексаплоидного клона IGC 15/118.3.C6.2016 пыльцой картофеля сорта Katahdin (эффективность гибридизации 33 семян/опыление). Всхожесть семян составила 84%. В 2017 г. 18 гибридов BC₁ вовлекли в гибридизацию в качестве материнских форм с сортом Quarta. В общей сложности получено 3714 семян, эффективность скрещиваний составила 23 семян/опыление. В 2018 г. беккроссирование растений BC₂ в качестве материнских растений оказалось успешным при использовании сортов Свитанок Киевский (75 семян/опыление), Уладар (44 семян/опыление) и Satina (1,6 семян/опыление). Большинство гибридов BC₂ были стерильны (ФФП менее 1 %) и низко фертильны (ФФП 1–10 %), однако у 5 из 14 гибридных генотипов ФФП была более 10 %; среди них был отобран один фертильный сеянец с маркерами генов устойчивости к PVY и фитофторозу, проявляющий агрономически ценные признаки культурного картофеля, который в дальнейших BC скрещиваниях использовался в качестве опы-

лителя. Удачными оказались скрещивания с сортом Янка: получено 148 семян (5,5 семян на опыление).

В 2019г. были получены семена в возвратных скрещиваниях гексаплоидных гибридов из интрогрессивной схемы 1 – SvSv-линия *S. tuberosum* × *S. stoloniferum* PI 205522 и *S. stoloniferum* PI 205522 × 2x *S. tuberosum* IGC 10/1.21 с тестерным сортом Lemchi Russet и с диплоидной линией IGC 17n8, формирующей нередуцированную пыльцу. Следует отметить, что у использованных в скрещиваниях тестерных генотипов маркеры генов *Ry_{adg}*, *Ry_{sto}*, *Ry_{f_{sto}}*, *Rpi-sto1*, *R3b* устойчивости к PVY и фитофторозу не были выявлены (Yermishin et al., 2016).

Реализация схемы интрогрессии 2. Тетраплоидный (EBN=3) гибрид IGC 16/36.1 (BC₁, предполагаемый геномный состав AAAB) был получен в 2016г. в результате опыления 30 цветков гексаплоидного клона IGC 15/118.3.C6.2016 диплоидной линией IGC 10/1.21 *S. tuberosum*. В общей сложности было получено 14 семян, из которых взошли только два, но жизнеспособным оказался лишь один сеянец. Гибрид IGC 16/36.1

имел пониженную мужскую фертильность (ФФП менее 5%) и не завязывал семян при свободном опылении. Попытки вовлечь его в скрещивания с сортами-опылителями в 2017 и 2018 гг. оказались неудачными. Гибрид IGC 16/36.1 в благоприятных для гибридизации условиях 2019 г. завязал 24 семян от опыления сортом Quarta (6 семян/опыление) и 33 семян от опыления линией IGC 17н8 (4,7 семян/опыление). Ягод от свободного опыления получено не было.

Реализация схемы интрогрессии 3. В 2018 г. растения гибрида IGC 16/36.1, выращенные в боксовой теплице в апреле-мае с досветкой лампами ДРИ-2000-6 завязали две ягоды от самоопыления (других цветущих растений картофеля в это время года не было). В одной из ягод оказалось четыре семени, из которых было получено два растения. Один сеянец, IGC 18/71.1 в скрещиваниях 2019 г. завязал семена от опыления сортами Lemchi Russet (56,5 семян/опыление), Labadia (22,6 семян/опыление), Alcmaria (10,8 семян/опыление) и линией IGC 17н8 (73,7 семян/опыление). Скрещивания второго сеянца, IGC 18/71.2, были успешными при опылении сортом Alcmaria (33 семян/опыление) и линией IGC 17н8 (29 семян/опыление). Оба сеянца завязали семена от свободного опыления (соответственно, 138 и 12 семян).

Реализация схемы интрогрессии 4. Пентаплоидный гибрид IGC 15/103.53 в 2017 г. удалось скрестить в качестве материнской формы с сортом Quarta: завязалось 20 семян (0,56 семян/опыление), из которых получено три жизнеспособных сеянца – IGC 17/192.2, 17/192.4, 17/192.5. В 2018г. беккроссирование этих гибридов сортами Свитанок Киевский и Carlita оказались неудачным. Однако в 2019г. все три гибрида BC₁ были успешно беккроссированы сортом Quarta (эффективность гибридизации, соответственно: 5,3; 34,3 и 5,5 семян/опыление). Также получены семена от скрещивания гибрида IGC 17/192.4 с сортом Labadia (16,3 семян/опыление) и линией IGC 17н8 (15 семян/опыление), а гибрида IGC 17/192.5 – с сортом Labadia (4,9 семян/опыление). Два последних гибрида завязали семена от свободного опыления (соответственно, 208 и 240 семян).

Гибрид F₁ IGC 15/103.53 в 2017г. завязал 145 семян от свободного опыления. Всхожесть семян была очень низкой – в 2018 г. получено 4 сеянца (2,7%). Эти сеянцы не удалось вовлечь в дальнейшую гибридизацию с сортами картофеля. Один из гибридов II, IGC 17/172.3 формировал функционально фертильную пыльцу и завязал большое количество семян в результате самоопыления, из которых получено 12 растений.

Обсуждение

Разработанный набор ДНК-маркеров позволил выявить хромосомо-специфические фрагменты десяти хромосом дикого вида у три- и пентаплоидных межвидо-

вых гибридов *S. stoloniferum* PI 205522.3 × *S. tuberosum* IGC 10/1/21. В дополнение к разработанному набору хромосомо-специфичных маркеров также были использованы известные из литературы маркеры генов *Ry_{adg}* (XI), *Ry_{sto}* и *Ry-f_{sto}* (XII) иммунитета к вирусу PVY, гена *R3b* (XI) расоспецифичной устойчивости к фитофторозу и гена *Rpi-stoI* (VIII), детерминирующего устойчивость к широкому спектру рас возбудителя фитофтороза; маркеры этих генов были выявлены у образца PI 205522 и в его потомстве (Yermishin et al., 2017a). Важно отметить, что все отобранные хромосомо-специфичные маркеры были также выявлены у другого образца дикого вида *S. stoloniferum* – к-17152. Не исключено, что данный набор маркеров может быть использован для изучения интрогрессии генетического материала большего числа образцов *S. stoloniferum*.

Реализованная в настоящей работе схема 1 вовлечения в селекцию дикого аллотетраплоидного вида картофеля *S. stoloniferum* отличается от известных схем интрогрессии тем, что в ней применялись оригинальные SvSv-линии, что позволяет преодолеть одностороннюю несовместимость, характерную для скрещиваний этого дикого вида (в качестве опылителя) с культурным картофелем, и позволяет получать потомство, характеризующееся мужской фертильностью (Yermishin et al., 2017b). Как видно из результатов настоящего исследования, реализация схемы интрогрессии 1 не связана со значительными проблемами отдаленной гибридизации картофеля. Эффективность гибридизации на всех этапах беккроссирования с культурным картофелем была относительно высокой, что дало положительный результат при небольшом объеме скрещиваний. Получены фертильные межвидовые гибриды поколений BC₁ и BC₂, один из них успешно использован в качестве опылителя в дальнейших скрещиваниях с сортами картофеля. Среди растений BC₁ и BC₂ с высокой частотой были представлены генотипы с высокой полевой устойчивостью к фитофторозу. Важно отметить, что большинство гибридов BC₃ имели признаки культурного картофеля (короткие столоны и клубни правильной формы с мелкими глазками (см. на обложке).

