

**КЛИМЕНКО НАТАЛЬЯ СТАНИСЛАВОВНА**

**Генетическое разнообразие сортов картофеля отечественной селекции, изученное с использованием различных типов ДНК-маркеров**

Специальность: 03.02.07 – «Генетика»

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2022

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР)

**Научный  
руководитель:**

**Гавриленко Татьяна Андреевна**  
доктор биологических наук,  
главный научный сотрудник отдела биотехнологии  
Всероссийского института генетических ресурсов растений  
имени Н.И. Вавилова, г. Санкт-Петербург

**Официальные  
оппоненты:**

**Проворов Николай Александрович**  
доктор биологических наук, профессор,  
директор Федерального государственного бюджетного  
научного учреждения «Всероссийский научно-  
исследовательский институт сельскохозяйственной  
микробиологии», г. Санкт-Петербург

**Баранова Ольга Александровна**  
кандидат биологических наук,  
ведущий научный сотрудник лаборатории иммунитета  
растений к болезням Федеральное государственное  
бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-  
исследовательский институт защиты растений», г. Санкт-  
Петербург

**Ведущая  
организация:**

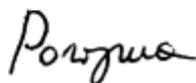
Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский  
государственный университет», Биологический факультет,  
кафедра генетики и биотехнологии, г. Санкт-Петербург

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 года в \_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 006.041.02, созданного на базе ФИЦ «Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР), по адресу: 190031, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 44, телефон: 8(812) 312-51-61; факс: 8(812) 570-47-70.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова и на сайте института: [www.vir.nw.ru](http://www.vir.nw.ru).

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук



Рогозина Елена Вячеславовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** В настоящее время возделываемый картофель (*Solanum tuberosum* L.) по объемам производства находится на шестом месте в мире среди всех сельскохозяйственных культур и на лидирующих позициях среди незерновых культур (FAO. World Food and Agriculture: Statistical Yearbook 2021). Россия занимает четвертое место в мире по объемам производства и посевным площадям картофеля ([www.fao.org/faostat](http://www.fao.org/faostat)). В «Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию» в РФ (Госреестре сортов РФ) в 2021 году, числятся 490 селекционных сортов картофеля, включая 297 (60,6 %), выведенных в России и странах ближнего зарубежья.

В коллекции ВИР им. Н.И. Вавилова сохраняется более 8000 образцов картофеля, включая образцы диких и культурных видов из Южной, Центральной и Северной Америки, а также более 2200 селекционных сортов (*S. tuberosum*), выведенных селекционерами разных стран (Киру и др., 2007, 2015). Более 400 селекционных сортов картофеля в коллекции института – российской селекции и селекции стран ближнего зарубежья, из них около 200 сортов включены в актуальный Госреестр сортов РФ.

В настоящее время ведущие селекционные центры, генбанки и исследовательские лаборатории широко используют методы ДНК-маркирования, позволяющие изучать генетическое разнообразие сортового генофонда, проводить генотипирование, а также повышать эффективность отбора генотипов с функциональными аллелями генов, контролирующими селекционно ценные признаки, включая устойчивость к различным заболеваниям и вредителям, например, к фитофторозу (Śliwka et al., 2010; Бекетова, Хавкин, 2006; Tiwari et al., 2013; Рогозина и др., 2014; Ramakrishnan et al., 2015; Li et al., 2017; Milczarek et al., 2017; Рогозина, Хавкин, 2017; Stefańczyk et al., 2020 и др.), вирусам картофеля (Kasai et al., 2000; Valkonen et al., 2008; Гавриленко и др., 2009; Mori et al., 2012; Tiwari et al., 2012; Valkonen et al., 2017; Slater et al., 2020; Ahmadvand et al., 2021 и др.), цистообразующим картофельным нематодам (Бирюкова и др., 2008; Milczarek et al., 2011; Asano et al., 2012; Dalamu et al., 2012; Mori et al., 2012; Schultz et al., 2012; Антонова и др., 2016; Sudha et al. 2019; Asano et al., 2021, Gartner et al., 2021 и др.).

Сопоставление результатов молекулярного скрининга с данными фенотипизации позволяет оценить диагностическую эффективность ДНК-маркеров, ассоциированных с генами, контролирующими устойчивость к вредным организмам. Скрининг сортов с использованием таких маркеров помогает оценить защищенность и уязвимость генофонда сортов. Особое значение такой подход имеет в изучении устойчивости растений к карантинным объектам из-за ограничений в использовании традиционных фитопатологических методов скрининга (Хютти и др., 2017).

Лимитирующим фактором при проведении скрещиваний и дальнейших селекционно генетических исследований картофеля может быть мужская стерильность родительских форм, включая цитоплазматическую мужскую стерильность (Grun et al., 1977; Ross, 1986; Song, Schwarzfischer, 2008; Lössl et al., 2000; Hosaka, Sanetomo, 2012; Sanetomo, Gebhardt, 2015; Анисимова, Гавриленко, 2017). При подборе пар для гибридизации полезна информация о типах цитоплазм, ассоциированных с проявлением мужской стерильности, которые можно определить с использованием наборов ДНК-маркеров, специфичных к разным локусам органельных геномов (Lössl et al., 2000; Hosaka, Sanetomo, 2012).

