

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Федеральный исследовательский центр  
Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР)

*На правах рукописи*

**Клименко Наталья Станиславовна**

**Оценка генетического разнообразия сортов картофеля отечественной  
селекции с использованием различных типов ДНК-маркеров**

Направление: 06.06.01 – Биологические науки

Специальность: 03.02.07 – «Генетика»

**Научный доклад**

Санкт-Петербург

2019

0

Работа выполнена в отделе биотехнологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова»; руководитель отдела – Гавриленко Татьяна Андреевна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник отдела биотехнологии ВИР.

**Научные Гавриленко Татьяна Андреевна,**

**руководители:** доктор биологических наук, профессор, руководитель и главный научный сотрудник отдела биотехнологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова».

**Костина Людмила Ильинична,**

доктор биологических наук, главный научный сотрудник отдела генетических ресурсов картофеля Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова».

**Рецензенты: Зотеева Надежда Мубаровна,**

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова».

**Алпатьева Наталья Владимировна,**

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова».

## АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ

Возделываемый картофель (*Solanum tuberosum*) по объемам производства находится на пятом месте в мире среди всех сельскохозяйственных культур и на лидирующих позициях среди незерновых культур. Россия занимает третье место в мире по объемам производства картофеля после Китая и Индии (<http://www.fao.org/faostat>). В то же самое время отечественные сорта имеют невысокие показатели урожайности, одной из причин которых является недостаточное число сортов, устойчивых к различным вредным организмам (Филиппов, 2012; Хютти и др., 2017; Макарова и др., 2017).

Для формирования стратегии селекционных исследований, направленных на создание новых перспективных сортов картофеля, необходимо получение объективной информации о генетическом разнообразии возделываемых селекционных сортов, в том числе о распространении функциональных аллелей генов, контролирующих устойчивость к патогенам и вредителям. В настоящее время ведущие зарубежные генбанки и селекционные центры широко используют методы маркер-опосредованной селекции (Marker Assisted Selection – MAS) (Ramakrishnan et al., 2015). При помощи ДНК-маркеров проводят отбор образцов, потенциально устойчивых к цистообразующим нематодам (Milczarek et al., 2011, 2012, 2017; Asano et al., 2012; Ortega, Lopez-Vizcon, 2012; Schultz et al., 2012), фитофторозу (Śliwka et al., 2010; Tiwari et al., 2013; Li et al., 2017; Milczarek et al., 2017), к наиболее вредоносным вирусам картофеля (Tiwari et al., 2012; Ortega, Lopez-Vizcon, 2012; Fulladolsa et al., 2015; Li et al., 2017). Методы MAS начинают активно применяться в изучении селекционного генофонда картофеля и в нашей стране (Бирюкова и др., 2008, 2015, 2017; Гавриленко и др., 2009, 2018; Шанина и др., 2011; Фадина и др., 2017; Зотеева и др., 2017; Антонова и др., 2016, 2018; Рогозина и др., 2018).

Результаты ДНК-маркирования позволяют оценить уязвимость существующего генофонда по отношению к наиболее опасным патогенам и вредителям. Особое значение ДНК маркеры имеют в изучении устойчивости растений к карантинным объектам, когда существуют ограничения в использовании традиционных фитопатологических методов скрининга (Хютти и др., 2017).

Технологии ДНК маркирования перспективны при создании сортов с длительной устойчивостью к вредным организмам на основе пирамидирования в одном генотипе маркеров разных *R* генов, контролирующей устойчивость к разным расам и патотипам вредных организмов и/или устойчивость к разным патогенам. Ограничением в программах по подбору пар для скрещиваний и пирамидированию генов устойчивости может быть мужская стерильность, широко распространенная среди селекционных сортов картофеля (Grun et al., 1977; Ross, 1986; Гавриленко и др., 2019; Lössl et al., 2010; Hosaka, Sanetomo, 2012; Sanetomo, Gebhardt, 2015).

Методы ДНК маркирования имеют большое значение при работе с коллекциями. Наряду с методами MAS для оценки чистоты/идентичности сортового материала и изучения генетического разнообразия коллекций сортов используются методы молекулярной паспортизации.

## **ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Цель:** Оценка генетического разнообразия сортов картофеля отечественной селекции из коллекции ВИР с использованием методов ДНК-маркирования.

### **Задачи:**

1. На основе коллекции картофеля ВИР сформировать экспериментальную выборку отечественных сортов разных периодов селекции, созданных в различных селекционных центрах страны; создать электронную базу данных с информацией о родословных сортов и времени их создания, а также с опубликованными результатами их

фитопатологической оценки на устойчивость к наиболее вредоносным патогенам и вредителям.

2. Оценить уязвимость генофонда отечественных сортов картофеля по отношению к цистообразующим нематодам – объектам внутреннего и внешнего карантина. Оценить эффективность молекулярного скрининга с использованием различных маркеров *R* генов устойчивости к золотистой и бледной картофельным нематодам.

3. Провести молекулярный скрининг отечественных сортов картофеля с маркерами *R* генов экстремальной устойчивости к вирусу *Y* картофеля и с маркерами генов устойчивости к широкому спектру рас фитофторы, интрогрессированных в селекционный генофонд от дикого мексиканского вида *Solanum stoloniferum*.

4. С использованием маркеров различных локусов пластидной и митохондриальной ДНК проанализировать генетическое разнообразие сортов картофеля отечественной селекции по типам цитоплазм, ассоциированным с мужской стерильностью/фертильностью согласно литературным данным. Сопоставить полученные данные с результатами оценки фертильности пыльцы, выявить мужскостерильные сорта, оценить возможности подбора пар для скрещиваний и перспективы программ по пирамидированию *R* генов устойчивости.

5. Провести ваучеризацию и создать молекулярные паспорта российских сортов картофеля, созданных селекционерами северо-западного региона РФ.

#### **НАУЧНАЯ НОВИЗНА И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ**

-Генотипированы более 200 сортов отечественной селекции с использованием различных типов ДНК маркеров, определены их типы цитоплазм, выделены генотипы с функциональными маркерами *R* генов устойчивости к цистообразующим нематодам и вирусу *Y* картофеля.

-Впервые у сортов, созданных традиционными методами селекции с участием дикого мексиканского вида *S. stoloniferum*, выявлены

последовательности, гомологичные участкам генов  $RB/Rpi-blb1=Rpi-sto1$ , которые контролируют устойчивость к широкому спектру рас возбудителя фитофтороза у диких мексиканских видов картофеля.

-С использованием маркеров  $R$  генов устойчивости и высокополиморфных хромосомспецифичных монолокусных SSR маркеров (включая отобранные в данной работе) проведена оценка идентичности 30 сортов из коллекции ВИР.

-Проведена ваучеризация и молекулярная паспортизация 24 российских сортов картофеля, для которых совместно с сотрудниками Отдела агроботаники и *in situ* сохранения генетических ресурсов растений ВИР (к.б.н. И.Г. Чухиной и к.б.н. Л.Ю. Шипилиной) и авторами этих сортов (д.б.н. В.А. Лебедевой, к.б.н. З.З. Евдокимовой, к.б.н. Н.М. Гаджиевым из ЛенНИИСХ «Белогорка» и селекционной фирмы «Лига») были оформлены номенклатурные стандарты, которые хранятся в гербарии WIR.

## **ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ**

1. Аллельные профили отечественных сортов картофеля по хромосомспецифичным микросателлитным локусам и по ДНК-маркерам  $R$  генов устойчивости к патогенам и вредителям (к цистообразующим нематодам, вирусу  $Y$  картофеля и фитофторе).

2. Отечественные сорта картофеля характеризуются низким уровнем генетического разнообразия по типам цитоплазм.

3. Оформление номенклатурных стандартов сортов в соответствии с ICNCP (2016) и разработка молекулярных паспортов сорта с использованием тех же самых растений предоставляет возможности для оценки идентичности сортового материала с использованием методов ДНК маркирования.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Материалом** для исследования послужили 238 сортов картофеля селекции СССР, РФ и стран ближнего зарубежья из коллекции ВИР, из них: 198 российских, 21 белорусский и 13 украинских сортов. 69 сортов выборки

были получены непосредственно из учреждений-оригинаторов (ВНИИКХ, ИЦиГ СО РАН, ЛенНИИСХ Белогорка, ООО «Лига»). 147 сортов выборки (или 61,76 %) вошли в «Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию» в 2018 году, который в настоящее время включает 169 отечественных и 151 иностранный сорт. Список сортов представлен в таблицах 2 – 5 в разделе «Результаты».

**ДНК выделяли** из листьев сортов картофеля с использованием модифицированного метода СТАВ-экстракции (Gavrilenko et al., 2013).

**ДНК маркеры.** В таблице 1 перечислены использованные в работе ДНК маркеры, включая: (а) SCAR- и CAPS- маркеры *R*-генов устойчивости к цистообразующим нематодам *Globodera rostochiensis* и *Globodera pallida*, вирусу *Y* картофеля и *Phytophthora infestans*; (б) STS/CAPS/SSR маркеры для определения различных типов цитоплазм и (в) хромосомспецифичные монолокусные SSR маркеры для генотипирования сортов.

**ПЦР** проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10 нг тотальной ДНК сортов картофеля, 1× реакционный буфер (Диалат, Москва), 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ каждого из dNTPs, 0,2 мкМ прямого и обратного праймера и 1 ед. Таq-полимеразы (Диалат, Москва). Условия проведения ПЦР соответствовали рекомендациям разработчиков праймеров (табл. 1). В ряде случаев программы были оптимизированы путем введения функции TOUCHDOWN (в первом цикле температура отжига была на 5°C выше требуемой и понижалась на 1°C каждый цикл на протяжении пяти циклов). Все реакции при работе со SCAR-маркерами осуществляли не менее чем в трех повторностях.

**Рестрикция.** Обработку ПЦР-продуктов рестриктазами при использовании CAPS-маркеров проводили в 30 мкл реакционной смеси согласно протоколам фирмы-производителя фермента (СибЭнзим, <http://russia.sibenzyme.com>).

**Электрофорез** проводили в горизонтальном 2% агарозном геле в буфере TBE с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в УФ-свете.