В отличие от обычно используемых прямых скрещиваний между диким аллотетраплоидным видом *S. stoloniferum* (2n=4x, EBN=2) и культурным картофелем (2n=4x, EBN=4) в сочетании с культурой *in vitro* незрелых зародышей или семян (Iwanaga et al., 1991; Singsit, Hanneman, 1991; Watanabe et al., 1992; Janssen et al., 1997; Panahandeh et al., 2008), гибрид IGC 16/36.1 (2n=4x, предполагаемый геномный состав AAAB) был получен путем опыления митотически удвоенного триплоидного межвидового гибрида (2n=6x, EBN=4) пыльцой высоко фертильной диплоидной линии IGC 10.21 *S. tuberosum* (2n=2x, EBN=2). Объем скрещиваний (30 опыленных цветков) был значительно меньшим в сравнении с рассмотренным выше методом получения подобных гибридов (несколько сотен опыленных цветков), культура *in vitro* незрелых зародышей или семян не применялась.

Таким образом, использование фертильных диплоидных линий *S. tuberosum* для беккроссирования культурным картофелем гексаплоидных межвидовых гибридов может быть перспективным как для повышения эффективности интрогрессии генов дикого вида (за счет гомеологичной рекомбинации генов), так и ускорения процесса беккроссирования межвидовых гибридов (за счет снижения уровня ploидности с 6х до 4х).

Как и ожидалось, межвидовой гибрид IGC 16/36.1 ($2n=4x$, EBN=3) было сложно вовлечь в скрещивания с сортами культурного картофеля ($2n=4x$, EBN=4) из-за различий их эффективной ploидности. Данный гибрид удалось скрестить с сортами картофеля лишь на третий год выращивания при оптимальных условиях окружающей среды для гибридизации картофеля, которые сложились летом 2019г.

Предполагалось, что получение самоопыленно-го потомства такого типа межвидовых гибридов позволит повысить эффективность их беккроссирования одним из родительских видов благодаря рекомбинации генов, связанных с контролем EBN (Ehlenfeldt, Hanneman 1988). Однако, выделенный нами тетраплоидный гибрид IGC 16/36.1 формировал пыльцу с низкой функциональной фертильностью и не завязывал семян в результате самоопыления. Потомство от самоопыления этого гибрида удалось получить в настоящем эксперименте благодаря использованию приема выращивания растений в условиях, повышающих пыльцевую продуктивность (досветка лампами ДРИ-2000-6) (Yermishin, 1998). Сеянцы от самоопыления IGC 16/36.1 заметно превосходили исходный межвидовой гибрид по мощности габитуса и интенсивности цветения. При небольшом объеме скрещиваний удалось получить достаточно большое количество семян от опыления их сортами картофеля (в общей сложности 585 семян), что позволяет рассчитывать на успех дальнейшего беккросса и возможность изучения особенностей интрогрессии генов дикого вида при использовании схемы 3. В литературе описаны примеры успешного беккроссирования сортами картофеля тетраплоидных межвидовых гибридов с *S. fendleri* (= *S. stoloniferum*) (эффективность 1,33 семян/опыление; Janssen et al., 1997) и *S. stoloniferum* (25-26 семян/опыление, Panahandeh et al., 2008).

В известной нам литературе нет сведений о получении пентаплоидных гибридов в результате опыления аллотетраплоидных видов картофеля диплоидными линиями *S. tuberosum*. Наиболее вероятный механизм их образования – за счет оплодотворения нередуцированной яйцеклетки ($2n$) дикого вида *S. stoloniferum* нормальной (n) пыльцой диплоидной линии культурного картофеля. Предполагаемый геномный состав AAABV пентаплоидного гибрида IGC 15/103.53 отличается от геномного состава пентаплоидных гибридов (AAAAB), которые получают в традиционной схеме интрогрессии (см. рис. 1, схему 1). Можно ожидать, что гибрид IGC 15/103.53 обладает двумя копиями генома В, а из трех его суб-

геномов А два получены от дикого вида. Нормальное спаривание в мейозе хромосом субгенома В у гибрида IGC 15/103.53 обеспечивает их регулярное расхождение, поэтому у гибридов поколения BC_1 - IGC 17/192.2, 17/192.4, 17/192.5 хромосомы субгенома В представлены в полном составе. Это же относится к генетическому материалу генома А *S. stoloniferum*.

Гибрид F_1 IGC 15/103.53 с трудом скрещивался с культурным картофелем: эффективность гибридизации с сортом Quarta – 0,56 семян/опыление, всхожесть семян 20%. Скрещиваемость с сортами картофеля гибридов BC_1 зависела от условий выращивания растений и их физиологического состояния. Сеянцы гибридов BC_1 не удалось вовлечь в гибридизацию в 2018г. Однако эффективность гибридизации растений, выращенных из клубней, в 2019г оказалось относительно высокой при использовании в качестве опылителей нескольких сортов картофеля (5-35 семян/опыление). Использование в скрещиваниях с сортами картофеля самоопыленного потомства пентаплоидного гибрида было не таким успешным, как в случае вышеупомянутого тетраплоидного гибрида. По-видимому, это связано с преобладанием у него генетического материала дикого вида, что проявлялось, в частности, в пониженном клубнеобразовании растений I1 и I2.

Заключение

Созданный набор хромосомоспецифичных ДНК-маркеров дикого аллотетраплоидного вида картофеля *S. stoloniferum* позволяет изучать особенности их переноса в геном культурного картофеля в процессе беккроссирования межвидовых гибридов в различных схемах интрогрессии. Предложены и реализованы три схемы интрогрессии генетического материала *S. stoloniferum*, повышающие вероятность успешного переноса в геном культурного картофеля генетического материала хромосом субгенома В этого дикого вида. В поколениях беккросса выделены гибридные генотипы с мужской фертильностью, у которых выявлены ДНК-маркеры генов устойчивости к PVY и фитофторозу дикого вида; с высокой полевой устойчивостью к фитофторозу; продуктивные, с признаками культурного картофеля (см. фото на обложке). Анализ потомства межвидовых гибридов поколений BC_2 - BC_3 с использованием созданного набора хромосомо-специфичных ДНК-маркеров предоставляет возможность изучения эффективности переноса в селекционный материал генетического материала *S. stoloniferum* в различных схемах (1-4) интрогрессии.

Исследование выполнено при поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-54-0020-Бел-а) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проекты Б16Р-103 и Б18М-091).