При работе с коллекциями сортов картофеля молекулярно-генетические методы, в частности SSR-анализ (анализ полиморфизма микросателлитных локусов), являются эффективным инструментом изучения генетического разнообразия, сохраняемого в коллекциях селекционных и местных сортов, их генотипирования и паспортизации,

установления идентичности образцов (Spooner et al., 2007; Gavrilenko et al., 2010; Ivanova-Pozdejeva et al., 2022 и др.). Использование методов ДНК-генотипирования особенно важно для *in vitro* и крио-коллекций, когда идентификация сортов по морфологическим характеристикам невозможна. Разработка молекулярно-генетических паспортов с использованием растительного материала номенклатурных стандартов сортов позволяет в дальнейшем верифицировать образцы сорта, полученные из различных источников (Гавриленко, Чухина, 2020).

Несмотря на возрастающую популярность молекулярно-генетических методов, в большинстве работ изучались сравнительно небольшие выборки отечественных сортов с ограниченным набором ДНК-маркеров. Расширение изучаемых выборок и используемого набора маркеров позволит полнее представить полиморфизм, генетическую структуру и селекционный потенциал отечественных сортов картофеля.

**Цель** настоящей работы состояла в изучении генетического разнообразия сортов картофеля отечественной селекции с использованием методов ДНК-маркирования.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. На основе коллекции картофеля ВИР сформировать экспериментальную выборку образцов отечественных сортов, созданных в разные периоды в различных селекционных центрах.

2. С использованием маркеров разных локусов пластидной и митохондриальной ДНК проанализировать генетическое разнообразие сортов картофеля отечественной селекции по типам цитоплазм.

3. Оценить защищенность отечественных сортов картофеля по отношению к патотипу Ro1 золотистой цистообразующей картофельной нематоды *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens – объекту внутреннего карантина.

4. Изучить перспективы использования в молекулярном скрининге маркеров, ассоциированных с генами/QTLs, контролирующими устойчивость к патотипу Pa3 бледной цистообразующей картофельной нематоды *Globodera pallida* (Wollenweber) Behrens – объекту внешнего карантина.

5. Провести молекулярный скрининг отечественных сортов картофеля с маркерами ряда генов, контролирующих устойчивость к *Phytophthora infestans* (Montagne) de Bary и к вирусу Y картофеля, интрогрессированных в селекционные сорта от диких мексиканских видов вторичного генпула – *Solanum demissum* Lindl. и *Solanum stoloniferum* Schltl.; оценить перспективы вовлечения отобранных сортов в дальнейшие скрещивания.

6. Создать номенклатурные стандарты и генетические паспорта российских сортов картофеля, выведенных селекционерами Ленинградского НИИСХ «Белогорка».

**Научная новизна и практическая значимость.** Получены данные о генетическом разнообразии обширной выборки сортов картофеля отечественной селекции с использованием различных типов ДНК-маркеров (SCAR, STS, CAPS, SSR):

– впервые определены типы цитоплазм отечественных сортов картофеля с использованием маркеров митохондриальной и пластидной ДНК из набора К. Хосака, Р. Санетомо (Hosaka, Sanetomo, 2012);

– впервые обнаружены селекционные сорта, выведенные традиционными методами, с внутригенными маркерами доминантных аллелей генов *RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1*, вовлеченных в контроль устойчивости к широкому спектру рас *P. infestans*;

– впервые проведен молекулярный скрининг отечественных сортов с комплексом маркеров генов/QTLs устойчивости к патотипу Pa3 *G. pallida* и выявлен перспективный гаплотип для молекулярного скрининга на устойчивость к бледной картофельной нематоде.

Информация о наличии у отечественных сортов W/γ-типа цитоплазмы, обуславливающего тетрадную стерильность пыльцы, получена впервые. Эти данные позволят селекционерам выбирать эффективные направления скрещиваний, используя данные сорта как материнские формы. Выявлены сорта картофеля с D-типом цитоплазмы, характеризующиеся мужской фертильностью, которые могут использоваться в скрещиваниях в качестве опылителя.

Выявленные генотипы с маркерами генов, контролирующими устойчивость к цистообразующим нематодам, вирусу Y картофеля, фитофторозу, перспективны для использования в селекционном процессе.

Молекулярно-генетические паспорта, разработанные с использованием ДНК-препаратов, полученных из растительного материала номенклатурных стандартов, могут служить в качестве эталонных образцов для проверки идентичности и однородности образцов одного и того же сорта.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. С использованием набора маркеров митохондриальной и пластидной ДНК выявлен низкий уровень генетического разнообразия отечественных сортов картофеля по типам цитоплазм.
2. На основании результатов молекулярного скрининга с маркерами генов *H1* и *Gro1-4*, контролирующими устойчивость к патотипу Ro1 *Globodera rostochiensis*, выявлен низкий уровень защищенности отечественных сортов картофеля по отношению к золотистой картофельной нематоде.
3. Продемонстрирована положительная динамика в изменении частоты сортов с генетическим материалом, интрогрессированным от мексиканских диких видов вторичного генпула, при сравнении сортов, выведенных в последнее десятилетие, с сортами селекции второй половины 20 века.
4. Оформление номенклатурных стандартов и разработка генетических паспортов сортов картофеля позволяет использовать их для контроля генетической идентичности и однородности образцов одного и того же сорта, полученных из разных источников.