**Секвенирование.** Диагностические фрагменты маркеров Rpi-sto1- и VLB1 очищали с помощью стандартного набора (Eurogen, # BC022, <http://evrogen.ru>) и секвенировали в обоих направлениях на 24-капиллярном 3500xL Genetic Анализаторе (Applied Biosystems) с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ВНИИ Сельхозмикробиологии. Выравнивание и анализ сиквенсов осуществляли с использованием программного обеспечения Unipro UGENE 1.29.0 (Okonechnikov et al., 2012) и BioEdit 7.1.9 (Hall, 1999). Полученные последовательности сравнивали с последовательностями ДНК из базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

**SSR-анализ.** Анализ полиморфизма ядерных монолокусных микросателлитов проводили с использованием хромосомспецифичных праймеров, отобранных по литературным источникам (табл. 1). ПЦР проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 40 нг тотальной ДНК сортов картофеля, 1× реакционный буфер (Диалат, Москва), 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,4 мМ каждого из dNTPs, 15 пМ прямого SSR праймера с комплементарной праймеру M13 последовательностью на 5'-конце, 15 пМ обратного SSR праймера, 25 пМ меченного IRD-700/800 прямого праймера M13 и 1 ед. Taq-полимеразы (Диалат, Москва). Условия проведения ПЦР в целом соответствовали рекомендациям разработчиков праймеров, однако для большей специфичности программы были оптимизированы добавлением функции TOUCHDOWN. Разделение ПЦР-продуктов выполняли в 6,5 % денатурирующих полиакриламидных гелях на приборе Li-Cor 4300S DNA Analyzer с лазерной детекцией фрагментов. Маркерами молекулярного веса служили маркеры фирмы Li-Cor “50-350 b.p.” (<https://www.licor.com>). Размеры фрагментов для каждого локуса определяли с использованием пакета программ Saga2. Для оценки полиморфизма микросателлитных



локусов использовали индекс PIC (polymorphic index content) =  $1 - \sum(p_i^2)$ , где  $p_i$  – частота  $i$  аллеля, выявленного в данной выборке (Nei, 1973).

**Данные фитопатологической оценки устойчивости сортов к *G. rostochiensis*, PVY и *Ph. infestans***, взяты из результатов Государственного испытания сортов («Государственный реестр селекционных достижений...», 2010–2018), каталогов сортов картофеля разных лет (Симаков и др., 2009а; Костина и др., 2010; Симаков и др., 2010; Костина и др., 2012; Анисимов и др., 2013; Костина и др., 2016) и тематических статей (Турко и др., 2007 и др.; Яшина, 2010; Кузин, Щегорец, 2012; Костина и др., 2014; Синцова, Сергеева, 2014; Козлова и др., 2010).

**Оценка мужской фертильности растений.** Фертильность пыльцы оценивали с помощью ацетокарминового метода под световым микроскопом (Axio Scope. ZEISS A1, Германия) при увеличении  $\times 200$ . Для каждого сорта просматривали не менее 300 пыльцевых зерен в двух повторностях.

Таблица 1. ДНК-маркеры, использованные в работе

<b>(а) ДНК-маркеры R-генов, использованные в молекулярном скрининге</b>							
Ген	Хромосома	Вид – источник интрог्रेसированного в сорта гена	Маркер	Последовательность праймеров (5'→ 3')	$T_m$ (°C)	Диагностический фрагмент (п.о.)	Литературный источник
<b>Маркеры гена <i>H1</i> устойчивости к <i>Globodera rostochiensis</i> (патотипы Ro1 и Ro4)</b>							
<i>H1</i>	V	adg	57R*	F: TGCCTGCCTCTCCGATTCT	60	450	Finkers-Tomczak et al., 2011; Schultz et al., 2012
				R: GGTCAGCAAAAGCAAGGACGTG			
<i>H1</i>	V	adg	TG 689	F: TAAAACCTCTTGGTTATAGCCTAT	55	141	Milczarek et al., 2011
				R: CAATAGAATGTGTTGTTTCACCAA			
<i>H1</i>	V	adg	N146	F: AAGCTCTTGCCTAGTGCTC	55	506	Takeuchi et al., 2008; Mori et al., 2011
				R: AGGCGGAACATGCCATG			
<i>H1</i>	V	adg	N195	F: TGGAAATGGCACCCACTA	55	337	
				R: CATCATGGTTTCACTTGTCAC			
<i>H1</i>	V	adg	239E4left /AluI	F: GGCCCCACAAACAAGAAAAC	51	120 + 230	Bakker et al., 2004
				R: AGGTACCTCCATCTCCATTTTGTAAAG			
<b>Маркеры гена <i>Gro1-4</i> устойчивости к <i>Globodera rostochiensis</i> (патотип Ro1)</b>							
<i>Gro1-4</i>	VII	spg	Gro1-4	F: TCTTTGGAGATACTGATTCTCA	58	602	Gebhardt et al., 2006
				R: CGACSTAAAATGAAAAGCATCT			
<i>Gro1-4</i>	VII	spg	Gro 1-4-1*	F: AAGCCACAACCTCTACTGGAG	60	602	Asano et al., 2012
				R: GATATAGTACGTAATCATGCC			
<b>Маркеры гена <i>Gpa2</i> устойчивости к <i>Globodera pallida</i> (патотипы Pa2 и Pa3)</b>							
<i>Gpa2</i>	XII	adg	Gpa2-1*	F: TTTAGCACGGAATGTGGGGA	60	1120	Asano et al., 2012
				R: GTTCCCCATCAAAACTCAC			

<i>Gpa2</i>	XII	adg	Gpa2-2*	F: GCACTTAGAGACTCATTCCA R: ACAGATTGTTGGCAGCGAAA	60	452	Asano et al., 2012
<b>Маркеры генов устойчивости к <i>Phytophthora infestans</i></b>							
<i>Rpi-sto1</i>	VIII	sto	Rpi-sto1*	F: ACCAAGGCCACAAGATTCTC R: CCTGCGGTTTCGGTTAATACA	65	890	Zhu et al., 2012
<i>Rpi-blb1</i>	VIII	blb	blb1F/R*	F: AACCTGTATGGCAGTGGCATG R: GTCAGAAAAGGGCACTCGTG	58	821	Wang et al., 2008
<i>Rpi-blb1</i>	VIII	blb	1/1'*	F: CACGAGTGCCTTTTCTGAC R: ACAATTGAATTTTTAGACTT	50	213	Colton et al., 2006
<i>Rpi-blb1</i>	VIII	blb	517/ 1519*	F: CATTCCAAGTCCATCTTGG R: TATTCAGATCGAAAGTACAACG	58	651	Wang et al., 2008
<i>RB/Rpi-blb1</i>	VIII	blb	RB-629*	F: GAATCAAATTATCCACCCCAACTT TTAAAT R: CAAGTATTGGGAGGACTGAAAGGT	65	629	Pankin et al., 2011
<i>Rpi-blb2</i>	VI	blb	B1b2F/R*	F: GGAAGTGGTAACGACAATCC R: AGCAGAGTTCCTTAATGC	58	773	Lokossou et al., 2010
<b>Маркеры генов устойчивости к PVY</b>							
<i>Ry<sub>sto</sub></i>	XII	sto	YES3-3A	F: TAACTCAAGCGGAATAACCC R: AATTCACCTGTTTACATGCTTCTTG TG	55	341	Song, Schwarzfischer, 2008
<i>Ry<sub>f<sub>sto</sub></sub></i>	XII	sto	GP122- 406/ EcoRV	F: CAATTGGCTCCCGACTATCTACAG R: ACAATTGCACCACCTTCTCTTCAG	52	406	Flis et al., 2005; Valkonen et al., 2008
<b>(б) ДНК-маркеры типов цитоплазм, использованные в молекулярном скрининге</b>							
Локус	Маркер/ Рестрик- таза	Праймер ы	Последовательность праймеров (5'→ 3')	$T_m$ (°C)	Диагностический фрагмент	Литературный источник	
<b>Маркеры типов хлДНК</b>							
<i>ndhC/ trnV</i>	T	H1	F: GGAGGGGTTTTCTTGGTTG R: AAGTTTACTCACGGCAATCG	60→ 55	Тип T - 202 п.о.	Hosaka, 2002	
<i>rps16/ trnQ</i>	S	NTCP6	F: GGTTCGAATCCTTCCGTC R: GATTCTTTCGCATCTCGATTG	63→ 58	Тип P - 127 п.о., остальные типы - 172- 175 п.о.	Bryan et al., 1999	
<i>cemA</i>	SAC/ BamHI	SAC	F: TTGGAGTTGTTGCGAATGAG R: GTTCCCTAGCCACGATTCTG	60	Типы A, M, P – нет рестрикции; W и T - рестрикция	Hosaka, Sanetomo, 2012	
<i>rpl32/ ccsA</i>	A/ BamHI	A	F: AACTTTTTGAACTCTATTCCCTTA ATTG R: ACGCTTCATTAGCCCATACC	60	Тип A - наличие рестрикции	Hosaka, Sanetomo, 2012	
<b>Маркеры типов мтДНК</b>							
<i>rps 10</i>	ALM4/5	ALM_4 ALM_5	F: AATAATCTTCCAAGCGGAGAG R: AAGACTCGTGATTACAGGCAAT	55	$\alpha$ – 2400 п.о. $\beta$ – 1600 п.о. $\gamma$ – нет фрагмента	Lössl et al., 2000	
<i>Band1</i>	D (Region 1)	Band1- F11	F: CGGGAGGTGGTGTACTTTCT	60	527 п.о.	Sanetomo, Hosaka, 2011; Hosaka, Sanetomo, 2012	
		Band1-R6	R: ACGGCTGACTGTGTGTTTGA				
	D (Region 2)	Band1-F8	F: AACTTGGGAAGCGAAAGCTCA	65→ 60	434 п.о.	Sanetomo, Hosaka, 2011	
		Band1-R9	R: ATTGCCGATGTCCAAGTAGG				
<b>(в) ДНК-маркеры pSSR локусов, использованные для генотипирования сортов</b>							

Локус	Хромосома	Мотив	Последовательность праймеров (5'→3')	$T_m$ (°C)	Литературный источник
<i>Sti012</i>	IV	(ATT) <sub>n</sub>	F: GAAGCGACTTCCAAAATCAGA	58→ 52	Ghislain et al., 2009; Feingold et al., 2005
			R: AAAGGGAGGAATAGAAAACCAAAA		
<i>Sti046</i>	XI	(GAT) <sub>n</sub>	F: CAGAGGATGCTGATGGACCT	60→ 54	Feingold et al., 2005
			R: GGAGCAGTTGAGGGCTTCTT		
<i>STM1106</i>	X	(ATT) <sub>13</sub>	F: TCCAGCTGATTGGTTAGGTTG	51 (55)	Ghislain et al., 2009; Milbourne et al., 1998
			R: ATGCGAATCTACTCGTCATGG		
<i>STM5121</i>	XII	(TCT) <sub>n</sub>	F: CACCGGAATAAGCGGATCT	51 (55)	Ghislain et al., 2009
			R: TCTTCCCTTCCATTTGTCA		