References/Литература

- Abramova L.I. Cytological and cytoembryological technique (for the study of cultivated plants): guidelines (Tsitologicheskaya i tsitoembriologicheskaya tekhnika (dlya issledovaniya kulturnykh rasteniy): metodicheskiye ukazaniya). Leningrad: VIR; 1981 [in Russian]. (Абрамова Л.И. Цитологическая и цитозембриологическая техника (для исследования культурных растений): методические указания. Ленинград: ВИР; 1981).
- Adiwilaga K.D., Brown C.R. Use of 2n pollen-producing triploid hybrids to introduce tetraploid Mexican wild species germplasm to cultivated tetraploid potato gene pool. *Theoretical and Applied Genetics*. 1991;81(5):645-652. DOI: 10.1007/BF00226732
- Bamberg J.B. Allelism of endosperm balance number (EBN) in *Solanum acaule* Bitt. and other wild potato species. *Theoretical and Applied Genetics*. 1994;89(6): 682-686. DOI: 10.1007/BF00223705
- Bamberg J.B., Hanneman R.E. Jr, Palta J.P., Harbage J.F. Using disomic 4x (2EBN) potato species germplasm via bridge species *Solanum commersonii*. *Genome*. 1994;37(5):866-870. DOI: 10.1139/g94-122
- Brown C.R. Characteristics of 2n pollen producing triploid hybrids between *Solanum stoloniferum* and cultivated diploid potatoes. *American potato journal*. 1988;65(2):75-84. DOI: 10.1007/BF02867455
- Camadro E.L., Espinillo J.C. Germplasm transfer from the wild tetraploid species *Solanum acaule* Bitt. to the cultivated potato, *S. tuberosum* L. using 2n eggs // *American potato journal*. 1991;67(11):737-749. DOI: 10.1007/BF03044524
- Chen X., Salamini F., Gebhardt C. A potato molecular-function map for carbohydrate metabolism and transport. *Theoretical and Applied Genetics*. 2001;102(2-3):284-295. DOI: 10.1007/s001220051645
- 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
- Flis B., Hennig J., Strzelczyk-Żyta D., Gebhardt C., Marczewski W. The *Ry^{f-sto}* gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistant to *Potato virus Y* maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122718 in PVY resistant potato cultivars. *Molecular Breeding*. 2005;15(1):95-101. DOI: 10.1007/s11032-004-2736-3
- Ehlenfeldt M.K., Hanneman R.E.Jr. Genetic control of Endosperm Balance Number (EBN): three additive loci in a threshold-like system. *Theoretical and Applied Genetics*. 1988;75(6):825-832. DOI: 10.1007/BF00258041
- Gavrilenko T., Antonova O., Shuvalova A., Krylova E., Alpatyeva N., Spooner D., 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., Klimenko N.S., Alpatyeva N.V., Kostina L.I., Lebedeva V.A., Yevdokimova Z.Z. et al. Cytoplasmic genetic diversity of potato varieties bred in Russia and FSU countries. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(6):753-764. [in Russian] (Гавриленко Т.А., Клименко Н.С., Алпатьева Н.В., Костина Л.И., Лебедева В.А., Евдокимова З.З. и др. Генетическое разнообразие сортов картофеля российской селекции и стран ближнего зарубежья по типам цитоплазм. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(6):753-764). DOI: 10.18699/VJ19.534
- Gavrilenko T., Pendinen G., Rokka V.-M., Antonova O., Thieme R. Homeologous chromosome pairing in distant allohaploid hybrids of the genus *Solanum*. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 2015;5(3):182-190. DOI: 1134/S2079059715030065
- 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. *Theoretical and Applied Genetics*. 2006;112(8):1458-1464. DOI: 10.1007/s00122-006-0248-8
- Ghislain M., Nunez J., Herera M.delR., Rignataro J., Guzman F., Bonierbale M., Spooner D.M. Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. *Molecular Breeding*. 2009;23(3):377-388. DOI: 10.1007/s11032-008-9240-0
- Hawkes J.G. The potato: evolution, biodiversity and genetic resources. Washington: Belhaven Press; 1990.
- Hayes R.J., Dinu I.I., Thill C.A. Unilateral and bilateral hybridization barriers in inter-series crosses of 4x 2EBN *Solanum stoloniferum*, *S. pinnatisectum*, *S. cardiophyllum* and 2x 2EBN *S. tuberosum* haploids and haploid-species hybrids. *Sexual Plant Reproduction*. 2005;17(6):303-311. DOI: 10.1007/s00497-005-0244-1
- Iwanaga M., Freyre R., Watanabe K. Breaking the crossability barriers between disomic tetraploid *Solanum acaule* and tetrasomic tetraploid *S. tuberosum*. *Euphytica*. 1991;52(3):183-191. DOI: 10.1007/00029395
- Jackson S.A., Hanneman R.E.Jr. Crossability between cultivated and wild tuber- and non-tuber-bearing *Solanums*. *Euphytica*. 1999;109(1):51-67. DOI: 10.1023/A:1003710817938
- Janssen G.J.W., van Norel A., Verkerk-Bakker B., Janssen R., Hoogendoorn J. Introgression of resistance to root-knot nematodes from wild Central American *Solanum* species into *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 1997;95(3):490-496. DOI: 10.1007/s001220050588
- Johnston S.A., den Nijs T.M., Peloquin S.J., Hanneman R.E.Jr. The significance of genetic balance to endosperm development in inter-specific crosses. *Theoretical and Applied Genetics*. 1980;57(1):5-9. DOI: 10.1007/BF00276002
- Lamm R. Investigation on some tuber-bearing *Solanum* hybrids. *Hereditas*. 1953;39(1-2):97-112. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1953.tb03404.x
- Levy A.V., Voronkova E.V., Polyukhovich Yu.V., Yermishin A.P. Representativeness of DNA-markers of late blight and PVY resistance genes in accessions of wild allotetraploid potato species *Solanum stoloniferum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences Belarus. Biological sciences*. 2017;2:46-54 [in Russian] (Левый А.В., Воронкова Е.В., Полюхович Ю.В., Ермишин А.П. ДНК-маркеры генов устойчивости к фитофторозу и к PVY у образцов дикого аллотетраплоидного вида картофеля *Solanum stoloniferum*. *Вестні нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*. 2017;2:46-54).
- Lössl A., Götz M., Braun A., Wenzel G. Molecular markers for cytoplasm in potato: male sterility and contribution of different plastid-mitochondrial configurations to starch production. *Euphytica*. 2000;116(3):221-230. DOI: 10.1023/A:1004039320227
- Milbourne D., Meyer R., Collins A.J., Ramsay L.D., Gebhardt C., Waugh R. Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Molecular and General Genetics*. 1998;259(3):233-245. DOI: 10.1007/s004380050809
- Oberhagemann P., Chatot-Balandras C., Schafer-Pregl R., Wagener D., Palomino C., Salamini F., Bonnel E., Gebhardt C. A genetic analysis of quantitative resistance to starch in potato: towards marker-assisted selection. *Molecular Breeding*. 1999;5(5):399-415. DOI: 10.1023/A:1009623212180
- Pallais N., Fong N., Berrios D. Research on the physiology of potato sexual seed production. In: Innovative methods for propagating potatoes, Rep. 28th Planning Conf.; 1984 December 10-14; CIP, Lima, Peru. Lima: CIP; 1985. p. 149-168.
- Panahandeh J., Valizadeh M., Khosroshhly M., Yermishin A.P., Khoei F.R., Mahna N. Microsporogenesis and crossing behavior of a tetraploid, interspecific inter-EBN hybrid potato. *Scientia Horticulturae*. 2008;116(4):348-353. DOI: 10.1016/j.scienta.2008.02.006
- Pausheva Z.P. Workshop on plant cytology (Praktikum po citologii rasteniy). Moscow: Kolos; 1970 [in Russian] (Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. Москва: Колос; 1970).
- Pendinen G., Gavrilenko T., Jiang J., Spooner D.M. Allopolyploid speciation of the tetraploid Mexican potato species revealed by genomic *in situ* hybridization. *Genome*. 2008;51:714-720. DOI: 10.1139/G08-052
- Ramanna M.S., Abdalla M.M.F. Fertility, late blight resistance and genome relationship in an interspecific hybrid, *Solanum polytrichon* Rydb × *S. phureja* Juz. et Buk. *Euphytica*. 1970;19(3):317-326. DOI: 10.1007/BF01904209
- Ross H. Potato breeding – problems and perspectives. Supplement 13 *Advances in Plant Breeding*. Paul Parey (ed.) Berlin, Hamburg; 1986.
- Singsit C., Hanneman R.E.Jr. Rescuing abortive inter-EBN potato hybrids through double pollination and embryo culture. *Plant Cell Reports*. 1991;9(9):475-478. DOI: 10.1007/BF00232099
- Song Y.S., Schwarzfischer A. Development of STS markers for selection of extreme resistance (*Ry^{f-sto}*) to PVY and maternal pedigree analysis of extremely resistant cultivars. *American Journal of Potato Research*. 2008;85(5):159-170. DOI: 10.1007/s12230-008-9044-0