**Апробация результатов работы.** Результаты диссертационной работы были представлены на 20th EAPR Triennial Conference (2017, Версаль, Франция), IV Вавиловской международной конференции «Идеи Н. И. Вавилова в современном мире» (2017, Санкт-Петербург, Россия), 10th World Potato Congress and the XXVIII Latin American Potato Association Congress (2018, Куско, Перу), научной конференции «Теоретические основы и прикладные исследования в селекции и семеноводстве картофеля» (2018, Новосибирск, Россия), 19th Joint Meeting of EAPR Section 'Breeding & Varietal Assessment' and EUCARPIA Section 'Potatoes' (2018, Росток-Варнемюнде, Германия), международной научно-практической конференции «Состояние, проблемы и перспективы картофелеводства XXI века (90 лет научному картофелеводству Беларуси)» (2018, Самохваловичи, Республика Беларусь), международной конференции «125 лет прикладной ботаники в России» (2019, Санкт-Петербург, Россия).

**Публикации результатов исследований.** Результаты диссертационной работы опубликованы в 10 научных статьях, из них 6 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ и 7 – в журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus.

**Личный вклад автора.** Результаты, включенные в диссертацию, получены лично соискателем или при его непосредственном участии в совместных исследованиях с сотрудниками отдела биотехнологии, отдела генетических ресурсов картофеля, отдела агроботаники и *in situ* сохранения генетических ресурсов растений «Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» и с сотрудниками «Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений», а также с

сотрудниками Ленинградского НИИСХ «Белогорка». Обсуждение и интерпретация полученных результатов осуществлялись автором совместно с научным руководителем.

**Государственные контракты и гранты.** Данная работа была поддержана грантом РФФИ № 16-16-04-125 «Теоретические и прикладные аспекты цитоплазматической мужской стерильности у картофеля» и КНТП «Развитие селекции и семеноводства картофеля» 2017-2025 (№ 0481-2018-0023).

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 225 страницах. Состоит из введения, основной части, содержащей 47 таблиц и 15 рисунков, заключения, списка литературы (включает 430 наименований, из них 332 – на иностранном языке), приложений.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Материал исследования.** Материалом для исследования послужили 214 сортов, созданных в СССР, РФ и странах СНГ. Материал включал в себя 177 российских сортов (из них 34 были созданы в РСФСР, 143 – в постсоветский период в разных селекционных центрах РФ), 21 белорусский, 12 украинских, два латвийских и по одному сорту селекции Литвы и Молдавии. Подавляющее число сортов (182) были получены из коллекции ВИР от куратора коллекции сортов картофеля д.б.н. Л.И. Костиной. Оставшиеся 32 сорта были получены из различных источников; 118 (или 55 %) сортов выборки входят в Госреестре сортов РФ в 2021 году.

**Методы исследования.** ДНК выделяли из листьев и/или кожуры клубней сортов с использованием модифицированного метода СТАВ-экстракции (Gavrilenko et al., 2013). В работе были использованы: (а) STS-, CAPS-, SSR-маркеры для определения различных типов цитоплазм; (б) 28 SCAR-, STS-, CAPS-маркеров 14 R-генов и QTLs, контролирующей устойчивость к разным вредным организмам; (в) хромосомспецифичные монолокусные SSR-маркеры для генотипирования сортов (таблица 1). Все маркеры были отобраны из литературных источников.

Таблица 1 – ДНК-маркеры, использованные в работе

(а) ДНК-маркеры различных типов цитоплазм (из набора Hosaka, Sanetomo, 2012)					
Локус	Маркер/ Рестриктаза	Праймеры	$T_m$ (°C)	Диагностический фрагмент	Ссылки
<b>Маркеры разных типов пластидной ДНК</b>					
<i>ndhC/trnV</i>	T	H1	60→55	Тип T - 202 п.о.	Hosaka, 2002
<i>rps16/trnQ</i>	S	NTCP6	63→58	Тип P - 127 п.о., остальные типы – 172-175 п.о.	Bryan et al., 1999
<i>cemA</i>	SAC/ BamHI	SAC	60	Типы А, М, Р – нет рестрикции; W и Т - рестрикция	Hosaka, Sanetomo, 2012
<i>rpl32/ccsA</i>	A/BamHI	A	60	Тип А - рестрикция	Hosaka, Sanetomo, 2012
<b>Маркеры разных типов митохондриальной ДНК</b>					
<i>rps 10</i>	ALM4/5	ALM_4/ ALM_5	55	$\alpha$ – 2400 п.о.; $\beta$ – 1600 п.о.; $\gamma$ – нет фрагмента	Lössl et al., 2000
<i>Band1</i>	D (Region 1)	Band1-F11/Band1-R6	60	527 п.о.	Sanetomo, Hosaka, 2012
<b>(б) ДНК-маркеры хромосомспецифичных SSR локусов</b>					
Название маркера у авторов праймеров	Название маркера в наборе PGI	Хромосома	Повторяющийся мотив	$T_m$ (°C)	Авторы-разработчики праймеров
<u>STG0016</u>	<u>STG0016</u>	I	(AGA) <sub>n</sub>	64→60	Ghislain et al., 2009
StI004	STI0004	VI	(AAG) <sub>n</sub>	59→55	Feingold et al., 2005
StI032	STI0032	V	(GGA) <sub>n</sub>	64→60	Feingold et al., 2005
StI033	STI0033	VII	(AGG) <sub>n</sub>	64→60	Feingold et al., 2005
StI046	--	XI	(GAT) <sub>n</sub>	56→52	Feingold et al., 2005
<u>STM0037</u>	<u>STM0037</u>	XI	(TC) <sub>n</sub> (AC) <sub>n</sub> AA... (AC) <sub>n</sub> (AT) <sub>n</sub>	52→48	Milbourne et al., 1998
<u>STM2005</u>	--	XI	(CTGTTG) <sub>n</sub>	64→60	Milbourne et al., 1998
<u>STM5114</u>	<u>STM5114</u>	XI	(ACC) <sub>n</sub>	60→56	Ghislain et al., 2009
StI001	STI0001	IV	(AAT) <sub>n</sub>	59→55	Feingold et al., 2005
StI014	STI0014	IX	(TGG) <sub>n</sub> (AGG) <sub>n</sub>	59→55	Feingold et al., 2005