*Примечание.* Звездочкой (\*) отмечены внутригенные маркеры.  $T_m$  (°C) – температура отжига праймеров. Трехбуквенные сокращения названий видов картофеля: adg — *S. tuberosum* ssp. *andigenum*; blb – *S. bulbocastanum*; spg – *S. spegazzinii*; sto – *S. stoloniferum*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Молекулярный скрининг (MAS) отечественных сортов картофеля на наличие маркеров *R* генов устойчивости к цистообразующим нематодам – объектам внутреннего и внешнего карантина

#### 1.1. MAS с маркерами генов *H1* и *Gro1-4* устойчивости к патотипам *Ro1* и *Ro4* золотистой картофельной нематоды (ЗКН) – *Globodera rostochiensis*

По литературным данным источниками генов *H1* и *Gro1-4* устойчивости к *G. rostochiensis* послужили образцы южно-американских видов картофеля – ген *H1*, контролирующей устойчивость к патотипам *Ro1* и *Ro4*, был интродуцирован в сорта от нематодоустойчивых образцов *S. tuberosum* ssp. *andigenum* и *S. vernei* (Ellenby, 1954; Roos, 1979), а ген *Gro1-4*, детерминирующий устойчивость к патотипу *Ro1*, – от образцов *S. spegazzinii* (Roos, 1979; Barone et al., 1990). Практическим результатом исследований по картированию и секвенированию этих генов была разработка как сцепленных с ними, так и внутригенных маркеров (Finkers-Tomczak et al., 2011; Milczarek, 2011; Schultz et al., 2012; Milczarek, 2012), которые широко используются в молекулярном скрининге зарубежными исследователями (Milczarek et al., 2011, 2012, 2017; Asano et al., 2012; Ortega, Lopez-Vizcon, 2012; Schultz et al., 2012). В этих работах сообщалось о различной эффективности ДНК маркеров, используемых в MAS.

В молекулярном скрининге ограниченного числа отечественных сортов были задействованы лишь единичные маркеры (Бирюкова и др., 2008, 2015; Кузьминова и др., 2014). В наших исследованиях в молекулярный скрининг были привлечены пять маркеров гена *HI* (57R, TG689, N146, N195, 239E4left/AluI) (табл. 1) и первоначально проведена оценка их эффективности на выборке из 112 сортов отечественной селекции, для которых ранее были опубликованы результаты фитопатологического тестирования на устойчивость к патотипу Ro1 ЗКН. Одновременно все пять маркеров для скрининга одной и той же выборки использовались впервые. Эффективность маркеров вычисляли, как отношение количества совпадений между устойчивостью/восприимчивостью сортов к ЗКН и наличием/отсутствием у этих сортов диагностического фрагмента каждого из маркеров к числу несовпадений по анализируемому маркеру (рис. 1). Кроме того, в каждом варианте учитывали стабильность и воспроизводимость результатов амплификации.

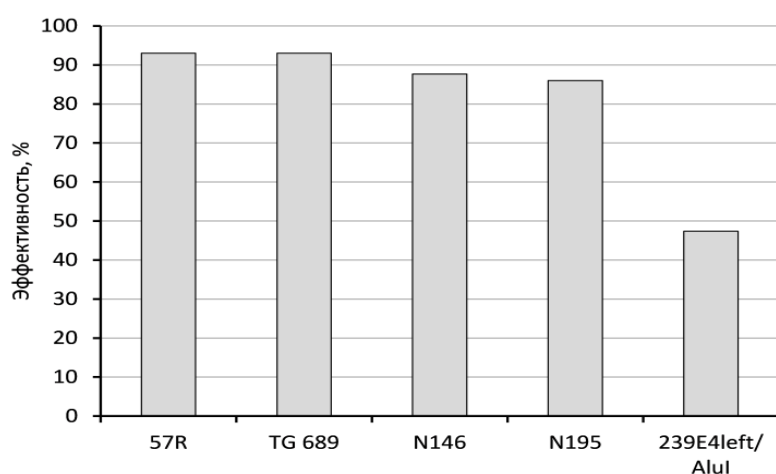


Рисунок 1.  
Эффективность маркеров генов *HI* устойчивости к *G. rostochiensis* (N=112)

Эффективность молекулярных маркеров, разработанных для детекции функциональных аллелей генов устойчивости к ЗКН, была различна. Максимальное совпадение с данными по фенотипической устойчивости сортов демонстрировали внутригенные SCAR-маркеры 57R и TG689 гена *HI*, эффективность которых составила 93 %, однако результаты амплификации TG689 могли быть нестабильны. Для устранения ложноположительных результатов при работе с TG689, информация о которых встречается и в

литературе (Schultz et al., 2012), условия реакции необходимо было ужесточить по сравнению с авторскими и применить функцию TOUCHDOWN. Высокая эффективность показана также для SCAR-маркеров N146 и N195. Однако эффективность CAPS-маркера 239E4left/AluI была низкой (47,4 %), что может быть обусловлено рекомбинационными событиями между геном *HI* и этим маркером, находящимися друг от друга на расстоянии 3 сМ (Bakker et al., 2004). Исходя из полученных результатов, дальнейший скрининг дополнительных 95 сортов проводили с меньшим числом маркеров. Суммарные результаты MAS расширенной выборки из 207 отечественных сортов с маркерами 57R и N195 представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты молекулярного скрининга 207 сортов картофеля отечественной селекции с использованием маркеров гена *HI*

Число сортов картофеля:  R – устойчивых к ЗКН  R/S – слабопоражаемые  S – поражаемых ЗКН	Ген	
	<i>HI</i>	
	Маркер	
	57R <sub>450</sub>	N195 <sub>337</sub>
<b>R (N=33):</b> Аврора, Амур, Алмаз, Альпинист, Балтийский, Барон, Бежицкий, Браво, Вдохновение, Верас, Вираз, Владимирский, Вымпел, Гранат, Гусар, Даная, Евразия, Ирбитский, Кемеровчанин, Кортни, Лига, Люкс, Манифест, Очарование, Пригожий 2, Пролисок, Рождественский, Русалка, Рябинушка, Саровский, Скарб, Сударыня, Шурминский 2	+	+
<b>R/S (N=2):</b> Алый парус, Холмогорский		
<b>S (N=3)*:</b> Олимп, Румянка, Сапрыкинский*		
<b>Нет данных о нематодоустойчивости (N=5):</b> Арлекин, Пранса, Самбо, Старт, Хмелевский		
<b>R (N=3):</b> Кристалл, Ладожский, Нарочь	+	0
<b>S (N=1):</b> Гарант*		
<b>R (N=1):</b> Сузорье		
<b>S (N=136):</b> Алена, Алиса, Антошка, Арина, Барин, Бармалей, Белогорский ранний, Белоснежка, Большевик, Бородянский розовый, Бронницкий, Брянская новинка, Брянский красный, Брянский надёжный, Брянский юбилейный, Брянский ранний, Букет, Вармас, Великан, Весна, Весна белая, Ветеран, Виза, Волжский, Выток, Вятка, Гарт, Гатчинский, Голубизна, Горянка, Губернатор, Детскосельский, Диво, Донцовский, Елизавета, Елисеевский, Жаворонок, Загадка Питера, Заравшан,	0	0

Зауральский, Здабытак, Зольский, Ильинский, Искра, Кабардинский, Каменский, Кемеровский, Колобок, Колпашевский, Комсомолец 20, Кормилец, Корона, Красавчик, Красная горка, Красная заря, Красная роза, Кустаревский, Лазарь, Лакомка, Ласунак, Лидер, Ломоносовский, Лорх, Лошицкий, Луговой, Лыбидь, Любава, Мастер, Матушка, Маугли, Москворецкий, Мусинский, Надежда, Накра, Нальчикский, Нарт 1, Нарымка, Невский, Незабудка, Никулинский, Огниво, Одиссей, Октябрёнок, Оредежский, Памяти Осиповой, Парус, Петербургский, Победа, Престиж, Прибрежный, Прикульский ранний, Призер, Приморский, Приобский, Рамзай, Резерв, Ресурс, Ромашка, Русич, Русская красавица, Русский сувенир, Свенский, Светлячок, Северянин, Сентябрь, Синева, Синтез, Сиреневый туман, Сказка, Скороплодный, Снегирь, Сокольский, Солнышко, Суйдинский ранний, Темп, Теща, Томич, Удача, Украинский розовый, Успех, Фаленский, Филатовский, Фиолетовый, Фокинский, Хибинский ранний, Чайка, Чародей, Чароит, Чая, Шаман, Энергия, Эффект, Юбилей Жукова, Юбилейный Осетии, Юпитер, Явар

**Нет данных о нематодоустойчивости (N=23):** Аметист, Белуха, Брат-2, Варсна, Горизонт, Горноуральский, Дружный, Зарево, Звездочка, Калинка, Катюша, Корневский, Красноуфимский, Лаймдота, Лекарь, Матс, Мурманский, Наука, Рассвет, Смена, Столовый 19, Танго, Фермер

*Примечание.* Положительным контролем для маркеров гена *H1* служил сорт Sante, для маркеров гена *Gro1-4* клон i-144844 образца k-12403 *S. gourlayi*. «+» – маркер выявлен, «0» – маркер не выявлен.\*См. раздел по генотипированию.

В исследованной выборке из 207 сортов отечественной селекции отобрано 47 (23 %) сортов с маркерами гена *H1*, из которых 36 по литературным данным были устойчивыми к патотипу Ro1 ЗКН в фитопатологических тестах, два – слабо поражаются; для пяти MAS-положительных сортов данных по фенотипизации найти не удалось, а четыре MAS-положительных сорта по литературным данным поражаются ЗКН, что требует дальнейшего изучения (см. раздел 3). Еще для 23 MAS-негативных сортов выборки данные о фитопатологическом тестировании на устойчивость к ЗКН найти также не удалось. Поскольку у этих 23 сортов не были выявлены диагностические фрагменты маркеров 57R и N195 (табл. 2), можно прогнозировать их поражаемость *G. rostochiensis*.

Кроме того, в MAS анализе участвовали и два маркера гена *Gro1-4*: Gro 1-4 и Gro 1-4-1, которые были выявлены только у трех (Самбо, Сапрыкинский, Сударыня) из 207 сортов выборки, в которой 37 сортов были устойчивы к ЗКН по данным Госреестра и каталогов (табл. 2). Т.е., только 8 % изученных отечественных нематодоустойчивых сортов имели маркеры гена *Gro1-4*, в то время как в работе Milczarek et al. (2011) сообщалось о ~30% сортов с диагностическими фрагментами маркера Gro1-4 у изученных

60 зарубежных нематодоустойчивых сортов. Все три сорта с маркерами гена *Gro1-4* одновременно обладали и маркерами гена *H1*, поэтому эффективность маркеров *Gro1-4* и *Gro1-4-1* оценить сложно. Детекция маркеров генов *Gro1-4* и *H1* у восприимчивого к ЗКН сорта Сапрыкинский требует перепроверки идентичности данного сорта (см. раздел 3 по генотипированию).