- Spooner D.M., Rodriguez F., Polgar Z., Ballard H.E.Jr., Jansky S.H. Genomic origins of potato polyploids: GBSSI gene sequencing data. *Plant Genome (a Supplement to Crop Science)*. 2008;48(1):S27-S36. DOI: 10.2135/cropsci2007.09.0504tpg
- Swaminathan M.S. Notes on induced polyploids in the tuber-bearing *Solanum* species and their crossability with *S. tuberosum*. *American potato journal*. 1951;28(1):472-489. DOI: 10.1007/BF02854980
- Valkonen J.P.T., Wiegmann K., Hamalainen J.H., Marczewski W., Watanabe K.N. Evidence for utility of the same PCR-based markers for selection of extreme resistance to potato virus Y controlled by *Ry^{sta}* of *Solanum stoloniferum* derived from different sources. *Annals of Applied Biology*. 2008;152(1):121-130. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2007.00194.x
- Wang M., Allefs S., van den Berg R.G., Vleeshouwers V.G., van der Vossen E.A., Vosman B. Allele mining in *Solanum*: conserved homologues of *Rpi-blb1* are identified in *Solanum stoloniferum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 2008;116(7):933-943. DOI: 10.1007/s00122-008-0725-3
- von Wangenheim K.H. Zur Ursache der Kreuzungsschwierigkeiten zwischen *Solanum tuberosum* L. und *S. acaule* Bitt. bzw. *S. stoloniferum* Schlecht et Bouche. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung = Journal of plant breeding*. 1954;34:7-48. [in German].
- Watanabe K., Arbizu C., Schmiediche P. Potato germplasm enhancement with disomic tetraploid *Solanum acaule*. I. Efficiency of introgression. *Genome*. 1992;35(1):53-57. DOI: 10.1139/g92-009
- Yermishin A.P. Genetic basis of breeding potato for heterosis (Geneticheskiye osnovy selektsii kartofelya na geterozis). Minsk: Technologiya; 1998. p.37-40 [in Russian] (Ермишин А.П. Генетические основы селекции картофеля на гетерозис. Минск: Технология. 1998; С.37-40).
- Yermishin A.P. Genetic peculiarities of wild allotetraploid potato (*Solanum*) species as the object of breeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences Belarus. Biological sciences*. 2014;1:23-31 [in Russian] (Ермишин А.П. Генетические особенности аллотетраплоидных диких видов картофеля (*Solanum*) как объекта селекции. *Весці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*. 2014;1:23-31).
- Yermishin A.P., Svitoch O.V., Voronkova E.V., Gukasian O.N., Luksha V.I. Determination of the composition and the allelic state of disease and pest resistance genes in potato parental lines using DNA markers. *Russian Journal of Genetics*. 2016;52(5):498-506. DOI: 10.1134/S1022795416050057
- Yermishin A.P., Levy A.V., Voronkova E.V., Polyukhovich Yu.V. Luksha V.I., Ageeva A.S. Diploid hybrids between wild allotetraploid potato species *Solanum stoloniferum* Schldtl. & Bouchet and diploid clones of cultivated potato having genome B of wild species. *Doklady of the national academy of sciences of Belarus*. 2017a;61(5):80-89 [in Russian] (Ермишин А.П., Левый А.В., Воронкова Е.В., Полюхович Ю.В., Лукша В.И., Агеева А.С. Диплоидные гибриды между диким аллотетраплоидным видом картофеля *Solanum stoloniferum* Schldtl. & Bouchet и диплоидными клонами культурного картофеля *S. tuberosum* L., имеющие геном В дикого вида. *Доклады Национальной академии наук Беларуси*. 2017a;61(5):80-89).
- Yermishin A.P., Levy A.V., Voronkova E.V., Polyukhovich Yu.V., Ageeva A.S. Overcoming unilateral incompatibility in crosses with wild allotetraploid potato species *Solanum stoloniferum* Schldtl. & Bouchet. *Euphytica*. 2017b;213(11):249. DOI: 10.1007/s10681-017-2041-y
- Zhu S., Li Y., Vossen J.H., Visser R.G., Jacobsen E. Functional stacking of three resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato. *Transgenic Research*. 2012;21(1):89-99. DOI: 10.1007/s11248-011-9510-1

BIOLOGICAL PRODUCTS IN ORGANIC AGRICULTURE

Aipova R., Abdykadyrova A.B., Kurmanbayev A.A.

National Center for Biotechnology
13/5, Korgalzhyn Hwy., Nur-Sultan 010000, Kazakhstan;
✉ rakhilya-73@mail.ru

The review presents data on the creation of complex microbial preparations and their application in agricultural practice. According to economists, the turnover in the field of organic agriculture is worth 85-90 billion US dollars a year. Developers of biological products pay great attention to the creation of complex biofertilizers, which contribute to a stable 20-25% increase in yield, with a significant reduction of plant damage by root rot. Among the considered positive effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on plants are the ability to fix molecular nitrogen from the atmosphere, the synthesis of hormonal and fungitoxic substances, and the mobilization of sparingly soluble soil phosphates. The presented data show promise for the use of these microorganisms in the development of eco-friendly farming technologies in order to increase plant productivity and establish bio-control over the development of plant diseases, reduce the chemical load on the soil, and increase its fertility.

Key words: complex biological preparations, nitrogen-fixing, phosphate and potassium mobilizing microorganisms, bacterium, plant growth stimulation, wheat.

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/10.30901/2658-6266-2019-4-04>

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

Благодарности / Acknowledgements:

The work was performed within the «Transfer and adaptation of technologies for precision farming in the crop production on the principle of demonstration farms (polygons)» program in the Akmola region for 2018-2020 «Creation of complex biological preparation for increasing productivity of grain crops in the conditions of Northern Kazakhstan» Ministry of the Agriculture RK BR 06349586.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ В ОРГАНИЧЕСКОМ ЗЕМЛЕДЕЛИИ

Аипова Р., Абдыкадырова А.Б., Курманбаев А.А.

Национальный центр биотехнологии
010000 Казахстан, г.Нур-Султан, Шоссе Коргалжын, 13/5;
✉ rakhilya-73@mail.ru

В обзоре рассмотрены данные о создании сложных микробных препаратов и возможности их использования в практике сельского хозяйства. Согласно данным экономистов, оборот средств в области органического, экологически чистого сельского хозяйства насчитывает 85-90 миллиардов долларов в год. Разработчики биологических препаратов придают большое значение созданию комплексных биоудобрений, которые стабильно повышают урожай на 20-25%, при этом значительно снижают уровень поражения растений корневой гнилью. Рассмотрен ряд положительных эффектов действия бактерий PGRP (ризобактерии, стимулирующие рост растений) на растения, в том числе способность бактерий фиксировать молекулярный азот из атмосферы, синтезировать гормональные вещества и соединения, токсичные для грибов растений, а также мобилизовать трудно растворимые фосфаты почвы. Представлены данные, которые свидетельствуют в пользу перспектив использования микроорганизмов в развитии технологий экологически чистого сельского хозяйства с целью повышения продуктивности растений и биоконтроля над развитием болезней растений, уменьшения химической нагрузки на почвы и увеличения плодородия почв.

Ключевые слова: комплексные биопрепараты, азотфиксирующий, фосфат и калиймобилизующие микроорганизмы, бактерия, стимуляция роста растений, пшеница.