<b>(в) ДНК-маркеры R-генов, использованные в молекулярном скрининге</b>						
Ген	Хромо-сома	Источники генов, интрогрессированных в сорта	Маркер/ рестриктаза	T <sub>m</sub> (°C)	Диагностический фрагмент (п.о.)	Ссылки
<b>Маркеры гена <i>H1</i>, контролирующего устойчивость к <i>Globodera rostochiensis</i> (патотипы Ro1, Ro4)</b>						
<i>H1</i>	V	adg	<u>57R*</u>	60	450	Finkers-Tomczak et al., 2011; Schultz et al., 2012
<i>H1</i>	V	adg	<u>TG689</u>	55	141	Milczarek et al., 2011
<i>H1</i>	V	adg	N146	55	506	Takeuchi et al., 2008; Mori et al., 2011
<i>H1</i>	V	adg	<u>N195</u>	55	337	
<i>H1</i>	V	adg	239E4left/Alu I	51	120 + 230	Bakker et al., 2004
<b>Маркеры гена <i>Gro1-4</i>, контролирующего устойчивость к <i>Globodera rostochiensis</i> (патотип Ro1)</b>						
<i>Gro1-4</i>	VII	spg	Gro1-4	58	602	Gebhardt et al., 2006
<i>Gro1-4</i>	VII	spg	<u>Gro1-4-1*</u>	60	602	Asano et al., 2012
<b>Маркеры гена <i>Gpa2</i>, контролирующего устойчивость к <i>Globodera pallida</i> (патотипы Pa2, Pa3)</b>						
<i>Gpa2</i>	XII	adg	Gpa2-1*	60	1120	Asano et al., 2012
<i>Gpa2</i>	XII	adg	Gpa2-2*	60	452	Asano et al., 2012
<i>Gpa2</i>	XII	adg	GP34/TaqI	62	-	Roupe van der Voort et al., 1997; Bendahmane et al., 1997
<i>Gpa2</i>	XII	adg	77R/HaeIII	57	-	Roupe van der Voort et al., 1999
<i>GpaV<sup>spl</sup>-QTL</i>	V	spl	GP179/ EcoRV	55	-	Caromel et al., 2005; Meksem et al., 1995
<i>Gpa5-QTL</i>	V	vrn	HC	65→60	276	Sattarzadeh et al., 2006
<i>Gpa5-QTL</i>	V	vrn	HC-I/ HindIII	56	250	Asano et al., 2021
<i>GpaIV<sup>adg</sup>-QTL</i>	IV	adg	C237-I	55	138	Asano et al., 2021
<b>Маркеры ассоциированные с устойчивостью к цистообразующим картофельным нематодам – <i>Globodera rostochiensis</i> (патотип Ro5) и <i>Globodera pallida</i> (патотипы Pa2, Pa3)</b>						
<i>Grp1-QTL</i>	V	vrn, opl, adg, tbr	TG432/ RsaI	66	1900	Finkers-Tomczak et al., 2009
<i>Grp1-QTL/ Gpa5-QTL</i>	V	vrn, opl, adg, tbr/ vrn	GP21/ DraI	55	-	Roupe van der Voort et al., 1998; Meksem et al., 1995
<i>Grp1-QTL/ Gpa5-QTL</i>	V	vrn, opl, adg, tbr/ vrn	GP179/ RsaI	55	-	Roupe van der Voort et al., 1998; Meksem et al., 1995; Roupe van der Voort et al., 2000
<b>Маркеры генов, контролирующих устойчивость к Y вирус картофеля – PVY</b>						
<i>Ry<sub>sto</sub></i>	XII	sto	<u>YES3-3A</u>	55	341	Song, Schwarzfischer, 2008
<i>Ry<sub>sto</sub></i>	XII	sto	STM0003	50	111	Milbourne et al., 1998; Song et al., 2005
<i>Ry-f<sub>sto</sub></i>	XII	sto	GP122-406/ EcoRV	52	406	Flis et al., 2005; Valkonen et al., 2008
<b>Маркеры генов, контролирующих расоспецифическую устойчивость к <i>Phytophthora infestans</i></b>						
<i>R1</i>	V	dms	R1	65→58	1400	Ballvora et al., 2002; Mori et al., 2011
<i>R3a</i>	XI	dms	RT-R3a	65→58	982	Huang et al., 2005
<b>Маркеры генов, контролирующих устойчивость к широкому спектру рас <i>Phytophthora infestans</i></b>						
<i>Rpi-sto1</i>	VIII	sto	Rpi-sto1*	65	890	Zhu et al., 2012
<i>Rpi-blb1</i>	VIII	blb	blb1F/R*	58	821	Wang et al., 2008
<i>Rpi-blb1</i>	VIII	blb	1/1'*	50	213	Colton et al., 2006
<i>Rpi-blb1</i>	VIII	blb	517/1519*	58	651	Wang et al., 2008
<i>RB/Rpi-blb1</i>	VIII	blb	RB-629*	65	629	Pankin et al., 2011
<b>Маркеры генов, контролирующих устойчивость к PVY</b>						
<i>Ry<sub>adg</sub></i>	XI	adg	RYSC3	60	321	Kasai et al., 2000
<i>Ry<sub>chc</sub></i>	IX	chc	<u>Ry364</u>	60→55	298	Takeuchi et al., 2009; Mori et al., 2012
<b>Маркеры генов, контролирующих устойчивость к PVX</b>						
<i>Rx1</i>	XII	adg	5Rx1	62	186	Ahmadvand et al., 2013
<i>Rx2</i>	V	acl	106Rx2	66	543	Ahmadvand et al., 2013