## **1.2. MAS с маркерами гена *Gpa2* устойчивости к патотипам Pa2 и Pa3 бледной картофельной нематоды – *Globodera pallida***

Информация о распространении маркеров гена *Gpa2* у отечественных сортов картофеля ограничена небольшим числом публикаций по данной теме. О.В. Маханько с коллегами (2014) выявили маркеры гена *Gpa2* у 8 белорусских сортов из 50 изученных (сорта без маркера не указаны). О детекции маркера *Gpa2-2* у 12 российских сортов сообщалось в работах В.А. Бирюковой с коллегами (2015, 2016). Поскольку в этих работах перечислены только сорта с наличием диагностического фрагмента маркера, а сорта с негативными результатами MAS и объем скринируемого материала не указаны, то оценка частоты встречаемости генотипов с геном *Gpa2* в генофонде российских сортов затруднительна.

Хотя на территории РФ бледная нематода пока не обнаружена, работы по скринингу отечественных сортов картофеля на наличие генов устойчивости к *G. pallida* не теряют своей актуальности. Присутствие *G. pallida* в странах, граничащих с Россией в северо-западном направлении (Норвегии, Финляндии, Эстонии) создает угрозу распространения *G. pallida* в приграничных субъектах РФ. Поэтому первоначально в молекулярный скрининг были вовлечены 33 сорта, созданные селекционерами северо-западного региона РФ (ЛенНИИСХ «Белогорка» и ООО Селекционная фирма «ЛиГа») и районированные на северо-западе России. У пяти из 33 сортов (Алый парус, Даная, Оредежский, Сиреневый туман, Чароит) амплифицировались диагностические фрагменты обоих маркеров гена *Gpa2* – *Gpa2-1* и *Gpa2-2*. Так как результаты MAS с применением обоих маркеров

совпали, дальнейший скрининг дополнительных 156 сортов отечественной селекции был продолжен с использованием только маркера *Gra2-2* (табл. 3), рекомендованного для исследований разработчиками обоих указанных маркеров (Asano et al. 2012).

Таблица 3. Результаты молекулярного скрининга 189 отечественных сортов картофеля с использованием маркера *Gra2-2* гена *Gra2*

Название сорта	Маркер гена <i>Gra2</i>
	<i>Gra2-2</i> <sub>452</sub>
<i>N=20</i> : Алиса, <u>Алый парус</u> , Бежицкий, Болвинский, Бородянский розовый, Букет, Вектар, <u>Даная</u> , Одиссей, <u>Оредежский</u> , Победа, Пранса, Приморский, Пролисок, Рамзай, <u>Сиреневый туман</u> , Теща, Чайка, <u>Чароит</u> , Юбилейный Осетии	+
<i>N=169</i> : Аврора, Алена, Альпинист, Аметист, Амур, Антошка, <u>Арина</u> , Архидея, <u>Балтийский</u> , Барин, Барон, <u>Белогорский ранний</u> , Белоснежка, Белуха, Большевик, Брат-2, Бронницкий, Брянская новинка, Брянский деликатес, Брянский красный, Брянский надежный, Брянский ранний, Вармас, Варсна, <u>Вдохновение</u> , Веселовский 2–4, <u>Весна белая</u> , Ветеран, Виза, Волжский, Вятка, Гарант, Гарт, <u>Гатчинский</u> , Горизонт, Горноуральский, Горянка, Гранат, Губернатор, <u>Гусар</u> , Диво, Донцовский, Дружный, <u>Евразия</u> , <u>Елизавета</u> , Жаворонок, <u>Жемчужина</u> , Загадка, <u>Загадка Питера</u> , Зарево, Зауральский, Звездочка, Здабытак, Зольский, Имандра, Искра, Кабардинский, Калинин, Каменский, Камераз, Катюша (селекция ПоСВИР), Катюша (Украина), Кемеровский, Колпашевский, Комсомолец-20, Корневский, Кормилец, Корона, Красавица, Красная горка, Красная заря, Красная роза, Красноуфимский, Кристалл, Кустаревский, Ладожский, Лазарь, Лазурит, Лаймдота, Лакомка, Ласунак, Лекарь, <u>Лига</u> , Лидер, <u>Ломоносовский</u> , Лорх, Лошицкий, Луговской, Лыбидь, <u>Майский цветок</u> , Манифест, Матс, Маугли, Москворецкий, Мурманский, Мусинский, Надежда, Нальчикский, Нарочь, Нарт 1, Нарымка, Наука, <u>Наяда</u> , <u>Невский</u> , Незабудка, Нестеровский, Никулинский, Огниво, Октябренок, Олимп, <u>Очарование</u> , <u>Памяти Осиповой</u> , Парус, <u>Петербургский</u> , Погарский, Престиж, Прибрежный, Пригожий 2, Приекульский ранний, Призер, Приобский, Рапсодия, Рассвет, Резерв, Ресурс, <u>Рождественский</u> , Ромашка, Росинка (Расинка), Румянка, Русалка, Русич, <u>Русская красавица</u> , Рябинушка, Сапрыкинский, Свенский, Светлячок, Северянин, Сентябрь, Синева, Синтез, <u>Сказка</u> , Скарб, Скороплодный, Смена, <u>Снегирь</u> , Сокольский, Солнышко, <u>Столовый 19</u> , <u>Сударыня</u> , <u>Суйдинский ранний</u> , Темп, Томич, Украинский розовый, Успех, Фаленский, Фермер, Филатовский, Фокинский, Хибинский ранний, <u>Холмогорский</u> , <u>Чародей</u> , Чая, Шаман, Шурминский 2, Энергия, Эффект, Юбилей Жукова, Юпитер, Явар	0

*Примечание.* Подчеркнуты названия сортов селекции ЛенНИИСХ «Белогорка» и/или ООО Селекционная фирма «ЛиГа». Положительный контролем для гена *Gra2* служил сорт Atlantic. «+» – маркер выявлен, «0» – маркер не выявлен.

Суммарно в изученной выборке из 189 отечественных сортов у 20 (10,6 %) был детектирован маркер *Gra2-2* (табл. 3). Эти сорта в дальнейшем могут служить потенциальными источниками устойчивости к *G. pallida*. Полученные результаты с дополнениями из цитированных выше статей



(Маханько и др., 2014; Бирюковой и др., 2015, 2016) позволяют оценить защищенность отечественного генофонда от объекта внешнего карантина – бледной картофельной нематоды. Суммарно у 169 сортов маркеры гена *Gpa2* не выявлены и у 40 сортов (19 %) детектированы диагностические фрагменты этих маркеров.

Следует выделить сорта Алый парус, Бежицкий, Даная, Пранса, Пролисок у которых амплифицируются внутригенные маркеры генов *Gpa2* и *H1* устойчивости к цистообразующим нематодам *G. pallida* и *G. rostochiensis*, соответственно (табл. 2, 3). Информация о наличии в селекционном генофонде маркеров генов устойчивости к *G. rostochiensis* и *G. pallida*, объектам внутреннего и внешнего карантина, актуальна еще и по причине сложности проведения отбора устойчивых к этим патогенам генотипов с использованием традиционных фитопатологических методов.

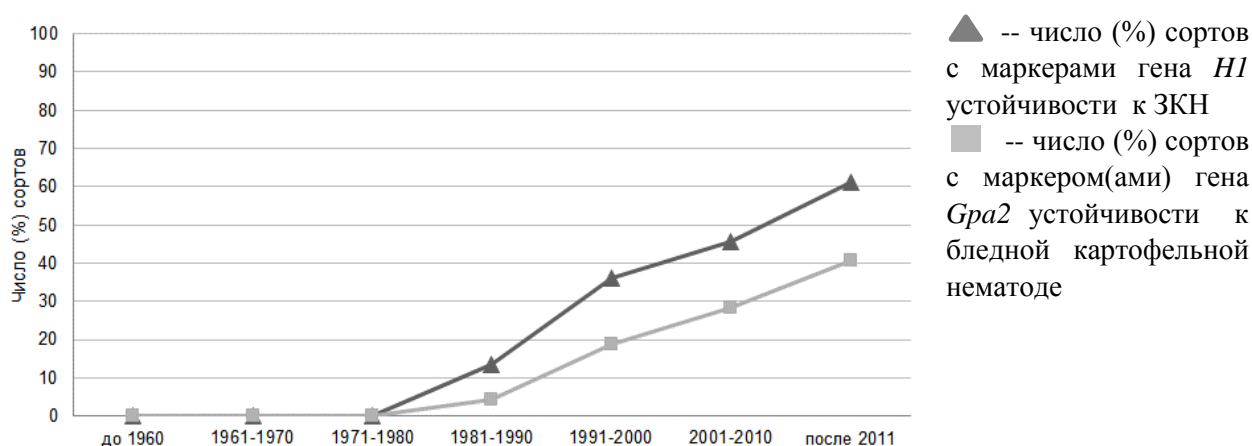


Рисунок 2. Частота сортов с маркерами генов *H1* и *Gpa2* среди отечественных сортов картофеля (включая данные из литературных источников  $N=244$  и  $178$ , соответственно), созданных в разные периоды.

На рисунке 2 приведена динамика создания в разные периоды отечественных сортов картофеля с маркерами генов устойчивости к цистообразующим нематодам, первое появление которых относится к началу 1980-х гг. Среди современных сортов, созданных в последнее десятилетие, частота устойчивых к *G. rostochiensis* (ЗКН) сортов достигает 60%. Создание устойчивых к ЗКН сортов стало одним из приоритетных направлений селекции картофеля со второй половины прошлого века, что связано с

быстрым распространением этого вредителя на территории РФ – ЗКН впервые обнаружена в РФ в 1948, а в 2014 г. была уже зарегистрирована в 61 субъекте (Хютти и др., 2017). Селекция на устойчивость к бледной нематоды *G. pallida* (объекту внешнего карантина) в РФ не проводилась. Положительную динамику численности сортов с маркерами гена *Gpa2* устойчивости к *G. pallida* можно объяснить достаточно интенсивной селекцией на устойчивость к одному из наиболее вредоносных вирусных патогенов – PVX. Известно, что ген *Gpa2* находится в одном кластере с геном *Rx1* устойчивости к PVX, причем физическое расстояние между ними составляет менее 115 т.п.о. (van der Vossen et al., 2000).