Для цитирования:

Аипова Р., Абдыкадырова А.Б., Курманбаев А.А.
Биологические препараты в органическом земледелии. *Биотехнология и селекция растений*. 2019;2(4):36-41. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-4-04

For citation:

Aipova R., Abdykadyrova A.B., Kurmanbayev A.A. Biological products in organic agriculture. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(4):36-41. (In Russ.) DOI: 10.30901/2658-6266-2019-4-04

УДК 631.147:632.3/8:632.937:631.8
Поступила в редакцию: 19.08.2019
Принята к публикации: 03.12.2019

Introduction

Since the middle of the 20th century, and especially during the past 20 years agriculture in economically advanced countries has been focusing on the development of organic agriculture and the production of environmentally sound and full-fledged food. Organic agriculture is based on the reduction or complete prohibition of plants and soil treatment with synthetic mineral fertilizers, chemical protection agents, plant growth regulators, and genetically modified organisms. The management of organic agriculture is aimed at maximizing the use of biological products and biotechnologies at all stages and phases of agricultural production. The following international standards for the organic farm supply and marketing sectors have been adopted: "EC 834/2007 Council Regulation (EC) № 834/2007. On organic production and labeling of organic production and repealing regulation (EC) № 2092/91-2007" and "USDA organic". The international technological Organics platform was created in 2009 to amalgamate several international institutions like IFOAM (International Federation of Organic Agriculture Movements), European organic certified council, Aoel, etc. The global market for organic agricultural produce is currently estimated at \$85 billion (Monastyrsky et al., 2019).

Organic practices in agriculture are currently used in 160 countries of the world. Organic agriculture laws work in 84 countries and, moreover, in dozens of countries such bills are drafted. Economists estimate that based on current gross turnover in organic agriculture, which amounts to \$85 to \$90 billion per year, this amount is projected to reach \$200-250 billion by 2020 (Development organic rural//farms in Kazakhstan, 2018). On November 27, 2015 the Law of the Republic of Kazakhstan "On production of organic products" was adopted. The Act established the legal, economic, social and organizational bases for the production of organic agriculture. This legislation is aimed at the rational use of the soil, promotion of healthy diets and protection of the environment (The Law..., 2015). Currently, Kazakhstan is in the process of adapting the international standards of Codex Alimentarius, as well as those of IFOAM, and is also using the international experience as an organic agricultural producer at the local level.

Kazakhstan has necessary prerequisites and great opportunities for the development of organic agriculture and livestock production: the "2050 Strategy" (The Strategy..., 2003) according to which Kazakhstan has to become a global player on the market of environmentally friendly products has been accepted, the Concept of transition of the Republic of Kazakhstan to "green" economy developed, and the "Agribusiness 2020" program, which specifies the conditions for the development of production and marketing of organic agricultural products, approved.

We already wrote in 1999 about the importance of developing biological agriculture in Kazakhstan. A special part of the monograph focused on biological products developed

with the use of a range of microorganisms either capable of fixing nitrogen, or involved in phosphate and potassium mobilizing activities, and able to stimulate plant growth or to suppress phytopathogenic effects of micromycetes and bacteria (Sadanov, Kurmanbayev, 1999).

In the Republic of Belarus, 75 % of the biological products produced by the Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus are bio-pesticides (Koloziets, 2018, unpublished).

In the field of biological preparations development for agriculture, the All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology has exclusive experience. The Russian Federation successfully applies the achievements of the Institute's scientists, such as Rhizotorphine and Extrasol biological products. Albit, a biological product developed at the G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms in Pushchino, also has a considerable sales market.

In the CIS (Commonwealth of Independent States) countries, biological products for agriculture are also successfully developed. Noticeable success has been achieved in Ukraine and Uzbekistan.

Creation of complex biofertilizers

Developers of biological products assign greater importance to the creation of integrated biofertilizers. There are two ways of achieving this: either by selecting bacteria with different useful functions, or by searching for one organism with polyfunctional properties.

The theoretical basis for the development of complex biological preparations was already laid by N.A. Krasilnikov and A.I. Korniyako (1944) who showed that the effectiveness of legume bacteria depends in many ways on the condition of soil microbiocenosis. For instance, weakly virulent strains became highly virulent in the presence of activator bacteria, such as those from the genus *Pseudomonas*. On the contrary, bacteria inhibitors delayed the growth of nodule bacteria. It was established that combinations of nodule bacteria with activators ensured the greatest increase in plant yield, if compared to the use of each of those bacteria individually (Krasilnikov, Korniyako, 1944).

The development of complex biological products is a labour-consuming process, nevertheless, intensive research continues.

Microbiologists in Uzbekistan created a multi-component biological product of a very complex structure, namely a complex microbiological fertilizer (CMF), which is a uterine bacterial culture of aerobic, ammonifying and denitrifying bacteria in a nutrient medium. The CMF is based on the aerobic bacteria belonging to the genera *Bacillus*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Pseudobacterium*, *Rhizobium*. These microorganisms are involved in the humification and mineral-

ization of organic residues. In addition, the CMF also includes anaerobic bacteria of the genera *Clostridium*, *Methanobacterium* and *Acetobacterium*. These are capable of decomposing almost insoluble organic compounds of phosphorus and have antagonistic activity in relation to phytopathogenic microorganisms. Also, the CMF comprises denitrification, ammonifying and lacto bacteria. Actinomycetes in this preparation are represented by *Streptomyces albus*, *Streptomyces griseus* and *Actinomyces elephantis*. The latter produce biologically active materials in the soil, synthesize vitamins B1, B3, B6, B12, inositol, PP, amino acids, glutamic acid, lysine, alanine, tryptophan and antibiotics. Microalgae were also included in the biopreparation (Patent. IAP 02430. Abduazizov, Baybaev, 2004).

The complex CMF product is very similar to the EM preparation by Teruo Higa ("Effective Microorganisms", Patent US5591634. Higa, 1997). CMF includes more than 80 cultures of microorganisms, microalgae, micromycetes, yeast, actinomycetes, etc., selected from fertile soil to improve the fertility of poor soils. EM consists of the following microorganisms: actinomycetes from the genera *Streptomyces*, *Streptovorticillium*, *Nocardia*, *Micromonospora* and *Rhodococcus*, phototrophic bacteria from the genera *Rhodospseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Chromatium* and *Chlorobium*, lactic bacteria from the genera *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Pedococcus* and *Streptococcus*, micromycetes from the genera *Aspergillus* and *Mucor*, as well as yeast from the genera *Saccharomyces* and *Candida*. In addition, T. Higa included phytopathogenic bacteria in the biopreparation to enhance the immune properties of plants (Higa, Parr, 1994; Patent US5591634. Higa, 1997).

Microbiologists from Taiwan developed a sophisticated biological product based on thermotolerant phosphate-mobilizing microorganisms. *Bacillus coagulans* C45, *Bacillus licheniformis* A3, *Bacillus smithii* F18, one actinomycete of *Streptomyces thermophilus* J57 and one micromycete of *Aspergillus fumigatus* O4 were part of it. All strains listed were selected from various composts. The biological product accelerated the transformation of various organic waste into the organic biofertilizer enriched with mobile phosphorus (Chang, Yang, 2009).

In practice, complex biofertilizers have been shown to contribute to a steady 25-50-plus % increase in yields of or more, as well as to a significant reduction in the incidence of root rot affecting plants (Tereshchenko, 2007). Along with that, the fungistatic effect is most often caused by the fact that soil biodiversity increases significantly due to the use of complex bacterial fertilizers, and the influence of undesirable populations decreases (e.g., populations of pathogenic fungi of plants). This allows plants to overcome their own limitations of the numerous constraints imposed by the Mitscherlich's Law of Diminishing Returns (Tereshchenko, 2007).