Примечание. Звездочкой (\*) отмечены внутригенные маркеры. T<sub>m</sub> (°C) – температура отжига праймеров. Трехбуквенные сокращения названий видов картофеля: adg — *S. tuberosum* ssp. *andigenum*; acl – *S. acaule*; chc – *S. chacoense*; blb – *S. bulbocastanum*; spg – *S. spgazzinii*; sto – *S. stoloniferum*. Подчеркнуты маркеры, программы ПЦР для которых были оптимизированы в отделе биотехнологии ВИР добавлением функции TOUCHDOWN.

ПЦР проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10 нг тотальной ДНК растений, 1× реакционный буфер («Диалат», Москва), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM каждого из dNTPs, 0,2 мкМ прямого и обратного праймера и 1 ед. Taq-полимеразы («Диалат», Москва). ПЦР для амплификации микросателлитных (SSR) участков проводили в 14 мкл реакционной смеси, содержащей 40 нг тотальной ДНК картофеля, 1× реакционный буфер («Диалат», Москва), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM каждого из dNTPs, 0,25 мкМ прямого SSR праймера с комплементарной праймеру M13 последовательностью на 5'-конце, 0,25 мкМ обратного SSR праймера, 70 нМ меченого красителем (флуоресцентной меткой) IRD-700/800 прямого праймера M13 и 1 ед. Taq-полимеразы («Диалат», Москва).

Все реакции при работе со SCAR-, STS- и SSR-маркерами осуществляли не менее чем в трех повторностях, для CAPS- маркеров – выполняли две повторности. Обработку ПЦР-продуктов рестриктазами при использовании CAPS-маркеров проводили согласно протоколам фирмы-производителя («СибЭнзим», [www.sibenzyme.com](http://www.sibenzyme.com)).

Электрофорез фрагментов амплификации ДНК проводили в горизонтальных 2 % агарозных гелях в буфере TBE с окрашиванием гелей бромистым этидием и последующей визуализацией в УФ-свете (для SCAR-, CAPS- и STS-маркеров); в случае SSR-маркеров – в 6,5 % денатурирующих полиакриламидных гелях на приборе Li-Cor 4300S DNA Analyzer с лазерной детекцией фрагментов.

Корреляцию между наличием маркеров генов и данными фитопатологических анализов устойчивости сортов оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона (Ивантер, Коросов, 2010). Статистический анализ частот сортов с определенными типами маркеров, созданных в разные годы, проводили с использованием точного критерия Фишера ( $p < 0,05$ ) и поправки Бонферрони (Ивантер, Коросов, 2010).

Данные об устойчивости сортов к различным вредным организмам были взяты из «Государственного реестра селекционных достижений...» (2010–2021), каталогов сортов картофеля разных лет (Симаков и др., 2005, 2008, 2009 б, 2010, 2018 а, б; Костина, Королева, 2012; Анисимов и др., 2013; Костина и др., 2016) и из тематических статей (Яшина, 2010; Valkonen et al., 2017; Бирюкова и др., 2019).

Фертильность пыльцы оценивали с помощью ацетокарминового метода (Паушева, 1988) под световым микроскопом (Axio Scope.ZEISS A1, Германия) при увеличении ×200.