## **2. Молекулярный скрининг отечественных сортов картофеля с маркерами *R* генов экстремальной устойчивости к вирусу *Y* картофеля и с маркерами генов устойчивости к широкому спектру рас фитогторы, интрогрессированных в селекционный генофонд от дикого мексиканского вида картофеля *S. stoloniferum***

### **2.1. MAS с маркерами генов *Ry<sub>sto</sub>* и *Ry-f<sub>sto</sub>* экстремальной устойчивости (иммунитет) к вирусу *Y* картофеля (PVY), интрогрессированных от *S. stoloniferum***

Гены, обуславливающие экстремальную устойчивость (иммунитет) к PVY *Ry<sub>sto</sub>* и *Ry-f<sub>sto</sub>* картированы в одном и том же районе хромосомы XII (Heldák et al, 2007). Сцепленные с этими генами маркеры – YES3-3A и GP122-406/EcoRV – активно использовались в скрининге зарубежных сортов (Flis et al., 2005; Heldák et al., 2007; Song, Schwarzfischer, 2008; Lindner et al., 2011; Nie et al., 2016).

Т.А. Гавриленко с коллегами (2009) детектировали маркер GP122-EcoRV<sub>406</sub> гена *Ry-f<sub>sto</sub>* у трех (Брянский красный, Сокольский и Юбилей Жукова) из 107 скринированных сортов. В работе В.А. Бирюковой с коллегами (2015) сообщается о 10 сортах с маркером гена YES3-3A гена *Ry<sub>sto</sub>* (Башкирский, Бирюч, Ильинский, Колобок, Метеор, Москворецкий, Накра, Ресурс, Сокольский, Юбилей Жукова), без указания сортов с негативными результатами MAS и общего числа изученных сортов. Также сообщалось о

детекции маркера GP122-EcoRV<sub>406</sub> у сортов Брянский деликатес и Лорх (Кузьминова и др., 2014), хотя наши данные этот результат не подтверждают. Скрининг российских сортов с обоими маркерами – GP122-406/EcoRV гена *Ry-f<sub>sto</sub>* и YES3-3A гена *Ry<sub>sto</sub>* ранее не проводился за исключением наших работ (Гавриленко и др., 2018; Антонова и др., 2018), результаты которых приведены в таблице 4. Диагностические фрагменты указанных маркеров были обнаружены у 12 сортов и амплифицировались во всех случаях совместно, при этом только для сорта Колобок известен тип устойчивости к PVY – Яшина (2010) сообщала об иммунности этого сорта. Для остальных 9 сортов с маркерами GP122-406/EcoRV и YES3-3A, результаты определения типа устойчивости к PVY в литературе не найдены, однако для 7 из них (Брянский красный, Гусар, Корона, Москворецкий, Накра, Олимп, Погарский, Сударыня) сообщается о высоком уровне устойчивости к PVY (Каталог «Российские сорта картофеля», 2011; Каталог мировой коллекции ВИР №809, 2012).

Известно, что гены экстремальной устойчивости к PVY *Ry<sub>sto</sub>* и *Ry-f<sub>sto</sub>* перенесены в селекционный материал в результате межвидовой гибридизации с диким мексиканским видом картофеля *S. stoloniferum* (Flis et al., 2005; Song, Schwarzfischer, 2008). *S. stoloniferum* участвовал в родословных сортах Колобок (Simakov et al., 2007), Гусар и Сударыня (Гавриленко и др., 2018).

Таблица 4. Результаты молекулярного скрининга 205 сортов картофеля отечественной селекции с использованием маркеров генов  $Ry_{sto}$  и  $Ry-f_{sto}$

Название сорта	Ген	
	$Ry_{sto}$	$Ry-f_{sto}$
	Маркер	
	YES3-3A <sub>341</sub>	GP122-406/ЕcoRV <sub>406</sub>
<b>N=12:</b> Брянский красный, Гусар, Вектар, Ильинский, <b>Колобок</b> , Корона, Метеор, Москворецкий, Накра, Олимп, Погарский, Сударыня	+	+
<b>N=193:</b> Аврора, Аксамит, Алена, Алиса, Альый парус, Альпинист, Аметист, Амур, Антошка, Арина, Арлекин, Архидея, Бабушка, Балтийский, Барин, Барон, Бежицкий, Белогорский ранний, Белоснежка, Белуха, Болвинский, Большевик, Бородянский розовый, Bravo, Брат-2, Бронницкий, Брянская новинка, <b>Брянский деликатес</b> , <b>Брянский надежный</b> , <b>Брянский ранний</b> , Букет, Вармас, Варсна, Вдохновение, Веселовский 2-4, Весна белая, <b>Ветеран</b> , Виза, Вираз, Волжский, Вымпел, Вятка, Гарант, Гарт, Гатчинский, <b>Голубизна</b> , Горизонт, Горноуральский, Горянка, Гранат, Губернатор, Даная, Диво, Донцовский, Дружный, Евразия, Елизавета, Жаворонок, Жемчужина, <b>Жигулевский</b> , Жуковский ранний, Загадка Питера, Загадка, Зарево, Зауральский, Звездочка, Здабытак, Зольский, Имандра, Ирбитский, Искра, Кабардинский, Калинка, Каменский, Камераз, Катюша, Кемеровский, Кемеровчанин, Колпашевский, Комсомолец 20, Кореневский, Кормилец, Кортни, Красавица, Красная горка, Красная заря, Красная роза, Красноуфимский, Крепыш, Кристалл, Кузнечанка, Кустаревский, Ладожский, Лазурит, Лаймдота, Лакомка, Лекарь, Лига, Лидер, Ломоносовский, Лорх, Лошицкий, Луговской, Лыбидь, Любава, Люкс, Майский цветок, Манифест, Мате, Матушка, Маугли, Мурманский, Мусинский, Надежда, Нальчикский, Нарочь, Нарт-1, Нарымка, Наука, Наяда, Невский, Незабудка, Нестеровский, Огниво, Октябренок, Оредежский, Очарование, Памяти Осиповой, Парус, Петербургский, Победа, Престиж, При12 (Приморский), Прибрежный, Пригожий 2, Прикульский ранний, Призер, Приобский, Пролисок, Рамзай, Рапсодия, Рассвет, Резерв, Рождественский, Ромашка, Россиянка, Румянка, Русалка, Русич, Русская красавица, Рябинушка, Самбо, Сапрыкинский, Саровский, Свенский, Светлячок, Северянин, Сентябрь, Синева, Сиреневый туман, Сказка, Скороплодный, Смена, Снегирь, Солнышко, Старт, Столовый 19, Суйдинский ранний, Танго, Темп, Теща, Томич, Удача, Украинский розовый, Успех, Утенок, Фаленский, Фермер, Филатовский, Фиолетовый, Фокинский, Хибинский ранний, Холмогорский, Чайка, Чародей, Чароит, Чая, Шаман, Шурминский 2, Энергия, <b>Эффект</b> , Юбилейный Осетии, Юпитер	0	0

*Примечание.* **Жирным шрифтом** выделены сорта, иммунные к вирусу Y картофеля (Яшина, 2010). «+» – маркер выявлен, «0» – маркер не выявлен.

Изучение динамики появления отечественных сортов с маркерами генов  $Ry_{sto}$  и  $Ry-f_{sto}$  (рис. 3) указывает на период начала 1990-х гг., однако доля таких сортов в отечественном генофонде до сих пор остается невысокой (около 20 %).

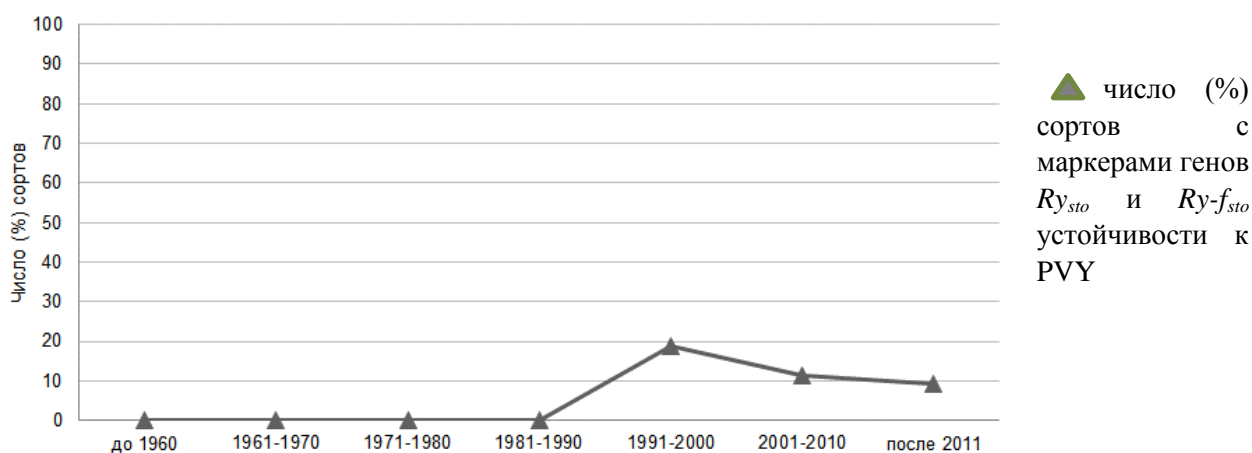


Рисунок 3. Частота сортов с маркерами генов  $Ry_{sto}$  и  $Ry-f_{sto}$  среди отечественных сортов картофеля (включая данные из литературных источников  $N=206$ ), созданных в разные периоды.

Интересно отметить, что Яшина (2010) сообщала об иммунности к PVY еще для 7 сортов (Брянский деликатес, Брянский надежный, Брянский ранний, Ветеран, Голубизна, Жигулевский, Эффект), у которых мы не обнаружили маркеры GP122-406/EcoRV и YES3-3A (табл. 4). Анализ литературных данных позволяет предположить, что их экстремальная устойчивость обусловлена интрогрессией других  $R$  генов устойчивости к PVY от южноамериканских видов *S. chacoense* и *S. tuberosum* ssp. *andigenum*. Так, у сортов Брянский надежный и Ветеран выявлен RAPD маркер 38-530 ( $Ry_{chc}$ ) (Бирюкова и др., 2015). SCAR маркер RYSC3-320 гена детектирован у сорта Эффект (Гавриленко и др., 2009) и у сортов Брянский ранний и Голубизна (Бирюкова и др., 2015). У сорта Брянский деликатес был выявлен маркер RYSC3-320 гена  $Ry_{adg}$  (Гавриленко и др., 2009) и RAPD маркер 38-530 ( $Ry_{chc}$ ) (Бирюкова и др., 2015).