With intensive cropland farming, the situation with the multiplication of factors of limitation is quite common. In the same circumstances, even when the significance of each constraint is negligible, the overall effect of the mar-

ginal compensation of each factor can be very high. Thus, even when the efficacy of individual microbial populations is negligible, their combined effect can only be achieved by increasing biodiversity in the soil rhizosphere (Shchedrin, 2010).

Considering the problems related to plant seeds bacterization, like preservation of a high titre of bacteria depending on the preparation form, small shelf-life, processing of seeds in the shade, etc., and a lot of various conditions to be considered when using bacterial preparations, it has to be noted with regret that poor performance of those preps is natural, and their criticism is fair. The simplest statistical treatment of bacterization results generally demonstrates the random nature of rare positive reactions of soil and plants to bacterial fertilizers. The continued so called "introduction" of bacterial fertilizers in collective and individual farms will lead to a total undermining of the very idea of using microbial preparations (Tereshchenko, 2007).

Based on the above considerations, P.A. Kozhevnikov (2014) proposed to activate soil microbial cenosis through readily available carbon sources. The possibility of producing complex microbial fertilizers of different functional use based on natural microbial communities without growing microorganisms on a nutrient medium was shown. For this purpose, soil microbial cenosis was activated by introducing different sources of carbon and nitrogen. The activation of soil actinomycetes resulted in a pronounced effect in such a way that wheat growth increased by 65% compared to the control (Andreeva, Kozhevnikov, 2014).

Meta-analysis of the efficiency of microbial fertilizers based on a complex of microorganisms showed that the best inoculum for plants is a combination of arbuscular mycorrhiza, nitrogen fixators, and phosphate mobilizers. The effectiveness of such a complex was shown in 92% of 112 field experiments. Thus, the contribution to the yield is significant and variability is low (Schütz et al., 2018).

Without diminishing the scientific progress in many countries in this sphere, we believe that an individual approach to biological preparations should be applied in the same way as in medicine, i.e., local biological products have to be developed on the basis of native races of bacteria and micromycetes for a certain field and crops in this field adapted to soil climatic conditions of the particular region.

Northern Kazakhstan is one of the most economically important regions of agroindustrial complex of the Republic, since the production of spring common wheat is concentrated here. This agricultural crop is annually cultivated in the area of 8-10 million hectares and occupies about 80-85% of all acreage, and gross grain harvest averages 8-12 million tons (Shvidchenko et al., 1999). Thus, the spring-sown wheat is the most important crop for Kazakhstan. The Green Economy Development Concept of the Republic of Kazakhstan aims at significantly increasing the yield of this crop. Within the framework of efforts to achieve this goal, the importance of biofertilizers and bio-pesticides cannot be underestimated.

Biopesticides and symbiotic relations between bacteria and plants

A large number of works on microbial fertilizers for wheat are available in modern published scientific literature.

Tests of Rizoagrin and Flavobacterin biological products on 'Dzhangal' winter wheat variety have shown their effectiveness in conditions of Saratov region. Rizoagrin has been developed on the basis of nitrogen fixing bacteria of *Agrobacterium radiobacter* (Beijerinck and van Delden, 1902) Conn 1942 [*Rhizobium radiobacter* (Beijerinck and van Delden, 1902) Young et al., 2001] having signs of bacteria of the PGPR group. Flavobakterin is a biopesticide based on *Flavobacterium* spp. The latter, as part of the biopreparation, produces an antibiotic flavocin that suppresses a wide range of phytopathological bacteria and fungi. The use of Rizoagrin ensured an increase in wheat yield of 0.41 t/ha (13.5%) in comparison with the untreated control, while application of Flavobakterin in combination with humates resulted in an increase of 17.1% (Chekmareva, Nesterova, 2018).

The Rizoagrin preparation used for the inoculation of seeds of spring-sown wheat in the conditions of the Udmurt Republic positively affected the grain productivity, mass of straw and plant residues. Its action can be equivalent to the influence of a dose of $N_{40}P_{40}K_{40}$ fertilizer that gives big economic and power effect to the studied intake. As a result, the abundance of root decay decreased by 17.5%. The increase of a grain yield averaged 0.43 t/ha. Rizoagrin was more effective than the biological products Baikal and Mizorin which ensured an increase of 0.3 and 0.1 t/ha, respectively. Rizoagrin authentically improved nitrogen, phosphorus and potassium nutrition of plants that promoted wheat grain upgrading (Bashkov, 2011).

The application of Elena biofungicide (*Pseudomonas aureofaciens* IB 51) helped to achieve a 6% increase in gluten quality in wheat grain, and turned out to be efficient against a complex of diseases of winter wheat, such as root rot, mildew, septoria spot and brown rust. During tests in Krasnodar, Volgograd and Voronezh regions and also in the Republic of Bashkortostan, it was established that the biological efficiency of biofungicide Elena was 30-50% when the infection backgrounds ranged from 10 to 20% (Kuzina et al., 2013).

Inoculation of seeds of spring-sown wheat with the biological product BP2 based on endophytic bacteria, cultivation of plants in the nitrogen-deficient environment and application of N45 increased the grain yield irrespective of weather conditions. That could possibly happen due to an increase in plant security in the conditions of a lack of nitrogen and rise of plant resistance to stress. Application of Ekstrasol to seeds of spring wheat followed by vegetation under the conditions of nitrogen-free background only promoted an increase in spring wheat productivity of 26% on the average. It has been demonstrated that the complex use of nitrogen fertilizer in a dose of 45 kg/ha and biological products of endophytic bacteria made it possible to increase grain efficiency of spring-sown wheat by 1.6-2.1 times. (Alferov et al., 2017).

Much attention, particularly while developing complex biological products, has been given in recent years to the group of rhizospheric bacteria, the so-called plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). This group of bacteria is adapted to live in a rhizosphere of plants, and provide them with the best competitive conditions for growth and development, allowing the plants to overcome environmental stresses.

The Egyptian scientists tested the influence of a three-component PGPR-based biofertilizer on wheat yield. The biological product T11 provided an increase in grain and straw yield by 10.2 and 8.2%, respectively, in comparison with the control that received no treatment. The preparation T11 consisted of bacteria *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck, 1925) Tarrand et al., 1979, *Paenibacillus polymyxa* (Prazmowski, 1880) Ash et al., 1994 and *Nostoc muscorum*. In addition to the noted increase in wheat yield, preparation considerably enhanced biological activity of soils in the rhizosphere of wheat (El-Gamal Manal et al., 2015).

The work on the use of lactic bacteria as bacterial fertilizers is of particular interest. D.R. Yarullina with co-authors (2014) showed that *Lactobacillus plantarum* (Orla-Jensen 1919) Bergey et al. 1923 can level an oxidizing stress thanks to positive impact of bacterial NO (nitrogen oxide) on integrated antioxidant capacity and activity of a catalase (Yarullina et al., 2014).

An interesting solution was proposed by researchers from the Russian Federation, who used natural microbial cenosis from koumiss for developing a biological product Microbiovit. The microbiocenosis promoted an increase in yield capacity of wheat, vegetables and potatoes by 26–56%. The maturation period of wheat reduced by 9 days. The treatment of potato tubers with Microbiovit increased their resistance to rot agents, which in turn increased the product shelf-life. Bacteria from the genera *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Rhodopseudomonas*, *Bacillus* and the yeasts belonging to *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* dominated in the considered bio-product. The authors emphasize that one of the advantages of the preparation is the ease of cultivation of this biological community and its stability over time, in comparison with artificial compositions (Somova et al., 2017).