Сбор и передачу растительного материала 26 образцов картофеля (21 сорта, трех селекционных клонов и двух предсортов), выведенных селекционерами Ленинградского НИИСХ «Белогорка», оформление номенклатурных стандартов и ваучерных образцов картофеля в Гербарии культурных растений, их диких родичей и сорных растений ВИР (WIR) проводили согласно протоколу, разработанному в ВИР (Гавриленко, Чухина, 2020). Часть переданного растительного материала перед гербаризацией отбирали для выделения ДНК с целью проведения генетической паспортизации с использованием 10 ядерных хромосомспецифичных микросателлитных маркеров и 12 маркеров 11 R-генов, контролирующих устойчивость к вредным организмам.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

### 1. Оценка генетического разнообразия отечественных сортов картофеля по типам цитоплазм

С использованием набора маркеров К. Хосака и Р. Санетомо (Hosaka, Sanetomo, 2012) в выборке из 214 сортов картофеля отечественной селекции были идентифицированы четыре типа цитоплазм: D, T, W/γ, A из восьми (D, A, T, P, M, W/α, W/β, W/γ) известных у селекционных сортов по литературным источникам.

Типы цитоплазм A-, P-, M-, которые по данным литературы типичны для андийских культурных и предковых диких видов, в изученной выборке обнаружены не

были, за исключением одного сорта ‘Катюша’ (украинская селекция), у которого был детектирован А-тип цитоплазмы. Отметим, что носителям А-, Р-, М- типов цитоплазм характерна мужская фертильность (Hosaka, Sanetomo, 2012; Анисимова, Гавриленко и др., 2017).

Преобладающим типом цитоплазмы среди изученных отечественных сортов был D-тип (108 сортов, 50,5 % выборки), который согласно литературным данным был интрогрессирован в сорта от дикого мексиканского вида *S. demissum* (Sanetomo, Hosaka, 2011; Hosaka, Sanetomo, 2012). Результаты анализа доступных нам данных родословных отечественных сортов подтвердили *S. demissum* в качестве источника цитоплазмы D-типа.

Вторым по численности был T-тип цитоплазмы – 84 сорта, или 39 % от числа изученной нами выборки. Данный тип цитоплазмы типичен для чилийских аборигенных сортов (Hosaka, Hanneman, 1988 a; Hosaka, 2004; Sukhotu et al., 2004, 2005; Sukhotu, Hosaka, 2006; Spooner et al., 2007; Hosaka, Sanetomo, 2009; Gavrilenko et al., 2013) и характерен для старых европейских сортов, созданных во второй половине 19 века (Prowan et al., 1999; Ames, Spooner, 2008; Hosaka, Sanetomo, 2012; Sanetomo, Gebhardt, 2015).

У 21 (10 %) сорта изученной выборки был детектирован W/γ-тип. Проведенный нами анализ родословных этих сортов подтвердил литературные данные о том, что W/γ-тип цитоплазмы был интрогрессирован в сорта от дикого мексиканского вида *S. stoloniferum*.

На основании полученных нами результатов о типах цитоплазм сортов мы разделили нашу выборку (N=212) на группы сортов, созданных в разные годы, и провели статистический анализ отличий этих групп. Оказалось, что соотношение T-, D- и W/γ-типов цитоплазм у сортов, созданных в разное время, существенно менялось (рисунок 1).

Мы провели попарное сравнение частот отечественных сортов с различными типами цитоплазм в зависимости от года их создания. Результаты статистического анализа показали достоверное ( $p < 0,05$ ) отличие в частоте встречаемости T-типа цитоплазмы между выборками сортов, созданных до 1970-х годов, и сортов, созданных в 21 веке. При сравнении сортов, выведенных в 21 веке, с сортами, созданными во второй половине 20 века, нами обнаружены статистически достоверные ( $p < 0,05$ ) изменения: увеличение частоты встречаемости сортов с D-типом цитоплазмы с 37,5 % до 61 % и снижение частоты встречаемости сортов с T-типом с 53 % до 28 %.

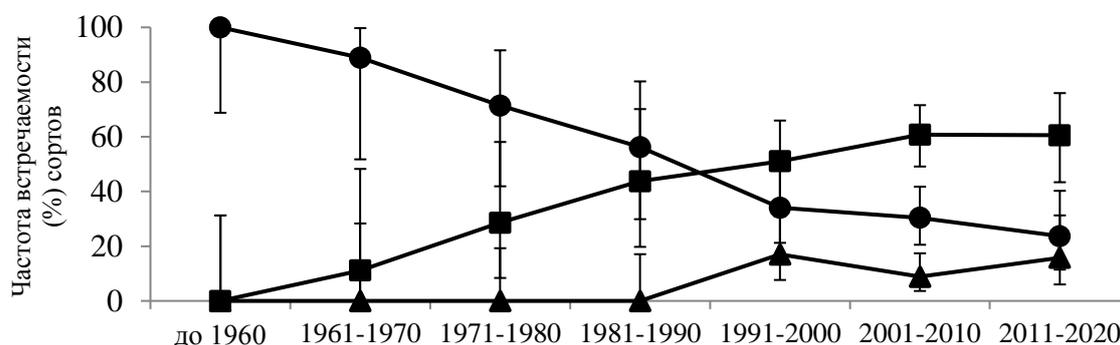


Рисунок 1 – Частота встречаемости сортов с разными типами цитоплазм среди отечественных сортов картофеля, созданных в разные годы.

● – Сорта с цитоплазмой T-типа; ■ – Сорта с цитоплазмой D-типа; ▲ – Сорта с цитоплазмой W/γ-типа.