## 2.2. MAS с маркерами генов $RB/Rpi-blb1=Rpi-sto1$ устойчивости к широкому спектру рас *Phytophthora infestans*, интрогрессированных от дикого мексиканского вида *S. stoloniferum*

Одним из наиболее вредоносных патогенов картофеля является оомицет *Ph. infestans* (Haverkort et al., 2008, 2009, 2016; Еланский, 2015). В первой половине 20 века усилия селекционеров были направлены на интрогрессию в

сорта генов *R1—R11* расоспецифичной устойчивости к фитофторозу, источником которых является дикий мексиканский вид *S. demissum* (Malcolmson, Black, 1966). О высокой частоте внутригенных маркеров генов *R1* и *R3a* у отечественных сортов сообщали Бекетова, Хавкинин (2006), Beketova et al. (2017), Sokolova et al. (2010). В настоящее время направление селекции сортов с расоспецифичным типом устойчивости не столь актуально, поскольку данный тип устойчивости не обеспечивает длительной защиты сортов от фитофтороза (Wastie, 1991; Fry, Goodwin, 1997; Fry, 2008). С начала 2000 годов усилия исследователей разных стран направлены на интрогрессию *rpi*-генов устойчивости к широкому спектру рас возбудителя фитофтороза (Haverkort et al 2009, 2016). Первым идентифицированным *rpi*-геном был *Rpi-blb1* (Naess et al., 2000; Song et al., 2003; van der Vossen et al., 2003) дикого диплоидного мексиканского диплоидного вида *Sbulbocastanum*, практически не скрещивающегося с *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*. Функциональный гомолог гена *Rpi-blb1* – *Rpi-sto1* был выявлен у дикого аллотетраплоидного мексиканского вида *S. stoloniferum* (Wang et al., 2008; Lokossou et al., 2010) относительно легко вовлекаемого в гибридизацию.

Зарубежные исследователи и селекционеры Центрального региона России вовлекали *S. stoloniferum* в селекцию, начиная с 1970-х гг., в качестве источника генов экстремальной устойчивости к вирусу Y (Simakov et al., 2007; Song, Schwarzfischer, 2008; Яшина и др., 2010; Sanetomo, Gebhardt, 2015; Бирюкова и др., 2015). Селекционеры северо-западного региона РФ, в котором из-за климатических условий отмечается повышенная частота эпифитотий фитофтороза, использовали *S. stoloniferum* и в качестве источника устойчивости к *Ph. infestans*. В связи с этим, было высказано предположение, что в селекционном материале, созданном в этом регионе, возможно отобрать генотипы с *Rpi-sto1*. По этой причине мы привлекли 33 сорта и 7 перспективных селекционных клонов, созданных в ЛенНИИСХ «Белогорка» и ООО Селекционной фирме «ЛиГа», в молекулярный скрининг с внутригенными маркерами генов *RB/Rpi-blb1* (BLB1F/R, 1/1', 517/1519, RB-

629) и *Rpi-sto1* (маркер Rpi-sto1) (рис. 4). Перечисленные маркеры были одновременно детектированы у трех сортов Сударыня, Евразия, Балтийский и трех селекционных клонов 1101/10, 1604/16, 3602/28 (табл. 5), которые были созданы З.З. Евдокимовой (ЛенНИИСХ «Белогорка») с участием одной и той же интрогрессивной формы 8889/3, отобранной в потомстве межвидового гибрида с *S. stoloniferum*.

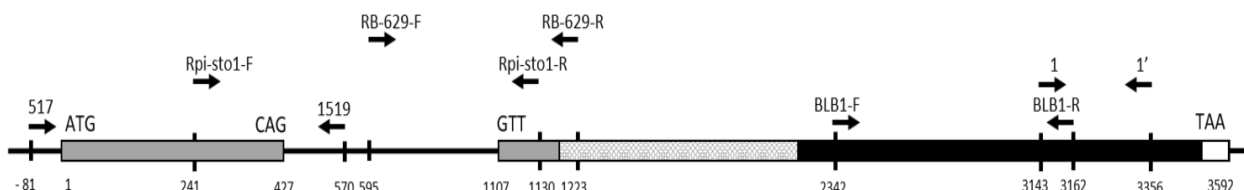


Рисунок 4. Структура генов *RB/Rpi-blb1* и *Rpi-sto1* и локализация пяти внутригенных маркеров, использованных в данной работе: Rpi-sto1, BLB1F/R, 1/1', 517/1519, RB-629, 1521/518 (по Lokossou et al., 2010 с изменениями). Широкой линией показаны экзон 1 (1–427 пн) и экзон 2 (1107–3592 пн). Узкой линией показаны интрон и фланкирующие последовательности гена участка. Нумерация нуклеотидов начинается со старта кодона и включает в себя последовательность интрона. Участки, соответствующие CC-, NBS- и LRR- доменам обозначены серым, светло серым и черным цветами, соответственно. Стрелками показаны места посадки праймеров. Число, указанное под стрелкой, соответствует позиции первого нуклеотида на 5' конце праймера. Названия праймеров указаны над стрелками.

В дальнейшем молекулярный скрининг был продолжен с участием выборка 184 сортов, созданных в других отечественных селекцентрах, в результате были отобраны еще два сорта – Аврора и Огниво, также несущих все пять маркеров генов *RB/Rpi-blb1* и *Rpi-sto1* (табл. 5).

Таблица 5. Результаты молекулярного скрининга объединенной выборки из 217 отечественных сортов с использованием маркеров генов *RB/Rpi-blb1=Rpi-sto1*

Название сорта	Ген				
	<i>Rpi-sto1 = RB/Rpi-blb1</i>				
	Маркер				
	Rpi-sto1	BLB1F/R	1/1'	517/1519	RB-629
N=8: Аврора, Балтийский, Евразия, Огниво, Сударыня, 1101/10, 1604/16,	+	+	+	+	+

3602/28	
<p><b>N=212:</b> Аксамит, Альпинист, Алена, Алиса, <u>Алый парус</u>, Аметист, Амур, Антошка, <u>Арина</u>, Арлекин, Архидея, Бабушка, Барин, Барон, Бежицкий, <u>Белогорский ранний</u>, Белоснежка, Белуха, Большевик, Болвинский, Бородянский розовый, Bravo, Брат-2, Бронницкий, Брянская новинка, Брянский деликатес, Брянский красный, Брянский надежный, Брянский ранний, Букет, Вармас, Варсна, <u>Вдохновение</u>, Вектар, Веселовский 2-4, <u>Весна белая</u>, Ветеран, Виза, Вираз, Волжский, Вымпел, Вятка, Гарант, Гарт, <u>Гатчинский</u>, Голубизна, Горизонт, Горноуральский, Горянка, Гранат, Губернатор, <u>Гусар</u>, <u>Даная</u>, Диво, Донцовский, Дружный, <u>Елизавета</u>, Жаворонок, <u>Жемчужина</u>, Живица, Жигулевский, Жуковский ранний, <u>Загадка Питера</u>, Загадка, Зарево, Зауральский, Звездочка, Здабытак, Зольский, Ильинский, Имандра, Ирбитский, Искра, Кабардинский, Калинка, Каменский, Камераз, Катюша, Кемеровский, Кемеровчанин, Колобок, Колпашевский, Комсомолец 20, Кореневский, Кормилец, Корона, Кортни, Красавица, Красная горка, Красная заря, Красная роза, Красноуфимский, Крепыш, Кристалл, Кузнечанка, Кустаревский, Ладожский, Лазарь, Лазурит, Лаймдота, Лакомка, Ласунак, Лекарь, <u>Лига</u>, Лидер, <u>Ломоносовский</u>, Лорх, Лошицкий, Луговской, Лыбидь, Любава, Люкс, <u>Майский цветок</u>, Манифест, Матс, Матушка, Маугли, Метеор, Москворецкий, Мурманский, Мусинский, Надежда, Накра, Нальчикский, Нарочь, Нарт-1, Нарымка, Наука, <u>Наяда</u>, <u>Невский</u>, Незабудка, Нестеровский, Никулинский, Одиссей, Октябренок, Олимп, <u>Оредежский</u>, <u>Очарование</u>, <u>Памяти Осиповой</u>, Парус, <u>Петербургский</u>, Победа, Погарский, Престиж, При12 (Приморский), Прибрежный, Пригожий 2, Приекульский ранний, Призер, Приобский, Пролисок, Рамзай, Рапсодия, Рассвет, Резерв, Ресурс, <u>Рождественский</u>, Ромашка, Росинка, Россиянка, Румянка, Русалка, Русич, <u>Русская красавица</u>, Рябинушка, Самбо, Сапрыкинский, Саровский, Свенский, Светлячок, Северянин, Сентябрь, Синева, Синтез, <u>Сиреневый туман</u>, <u>Сказка</u>, Скарб, Скороплодный, Смена, <u>Снегирь</u>, Сокольский, Солнышко, Старт, <u>Столовый 19</u>, <u>Суйдинский ранний</u>, Танго, Темп, Теща, Томич, Удача, Украинский розовый, Успех, Утеноч, Фаленский, Фермер, Филатовский, Фиолетовый, Фокинский, Хибинский ранний, <u>Холмогорский</u>, Чайка, <u>Чародей</u>, <u>Чароит</u>, Чая, Шаман, Шурминский 2, Энергия, Эффект, Юбилей Жукова, Юбилейный Осетии, Юпитер, Явар</p>	0 0 0 0 0

*Примечание.* Подчеркнуты названия сортов селекции ЛенНИИСХ «Белогорка» и/или ООО Селекционная фирма «ЛиГа». «+» – маркер выявлен, «0» – маркер не выявлен.

Продукты ПЦР с праймерами Rpi-sto1 и blb1F/R 5 сортов (Аврора, Балтийский, Евразия, Огниво, Сударыня) и 3 селекционных клонов (1101/10, 1604/16, 3602/28), а также устойчивого к фитофторозу контрольного образца *S. stoloniferum* PI 205522 (Levy et al., 2017) были секвенированы. В качестве референсных были использованы полные последовательности гена *RB/Rpi-blb1* дикого вида *S. bulbocastanum* (AY426259, van der Vossen et al., 2003) и гена *Rpi-sto1* дикого вида *S. stoloniferum* (EU884421, Vleeshouwers et al., 2008) (рис. 5). Все секвенированные последовательности фрагментов, амплифицированных праймерами Rpi-sto1, у изученных образцов и у



контрольного устойчивого образца *S. stoloniferum*, оказались одинаковыми. При этом они отличались от референсных последовательностей EU884421 *S. stoloniferum* и AY426259.1 *S. bulbocastanum* несколькими однонуклеотидными заменами, большинство из которых произошли в интроне (рис. 5). Одна замена (С на Т, позиция 315) была выявлена в области первого экзона, данная замена была синонимичной: она приводила к образованию другого кодона для аминокислоты валин (GTC → GTT).