Other interesting ways to develop biological products for crop production are to use biologically active bacterial compounds to combat phytopathogens and to improve symbiotic relations between bacteria and plants.

Thus it was shown that biological surfactants produced by bacteria from the genus *Rhodococcus* and other bacteria were capable of suppressing viral infections of potatoes. Those surfactants were proposed as a means of improving crop health in monoclonal reproduction. For example, the preparation KP-2 suppressed potatoes X-virus reproduction. Microbial glycanes, antimetabolites (5-azadihydrouracils, cyanoguanidine) and bio-surfactants were part of the preparation. KP-2 also had anti-neoplastic activity caused by the bacterium *Agrobacterium tumefaciens* [*Rhizobium radiobacter* (Beijerinck and van Delden, 1902) Young et al. 2001] (Kovalenko, Karpenko, 2010 unpublished).

T.P. Pirog with co-authors (2013) showed the possibility of other uses of biosurfactants produced by the bacteria *Rhodococcus erythropolis* (Gray and Thornton, 1928) Goodfellow and Alderson, 1979, *Acinetobacter coaceticus* and *Nocardia vaccinii*, for instance, to monitor the amount of phytopathogenic bacteria. In the presence of surfactants, the growth of phytopathogenic bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Xantomonas* was almost completely suppressed (Pirog et al., 2013).

L.M. Babenko with co-authors (2017) used signaling molecules of quorum sensing bacterial cells to stimulate the growth of wheat. Autoinducer N-acyl homoserine lactone activated rhizospheric microflora, which positively affected wheat biomass and grain yield as a result (Babenko et al., 2017).

Recently, scientists have focused on the development of elicitor preparations. Many bacterial fertilizers have elicitor effects, increasing resistance of plants to adverse factors of soil environment and phytopathogens. A number of metabolites and signalling molecules of microorganisms can cause plant immunity and resistance to environmental stresses (temperature, salinity, contamination with heavy metal ions) (Gorovoj et al., 2002; Grineva et al., 2017).

Thus, the analysis of literature showed a variety of approaches in the development of biological products for the increase in productivity of crops and their quality. Bioproducts with fertilizer, elicitor and biopesticide effects are increasingly gaining market share and bringing organic agriculture closer to ideal by reducing the chemical load on the soil. The most promising biological products at the moment are elicitor preparations that increase the immunity of plants and their resistance to adverse environmental factors.

References/Литература

Alferov A.A., Chernova L.S., Zavalin A.A., Chebotar V.K. The effectiveness of the use of endophytic biological products and nitrogen fertilizer (Effektivnost primeneniya endofitnykh biopreparatov i azotnogo udobreniya). *Vestnik Rossijskoy selskoxozyajstvennoy nauki = Bulletin of the Russian Agricultural Science*. 2017;5:21-24. [In Russian] (Алферов А.А., Чернова Л.С., Завалин А.А., Чеботарь В.К. Эффективность применения эндофитных биопрепаратов и азотного удобрения. *Вестник Российской сельскохозяйственной науки*. 2017;5:21-24).

Andreeva O.A., Kozhevina P.A. Optimization of the natural community of soil microorganisms as a way to create microbial fertilizers (Optimizaciya estestvennogo soobshchestva mikroorganizmov pochvy kak sposob sozdaniya mikrobnnykh udobreniy). *Vestnik Moskovskogo Universiteta = Bulletin of Moscow University. Series 17. Soil science*. 2014;4:42-45 [In Russian] (Андреева О.А., Кожевина П.А. Оптимизация естественного сообщества микроорганизмов почвы как способ создания микробных удобрений. *Вестник Московского Университета*. Сер. 17. Почвоведение. 2014;4:42-45).

Babenko L.M., Moshinets E.V., Rogalsky S.P., Shcherbatyuk N.N., Suslova O.S., Kosakovskaya I.V. The influence of presowing priming with n-hexanoil-l-homoserinlactone on the formation of rhizospheric microflora and the yield structure of *Triticum aestivum* L. (Vliyaniye predposavnogo praimirovaniya n-geksanoil-l-gomoserinlaktonom na formirovaniye rizosfernoy mikroflory i strukturu urozhainosti *Triticum aestivum* L.). *Visnik Harkivs'kogo nacionalnogo agrarnogo universitetu Seriya biologiya = Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series Biology*

2017;1(40):106-118. [In Russian] (Бабенко Л.М., Мошинец Е.В., Рогальский С.П., Щербатюк Н.Н., Сулова О.С., Косаковская И.В. Влияние предпосевного праймирования n-гексаноил-l-гомосеринлактоном на формирование ризосферной микрофлоры и структуру урожайности *Triticum aestivum* L. *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія біологія*. 2017;1(40):106-118).

Bashkov A.S. Influence of Rizoagrin and other biopreparations on yield and quality of spring wheat products (Vliyaniye rizoagrina i drugih biopreparatov na urozhainost i kachestvo produktsii yarovoy pshenitsy). In: Proceedings of the All-Russian Scientific and Practical Conference «Scientific support for the development of the agricultural sector in modern conditions»; 2011 February 15-18; Izhevsk, Russia. Izhevsk; 2011. Vol. 1. p.3-9. [In Russian] (Башков А.С. Влияние ризоагрина и других биопрепаратов на урожайность и качество продукции яровой пшеницы. В кн.: Труды Всероссийской научно-практической конференции «Научное обеспечение развития АПК в современных условиях»; 15-18 февраля 2011 г.; Ижевск, Россия. Ижевск; 2011. Т. 1. С.3-9). URL: <https://ekosspb.ru/publications/26> [дата обращения: 13.11.2019].

Chang C.H., Yang S.S. Thermo-tolerant phosphate-solubilizing microbes for multi-functional biofertilizer preparation. *Bioresource Technology*. 2009;100(4):1648-1658. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.09.009

Chekmareva L.I., Nesterova N.K. The effectiveness of the use of humate and biological products of rhizoagrin and flavobacterin on winter wheat (Effektivnost primeneniya gumata i biopreparatov rizoagrina i flavobakterina na ozimoy pshenitse). *Agrarnyi nauchnyi zhurnal = Agrarian Scientific Journal* 2018;4:38-40. [In Russian] (Чекмарева Л.И., Нестерова Н.К. Эффективность применения гумата и биопрепаратов ризоагрина и флавобактерина на озимой пшенице. *Аграрный научный журнал*. 2018;4:38-40). DOI: 10.28983/asj.v0i4.449

Development of Organic Agriculture in Kazakhstan (Razvitie organicheskogo selskogo khozyaystva v Kazakhstane). Coalition for «green» economy and development «G-Global»: [website]. Kazakhstan. [In Russian] (Развитие органического сельского хозяйства в Казахстане. Коалиция за «зеленую» экономику и развитие «G-Global»: [сайт]. Казахстан. URL: <https://greenkaz.org/index.php/press-centr/novosti-v-strane/item/1987-razvitie-organicheskogo-selskogo-khozyaystva-v-kazakhstane>) Дата публикации: 12 марта 2018 г.

El-Gamal Manal A.H., Abo-Kora Hanaa A., Massoud O.N. Impact of formulated *Azospirillum lipoferum*, *Bacillus polymyxa* and *Nostoc muscorum* on wheat productivity. *International Journal of ChemTech Research*. 2015;8(9):100-113.

Gorovoj L.F., Koshevskij I.I., Red'ko V.V., Teslyuk V.V. New generation plant protection products (Preparaty novogo pokoleniya dlya zashchity rasteniy). *Sbornik trudov NAS Ukrainy = Proceedings of National Academy of Sciences of Ukraine*; 2002. p.87-92 [In Russian] (Горовой Л.Ф., Кошевский И.И., Редько В.В., Теслиук В.В. Препараты нового поколения для защиты растений. *Сборник трудов НАН Украины*; 2002. С.87-92).