Из-за односторонней межвидовой несовместимости мексиканские полиплоидные виды вторичного генпула – *S. demissum* и *S. stoloniferum* – используются в межвидовых скрещиваниях с культурным картофелем как материнские формы за редким исключением (Sanetomo et al., 2011; Yermishin et al., 2017; Зотева и др., 2017; Гавриленко и др., 2019; Gavrilenko et al., 2022). Интрогрессивная гибридизация картофеля с этими дикими видами

была обусловлена выявлением источников и доноров-признаков расоспецифической устойчивости к фитофторозу у *S. demissum* и устойчивости к Y вирусу картофеля у *S. stoloniferum* (Ross, 1986; Hawkes, 1994). Активное вовлечение в отечественную селекцию устойчивых к патогенам образцов этих видов происходило в разные периоды – в середине 20 века для *S. demissum* и с 1980-х годов для *S. stoloniferum* (Симаков и др., 2005; Костина, Косарева, 2017). Именно этим мы объясняем полученные результаты по динамике изменений частот сортов с D- и W/γ-типами цитоплазм в разные периоды.

По данным литературы, полученным для выборок иностранных селекционных сортов картофеля, три типа цитоплазм – D, T, W/γ – ассоциированы с мужской стерильностью (Lössl et al., 2000; Hosaka, Sanetomo, 2012; Анисимова, Гавриленко, 2017). Мы провели оценку фертильности пыльцы для 126 сортов отечественной селекции с этими типами цитоплазм. Оказалось, что среди 68 изученных сортов с D-типом цитоплазмы только у трех сортов (4 %) процент окрашенных пыльцевых зерен был низким (1-10%), у 37 (54,4 %) сортов – варьировал от 10,1% до 50% и у 28 (41 %) сортов фертильность пыльцы была выше 50 %. Причем среди них, по данным литературы, были отмечены «эффективные опылители», например, сорта ‘Невский’, ‘Наяда’, ‘Эффект’ (Склярова и др., 2008; Костина, Косарева, 2017; Гавриленко и др., 2018; Бирюкова и др., 2019; Клименко и др., 2020), что указывает на функциональную фертильность их пыльцы.

Среди 44 изученных нами сортов с цитоплазмой T-типа только треть (13 сортов или 30%) имели неокрашенные, морфологически аномальные пыльцевые зерна (например, ‘Брянский ранний’, ‘Зольский’, ‘Прибрежный’, ‘Русалка’, ‘Северянин’); у 20 (45%) сортов фертильность пыльцы варьировала от 5,1 до 50% и у 11 (25 %) сортов с T-типом цитоплазмы фертильность пыльцы была выше 50%. Анализ родословных сортов и литературных данных показал, что среди сортов с T-типом цитоплазмы встречаются «эффективные опылители», то есть сорта, часто используемые в качестве опылителей в селекционном процессе, например, ‘Приекульский ранний’, ‘Смена’ (Склярова и др., 2008; Костина, Косарева, 2017).

У всех 14 сортов с W/γ-типом цитоплазмы, для которых проведена оценка фертильности, была выявлена тетрадная стерильность пыльцы, но степень проявления данного признака варьировала. Например, у сортов ‘Москворецкий’, ‘Накра’, ‘Олимп’, ‘Сокольский’ до 100 % зрелых пыльцевых зерен оставались объединенными в «перманентные тетрады», а у сортов ‘Колобок’, ‘Ресурс’ были выявлены и «перманентные тетрады», и стерильные, неокрашенные монады. Результаты анализа доступных нам родословных отечественных сортов согласуются с литературными данными (полученными ранее для сортов зарубежной селекции) о том, что *S. stoloniferum* являлся источником цитоплазмы W/γ-типа (Hosaka, Sanetomo, 2012).

Таким образом, только один тип цитоплазмы – W/γ, переданный сортам от *S. stoloniferum*, обуславливает мужскую стерильность у всех его носителей. Выявление эффективных опылителей среди отечественных сортов с D-типом цитоплазмы не согласуется с литературными данными о функциональной стерильности японских сортов с этим типом цитоплазмы (Hosaka, Sanetomo, 2012).

## **2. Молекулярный скрининг отечественных сортов картофеля с маркерами генов *H1* и *Gro1-4*, контролирующих устойчивость к объекту внутреннего карантина – патотипу Ro1 *Globodera rostochiensis***

### **2.1. Молекулярный скрининг отечественных сортов картофеля с маркерами гена *H1*, контролирующего устойчивость к патотипу Ro1 *G. rostochiensis***

Источниками устойчивости к объекту внутреннего карантина – патотипу Ro1 *G. rostochiensis* (золотистой цистообразующей картофельной нематодой, ЗКН), контролируемой геном *H1*, послужили нематодоустойчивые образцы культурного вида