Амплификационные продукты праймеров blb1F/R были идентичны соответствующему участку обоих референсных генов. Таким образом, последовательности амплифицированных фрагментов Rpi-sto1 и blb1 у отобранных сортов и селекционных клонов картофеля соответствовали участкам генов *Rpi-sto1* и *RB/Rpi-blb1*, контролирующим устойчивость к широкому спектру рас фитофторы. Можно предположить, что отобранные генотипы (сорта Аврора, Балтийский, Евразия, Огниво, Сударыня и селекционные клоны 1101/10, 1604/16, 3602/28) также обладают функционально активной копией данного гена, что требует дальнейшего изучения.

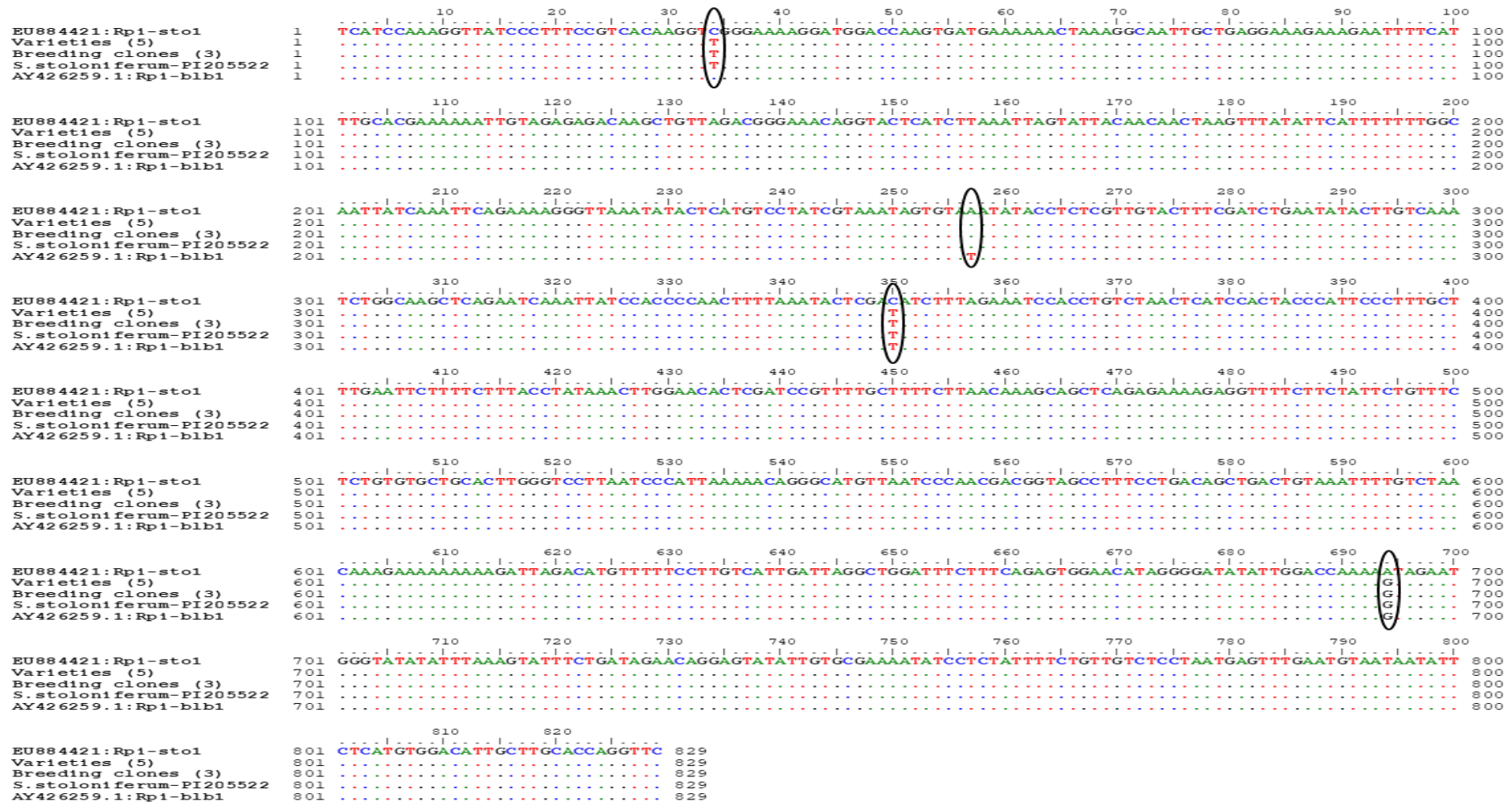


Рисунок 5. Последовательности ампликонов маркера Rpi-sto1 восьми генотипов, выровненные относительно референсных последовательностей AY426259.1 and EU884421. Сорты (5): Аврора, Балтийский, Евразия, Огниво, Сударыня; селекционные гибриды (3): 1101/10, 1604/16, 3602/28. Обведены позиции с однонуклеотидным полиморфизмом (SNP).

### **3. Генотипирование отечественных сортов картофеля с использованием монолокусных хромосомспецифичных SSR-маркеров**

Сопоставление полученных в MAS данных с опубликованными результатами фенотипической оценки устойчивости растений, а также с результатами молекулярного скрининга, выполненного другими исследователями, выявило отдельные различия. Поэтому мы провели сравнение образцов одноименных сортов, полученных из разных источников (оригинаторы, коллекция ВИР) методом микросателлитного анализа.

Для оценки чистоты/идентичности сортового материала, генотипирования и изучения генетического разнообразия коллекций сортов широко используются ядерные SSR маркеры (Côté et al., 2013; Karaagac et al., 2014; Liao, Guo, 2014; Антонова и др., 2016; Salimi et al., 2016). В нашей работе для проверки идентичности сортов привлекались монолокусные хромосомспецифичные SSR маркеры. 6 SSR маркеров (STG0016, Sti001, Sti004, Sti032, Sti033, STM5114) входят в стандартный набор PGI (potato genetic identification kit), разработанный Ghislain et al. (2009). Эти маркеры ранее уже были успешно апробированы для генотипирования 118 сортов российской селекции и 67 сортов селекции стран ближнего зарубежья в отделе биотехнологии ВИР (Швачко, 2014).

В настоящем исследовании была проведена оценка полиморфизма дополнительных четырех SSR локусов (Sti 012, Sti 046, STM 1106, STM 5121) у 113 отечественных сортов картофеля (табл. 6). Уровень полиморфизма данных локусов варьировал от 0,602 (локус STM5121) до 0,837 (локус Sti046) (табл. 6). Маркер Sti046 (для которого были получены наибольшие значения PIC) дополнил список из 6 SSR маркеров, используемых нами для оценки идентичности сортов и создания молекулярных паспортов.

Таблица 6. Полиморфизм четырех SSR локусов у 113 сортов картофеля отечественной селекции

№ п/п	Локус	Мотив	Число аллелей	Размеры фрагментов (min-max)	PIC	Число редких аллелей	Число уникальных аллелей	Ожидаемая гетерозиготность	Частота SSR локусов в состоянии	
									симплекса	гетерозиготности (D+T+K)
1	Sti 012	(ATT) <sub>n</sub>	7	167-191	0,793	0	0	0,857	0,117	0,883
2	Sti 046	(GAT) <sub>n</sub>	<b>10</b>	179-206	<b>0,837</b>	1	0	0,900	0,000	1,000
3	STM 1106	(ATT) <sub>13</sub>	8	139-187	0,653	1	2	0,875	0,642	0,358
4	STM 5121	(TGT) <sub>5</sub>	4	280-289	0,602	1	0	0,750	0,385	0,615
	Итого		29			3	2			

*Примечание.* PIC (polymorphic information content) – индекс полиморфизма микросателлитного локуса в рамках изученной выборки.

Параллельно с молекулярной паспортизацией оформлялись номенклатурные стандарты сортов картофеля, что позволяет оценить идентичность одноименных сортов из разных источников и избежать возможных ошибок в документировании растительного материала. В соответствии с Международным кодексом номенклатуры культурных растений – ICNCP (2016) – номенклатурными стандартами предпочтительно являются гербарные образцы, неразрывно связанные с названием сорта, сохраняемые в научном гербарии. Номенклатурные стандарты 24 российских сортов были оформлены в соответствии с ICNCP (2016) совместно с сотрудниками Отдела агроботаники и *in situ* сохранения генетических ресурсов растений ВИР (к.б.н. И.Г. Чухиной и к.б.н. Л.Ю. Шипиловой) и авторами этих сортов: д.б.н. В.А. Лебедевой, к.б.н. З.З. Евдокимовой, к.б.н. Н.М. Гаджиевым (ЛенНИИСХ «Белогорка» и селекционная фирма «Лига»). Параллельно нами были разработаны молекулярные паспорта этих сортов, пример такого номенклатурного стандарта приведен на рисунке 6.

## Образец, сохраняемый в гербарии WIR



Молекулярно-генетический паспорт сорта  
(разработан в отделе биотехнологии ВИР)

Сорт: **ЧАРОИТ**

Материал для паспортизации получен в ООО Селекционная фирма «Лига», РФ

Состав микросателлитных локусов:

№	SSR локус	Аллели
1	STG 0016	133; 136; 154
2	Sti 001	179
3	Sti 004	76; 79; 94
4	Sti 032	108, 123, 126
5	Sti 033	112, 118, 130
6	Sti 046	194, 197, 200, 203
7	STM 2005	153, 165
8	STM 5114	286; 295

Маркеры генов устойчивости к патогенам:

Номер п/п	R-ген	Маркер	Наличие маркерного фрагмента
<i>Globodera rostochiensis</i> (патотип Ro 1)			
1	H1	57R <sub>450</sub>	-
2		N146 <sub>506</sub>	-
3		N195 <sub>337</sub>	-
4	Gro 1-4	Gro1-4 <sub>602</sub>	-
<i>Globodera pallida</i> (патотипы Pa2/Pa3)			
5	Gpa2	Gpa2-2 <sub>52</sub>	+
Y вирус картофеля (PVY)			
6	Ry <sub>sto</sub>	YES3-3A <sub>341</sub>	-
7		GP122-406/EcoRV <sub>406</sub>	-
8	Ry <sub>adg</sub>	RYSC3 <sub>321</sub>	-
9	Ry <sub>chc</sub>	Ry364 <sub>298</sub>	-
X вирус картофеля (PVX)			
10	Rx1	1Rx1 <sub>374</sub>	+
11		5Rx1 <sub>186</sub>	+

Рисунок 6. Номенклатурный стандарт и молекулярно-генетический паспорт сорта Чароит.