Grineva I.A., Kuleshova Yu.M., Lomonosova V.A., Maslak D.V., Sadovskaya L.E., Skakun T.L., Feklistova I.N., Maksimova N.P. Preservation of the ability to induce systemic stability in the elicitor biological product during storage (Sokhraneniye v processe hraneniya u elisitornogo biopreparata sposobnosti indutsirovat sistemnyu ustoychivost). *Zhurnal Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Journal of Belarusian State University. Biology*. 2017;3:63-67. [In Russian] (Гринева И.А., Кулешова Ю.М., Ломоносова В.А., Маслак Д.В., Садовская Л.Е., Скакун Т.Л., Феклистова И.Н., Максимова Н.П. Сохранение в процессе хранения у элиситорного биопрепарата способности индуцировать системную устойчивость. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2017;3:63-67).

Higa T., Parr J.F. Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment. Atami, Japan: International Nature Farming Research Center; 1994.

Krasilnikov N.A., Korenyako A.I. The influence of soil microflora on the virulence and activity of nodule bacteria (Vliyaniye pochvennoy mikroflory na virulentnost i aktivnost klubenkovykh bakteriy). *Mikrobiologiya = Microbiology*. 1944;13(1):39-44. [In Russian] (Красильников Н.А., Кореньяко А.И. Влияние почвенной

- микрофлоры на вирулентность и активность клубеньковых бактерий. *Микробиология*. 1944;13(1):39-44).
- Kuzina E.V., Leont'eva T.N., Loginov O.N. Effect of biological products on the productivity and quality of winter wheat (Vliyaniye biopreparatov na produktivnost i kachestvo zerna ozimoy pshenitsy). *Izvestiya Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk = Bulletin of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. 2013;15(3(5)):1649-1652 [In Russian] (Кузина Е.В., Леонтьева Т.Н., Логинов О.Н. Влияние биопрепаратов на продуктивность и качество зерна озимой пшеницы. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2013;15(3(5)):1649-1652).
- Monastyrsky O.A., Kuznecova E.V., Esipenko L.P. Organic Farming and Production of Eco-Friendly Foodstuffs in Russia (Organicheskoye zemledelie i poluchenie ekologichnykh pishchevykh produktov v Rossii). *Agrohimiya = Agrochemistry*. 2019;1:3-4. [In Russian] (Монастырский О.А., Кузнецова Е.В., Есипенко Л.П. Органическое земледелие и получение экологических пищевых продуктов в России. *Агрохимия*. 2019;1:3-4). DOI: 10.1134/S000218811901006X
- Patent IAP 02430. Complex microbiological fertilizer and the way of its acquisition. Abduazizov M.N., Baybaev B. Uzb.; June 30, 2004.
- Patent US591634. Microbiological method for disposing of organic waste materials. Higa T.; Jan. 7, 1997.
- Pirog T.P., Konon A.D., Sofilkanch A.P., Iutinskaya G.A. Effect of surface-active substances of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, and *Nocardia vaccinii* K-8 on phytopathogenic bacteria. *Pikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*. 2013;49(4):360-367. [In Russian] (Пирог Т.П., Конон А.Д., Софилканич А.П., Иутинская Г.А. Действие поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ И-7241, *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ac-5017 и *Nocardia vaccinii* К-8 на фитопатогенные бактерии. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2013;49(4):364-371). DOI: 10.7868/S0555109913040119
- Sadanov A.K., Kurmanbaev A.A. Ecological biotechnology in the biologization of agriculture (Ekologicheskaya biotekhnologiya v biologizacii zemledeliya). Almaty: Agrouniversitet = Almaty: Agricultural University; 1999. [In Russian] (Саданов А.К., Курманбаев А.А. Экологическая биотехнология в биологизации земледелия. Алматы: Агроуниверситет; 1999).
- Schütz L., Gattinger A., Meier M., Müller A., Boller T., Mäder P., Mathimaran N. Improving crop yield and nutrient use efficiency via biofertilization – a global meta-analysis. *Frontiers in Plant Science*. 2018;8(2204):1-13. DOI: 10.3389/fpls.2017.02204
- Shchedrin V.N. Land reclamation as a basis for sustainable development of the agroindustrial complex of Russia (Melioraciya zemel osnova ustoichivogo razvitiya APK Rossii). *Don Agrarian Science Bulletin*. 2010;3:98-108. [In Russian] (Щедрин В.Н. Мелиорация земель основа устойчивого развития АПК России. *Вестник аграрной науки Дона*. 2010;3:98-106).
- Shvidchenko V.K., Zotikov V.I., Isenova A.K. Common spring wheat breeding in the north of Kazakhstan (Selektsiya yarovoy myagkoy pshenitsy na severe Kazakhstana). Astana: Akmolinsky agrarny universitet im. S.Seifullina = Astana: Akmola S. Seifullin Agrarian University; 1999. p.5-21 [In Russian] (Швидченко В.К., Зотиков В.И., Исенова А.К. Селекция яровой мягкой пшеницы на севере Казахстана. Астана: Ақмолинский аграрный университет им. С. Сейфуллина; 1999. С.5-21).
- Somova L.A., Mikheeva G.A., Pechurkin N.S. Introduction of microbiocenosis in agroecosystem for increasing the plant productivity. *Journal of Siberian Federal University. Biology*. 2017;10(3):333-342 [In Russian] (Сомова Л.А., Михеева Г.А., Печуркин Н.С. Внедрение микробиоценоза в агроэкосистему для повышения продуктивности растений. *Журнал Сибирского федерального университета. Биология*. 2017;10(3):333-342).
- Tereshchenko N.N. Bacterial fertilizers: problems and prospects (Bakterialnye udobreniya: problemy i perspektivy). *Siberian Bulletin of Agricultural Science*. 2007;7(175):14-20 [In Russian] (Терещенко Н.Н. Бактериальные удобрения: проблемы и перспективы применения. *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. 2007;7(175):14-20).
- The Law of the Republic of Kazakhstan. On Production of Organic Products: dated November 27, 2015 No. 423-V ZRK (Zakon respubliky Kazahstan O proizvodstve organicheskoy produktsii ot 27 nojabrja 2015 goda № 423-V ZRK) [In Russian] (Закон Республики Казахстан. О производстве органической продукции: от 27 ноября 2015 года № 423-V ЗРК. URL: https://online.zakon.kz/document/?doc_id=37002307#pos=164;-49
- The Strategy of using irrigated lands in modern conditions. *Land reclamation and water management*. 2003;3:45-51.
- Yarullina D.R., Asafova E.V., Kartunova Yu.E., Ziyatdinova G.K., Ilinskaya O.N. Probiotics for plants: *NO-producing lactobacilli protect plants from drought*. *Pikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*. 2014;50(2):189-192. DOI: 10.1134/S0003683814020197

Научный рецензируемый журнал
БИОТЕХНОЛОГИЯ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

Научный редактор: Михайлова Е.И.
Переводчик: Шувалов С.В.
Корректор: Шувалов С.В.
Компьютерная верстка: Чухин Г.К.

Подписано в печать 25.12.2019 Формат бумаги 70×100¹/₈
Бумага офсетная. Печать офсетная
Печ. л. 5,1 Тираж 30 экз.

Сектор редакционно-издательской деятельности ВИР
190000, Санкт-Петербург, Большая Морская ул., 42, 44

ООО "Р-КОПИ"
Санкт-Петербург, пер. Гривцова, 6б

БИОТЕХНОЛОГИЯ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

2019, 2 (4)