Сопоставление ДНК спектров растений одноименных сортов из полевой коллекции ВИР и от оригинаторов позволило прояснить отдельные несоответствия полученных нами результатов с литературными данными. Так например, у растений сорта Чароит, полученного непосредственно от авторов этого сорта и у растений этого сорта из коллекции ВИР (образец k-25221) не выявлен ни один из маркеров генов *H1* и *Gro1-4* (рис. 7), о которых ранее сообщалось в работе О.А. Кузьминовой с коллегами (2015). SSR спектры растений сорта Чароит от оригинаторов и образца k-25221 из коллекции ВИР полностью совпадали. Аналогично у растений сорта Гусар, полученных непосредственно от авторов этого сорта, и растений этого сорта из коллекции ВИР не выявлен маркер Rpi-sto1<sub>890</sub>, о котором для сорта Гусар сообщали Е.П. Шанина с соавторами (2018). У растений восприимчивого к ЗКН сорта Ломоносовский, полученных непосредственно от автора,

отсутствует маркер 57R гена *H1*, о котором ранее сообщали Антонова и др. (2016).

Растения поражаемых ЗКН сортов Сапрыкинский, Олимп, Румянка, Гарант (см. табл. 2), у которых были выявлены маркеры *R* генов нематодоустойчивости, запрашиваются у оригинаторов для проверки идентичности с использованием методов ДНК маркирования.

#### **4. Молекулярный скрининг отечественных сортов картофеля с помощью ДНК маркеров разных типов цитоплазм**

Информация представлена в статье, находящейся на рецензировании

## ВЫВОДЫ

1. Дана характеристика генофонду отечественных сортов картофеля по ДНК-маркерам *R* генов устойчивости. Молекулярный скрининг 207 отечественных сортов с использованием ДНК маркеров *R* генов устойчивости к цистообразующим нематодам выявил:

-23 % сортов с маркерами гена *H1* устойчивости к *Globodera rostochiensis* (патотипам Ro1 и Ro4) и 1,4 % сортов с маркерами гена *Gro1-4* устойчивости к патотипу Ro1 *G. rostochiensis*,

-10 % сортов с маркерами гена *Gpa-2* устойчивости к *Globodera pallida* (патотипам Pa2 и Pa3), а также

- 2,4% сортов с двумя генами (*H1* и *Gpa-2*) устойчивости к обоим видам нематод,

что свидетельствует о низком уровне защищенности отечественного генофонда к объектам внутреннего и внешнего карантина.

В то же время, среди сортов, созданных в последнее десятилетие, частота функциональных маркеров генов *H1* и *Gpa-2* возросла в ~три раза.

2. Молекулярный скрининг 205 отечественных сортов с использованием ДНК маркеров генов *Ry-f<sub>sto</sub>* и *Ry<sub>sto</sub>* экстремальной устойчивости к наиболее вредоносному вирусу картофеля PVY, интрогрессированных от мексиканского вида *S. stoloniferum*, выявил 12 сортов с маркерами этих генов, которые у всех сортов всегда выявлялись одновременно. Все сорта с маркерами генов *Ry<sub>sto</sub>* и *Ry-f<sub>sto</sub>* имели W/gamma-тип цитоплазмы и характеризовались тетрадной мужской стерильностью.

3. Среди отечественных сортов картофеля методами молекулярного скрининга и прямого секвенирования выявлены 5 сортов, обладающих последовательностями, гомологичными участкам генов *RB/Rpi-blb1=Rpi-sto1*, контролирующей устойчивость к широкому спектру рас возбудителя фитофтороза. Структурный анализ этих локусов выявил их гомологию с последовательностями функциональных аллелей генов *RB/Rpi-blb1* и *Rpi-sto1*

(AY426259 и EU884421) диких мексиканских видов *S. stoloniferum* и *S. bulbocastanum*, представленных в GeneBank.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### В журналах ВАК:

1. Антонова О.Ю., Швачко Н.А., Новикова Л.Ю., Шувалов О.Ю., Костина Л.И., **Клименко Н.С.**, Шувалова А.Р., Гавриленко Т.А. Генетическое разнообразие сортов картофеля российской селекции и стран ближнего зарубежья по данным полиморфизма SSR-локусов и маркеров R-генов устойчивости // Вавиловский Журнал Генетики и Селекции. 2016. Т. 20. № 5. С. 596-606.
2. **Клименко Н.С.**, Антонова О.Ю., Костина Л.И., Мамадбокирова Ф.Т., Гавриленко Т.А. Маркер-опосредованная селекция отечественных сортов картофеля с маркерами генов устойчивости к золотистой картофельной нематоде (патотип Ro1) // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2017. Т. 178. № 4. С. 48-57.
3. Гавриленко Т.А., **Клименко Н.С.**, Антонова О.Ю., Лебедева В.А., Евдокимова З.З., Гаджиев Н.М., Апаликова О.В., Алпатьева Н.В., Костина Л.И., Зотеева Н.М., Мамадбокирова Ф.Т., Егорова К.В. Молекулярный скрининг сортов и гибридов картофеля Северо-Западной зоны Российской Федерации // Вавиловский Журнал Генетики и Селекции. – 2018. Т. 22. № 1. С. 35-45.
4. Antonova O.Y., **Klimenko N.S.**, Evdokimova Z.Z., Kostina L.I., Gavrilenko T.A. Finding *RB/Rpiblb1/Rpi-sto1*-like sequences in conventionally bred potato varieties // Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii=Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018. V. 22. № 6. P. 693-702.

### В других изданиях:

1. **Клименко Н.С.**, Гавриленко Т.А., Костина Л.И., Мамадбокирова Ф.Т., Антонова О.Ю. Поиск источников устойчивости к *Globodera pallida* и к PVX в коллекции отечественных сортов картофеля с использованием молекулярных маркеров // Биотехнология и селекция растений. 2019. Т. 2. № 1. С. 42-48.

## СПИСОК НАУЧНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ, НА КОТОРЫХ ДОКЛАДЫВАЛИСЬ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Антонова О.Ю., Швачко Н.А., Шувалов О.Ю., Новикова Л.Ю., Костина Л.И., **Клименко Н.С.**, Гавриленко Т.А. Исследование генетического разнообразия селекционных сортов картофеля // Международная научная конференция «Проблемы систематики и селекции» (3-5 августа 2016 г., Санкт-Петербург). – Санкт-Петербург, 2016. – С. 24-25.
2. **Клименко Н.С.**, Антонова О.Ю., Гавриленко Т.А., Гаджиев Н.М., Лебедева В.А., Евдокимова З.З. Результаты маркер-вспомогательной



селекции сортов картофеля селекции Северо-Запада РФ // Научно-практическая конференция «Проблемы развития земледелия в Нечерноземье» (9 ноября 2016 г., Пушкин). – Санкт-Петербург, 2016. – С. 79-80.

3. Gavrilenko T., Antonova O., Kostina L., **Klimenko N.**, Shuvalov O., Apalikova O., Karabitsina Y., Ukhatova Y. Genetic diversity of potato varieties bred in Russia and near-abroad countries // 20th EAPR Triennial Conference (9-14 июля 2017 г., Версаль, Франция). – Versailles, 2017. – P. 253.

4. Zoteyeva N., Antonova O., **Klimenko N.**, Karabitsina Y., Ukhatova Y., Apalikova O., Gavrilenko T. Developing of pre-breeding material with combination of major *R*-genes for pathogen resistance // 20th EAPR Triennial Conference (9-14 июля 2017 г., Версаль, Франция). – Versailles, 2017. – P. 67.

5. Antonova O., **Klimenko N.**, Egorova K., Shuvalova A., Shuvalov O., Krylova E., Mamadboqirova F., Gavrilenko T. Use of mas for screening germplasm from VIR potato collection // 20th EAPR Triennial Conference (9-14 июля 2017 г., Версаль, Франция). – Versailles, 2017. – P. 274.

6. **Клименко Н.С.**, Антонова О.Ю., Лебедева В.А., Евдокимова З.З., Гаджиев Н.М., Апаликова О.В., Мамадбокирова Ф.Т., Костина Л.И., Гавриленко Т.А. Молекулярный скрининг сортов и гибридов картофеля селекции Северо-Запада РФ // IV Вавиловская международная конференция «Идеи Н. И. Вавилова в современном мире» (20-24 ноября 2017 г., Санкт-Петербург). – Санкт-Петербург, 2017. – С. 186-187.

7. Алпатьева Н.В., Антонова О.Ю., Егорова К.В., **Клименко Н.С.**, Анисимова И.Н., Гавриленко Т.А. Полиморфизм локусов митохондриальной ДНК у образцов картофеля с разными типами цитоплазм // IV Вавиловская международная конференция «Идеи Н. И. Вавилова в современном мире» (20-24 ноября 2017 г., Санкт-Петербург). – Санкт-Петербург, 2017. – С. 170.

8. Gavrilenko T., Antonova O., **Klimenko N.**, Kostina L., Alpatieva N., Egorova K., Mamadbokirova F. Marker-assisted selection of Russian potato varieties and breeding clones // 10th World Potato Congress and the XXVIII Latin American Potato Association Congress (27-31 мая 2018 г., Куско, Перу). – Cusco, Perú, 2018. – P. 123-124.

9. Gavrilenko T., Ukhatova Y., Shvachko N., Antonova O., Volkova N., **Klimenko N.** Potato cryocollection at VIR // 10th World Potato Congress and the XXVIII Latin American Potato Association Congress (27-31 мая 2018 г., Куско, Перу). – Cusco, Perú, 2018. – P. 158.

10. **Клименко Н.С.**, Антонова О.Ю., Евдокимова З.З., Костина Л.И., Гавриленко Т.А. Скрининг сортов и гибридов картофеля отечественной селекции с использованием молекулярных маркеров генов *RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1* // Научная конференция «Теоретические основы и прикладные исследования в селекции и семеноводстве картофеля» (1–5 августа 2018 года, Новосибирск). – Новосибирск, 2018. – С. 20.

11. Антонова О.Ю., Алпатьева Н.В., Егорова К.В., **Клименко Н.С.**, Карабицына Ю.И., Гавриленко Т.А. Полиморфизм локусов

митохондриальной ДНК у образцов картофеля, отличающихся по признаку мужской фертильности/стерильности и обладающих разными типами цитоплазм // Научная конференция «Теоретические основы и прикладные исследования в селекции и семеноводстве картофеля» (1–5 августа 2018 года, Новосибирск). – Новосибирск, 2018. – С. 6.