*S. tuberosum* ssp. *andigenum* (Ellenby, 1948, 1952, 1954). Для отбора генотипов с функциональной аллелью гена *H1* был разработан ряд маркеров, обладающих по литературным данным различной диагностической эффективностью, которая оценивается по частоте совпадений результатов молекулярного скрининга, проведенного с их участием, и данных фитопатологического анализа. Для оценки эффективности пяти маркеров гена *H1* мы использовали меньшую выборку из 107 сортов картофеля отечественной селекции, среди которых по данным Госреестра сортов РФ и литературы (European Cultivated Potato Database...; Костина, Фомина, 1999; Костина, Королева, 2012; Костина и др., 2016; Симаков и др., 2008, 2010, 2018 б) 28 сортов устойчивы к патотипу Ro1 ЗКН и 79 – восприимчивы по данным фитопатологического анализа (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты молекулярного скрининга 107 сортов отечественной селекции с использованием пяти маркеров гена *H1*

Устойчивость/ восприимчивость (по литературным данным)	Число сортов	Ген <i>H1</i>				
		Маркеры:				
		57R	TG689	N146	N195	239E4left/AluI
Устойчивые (N=28)	N=22	+	+	+	+	0
	N=2	+	+	+	0	0
	N=2	+	+	0	0	0
	N=2	0	0	0	0	0
	Итого устойчивых по данным фитопатологических тестов с маркером (% от числа устойчивых сортов)	26 (93%)	26 (93%)	24 (86%)	22 (79%)	0 (0%)
Восприимчивые (N=79)	N=4	+	+	+	+	0
	N=1	+	+	+	0	0
	N=74	0	0	0	0	0
	Итого восприимчивых по данным фитопатологических тестов без маркера (% от числа восприимчивых сортов)	74 (94%)	74 (94%)	74 (94%)	75 (95%)	79 (100%)

Примечание. «+» – наличие маркера; «0» – отсутствие маркера. «N» – число сортов с определенным гаплотипом.

Среди устойчивых сортов выборки 26 (93%) имели от одного до четырех маркеров гена *H1*. Из числа 79 неустойчивых сортов 74 (94%) не имели маркеров гена *H1*, использованных в настоящей работе. Всего для 100 из 107 сортов выборки (95 %) результаты молекулярного скрининга с пятью маркерами гена *H1* совпали с данными фенотипизации (таблица 2). Максимальное совпадение с данными фенотипической оценки демонстрировали два SCAR-маркера гена *H1* – 57R и TG689.

Высокая частота совпадения данных фенотипизации и молекулярного скрининга отмечена для четырех маркеров – 57R, TG689, N146 и N195 (таблица 2) – статистически значимых ( $p < 0,05$ ) различий (согласно точному критерию Фишера) в результатах скрининга с которыми не выявлено. Однако при применении маркера TG689 требовалась постановка дополнительных повторностей, поскольку в ряде случаев результаты нескольких повторностей различались.

В сравнении с этими данными, эффективность использования в скрининге CAPS-маркера 239E4left/AluI была достоверно ниже согласно точному критерию Фишера. Этот маркер в дальнейший молекулярный скрининг мы не включали также и по причине его низкой встречаемости (3 %) у изученных нами нематодоустойчивых отечественных сортов. Отметим, что в статье Д. Мильчарек с соавторами (Milczarek et al., 2011) доля нематодоустойчивых сортов иностранной селекции с маркером 239E4left/AluI составила 23 %. Таким образом, для проведения дальнейшего скрининга были отобраны два маркера – 57R и N195, которые активно используются в селекционно-генетических исследованиях.

Молекулярный скрининг с отобранными маркерами 57R и N195 был продолжен для оставшихся 98 сортов экспериментальной выборки (таблица 3). Таким образом, суммарно мы получили данные о наличии-отсутствии маркеров 57R и N195 гена *H1* для 205 сортов отечественной селекции, для которых ранее были определены типы

цитоплазм. Из 205 изученных сортов 58 (28 %) имели маркеры гена *HI*, причем 53 (26 %) из них имели оба маркера (57R и N195), у пяти выявлен только маркер 57R; 147 (72 %) сортов не имели маркеров гена *HI*.

Таблица 3 – Результаты молекулярного скрининга 205 сортов отечественной селекции с использованием маркеров 57R и N195 гена *HI*

Устойчивость/ восприимчивость	Сорта	Ген	
		<i>HI</i>	
		Маркер	
		57R	N195
Устойчивые (N=45)	<b>N=38</b> Аврора, Альпинист, Архидея, Балтийский, Бежицкий, Вдохновение, Вектар, Вираз, Владикавказский, Вымпел, Гранат, Гусар, Даная, Евразия, Жемчужина, Живица, Жуковский ранний, Ирбитский, Кемеровчанин, Кортни, Красавица, Лига, Люкс, Манифест, Метеор, Наяда, Очарование, Пригожий 2, Пролисок, Рождественский, Росинка (Расинка), Россиянка, Рябинушка, Саровский, Скарб, Сударыня, Холмогорский, Шурминский 2	+	+
	<b>N=4</b> Дина, Кристалл, Ладожский, Нарочь	+	0
	<b>N=3</b> Калинка, Лазурит, Сузорье	0	0
	Итого устойчивых по данным фитопатологических тестов с маркером (% от числа устойчивых сортов)	42 (93%)	38 (84%)
Восприимчивые (N=146)	<b>N=12</b> Амур, Барон, Брянский приусадебный, Загадка, Киви, Олимп, Погарский, Румянка, Самба, Сапрыкинский, Тулеевский, Утенок	+	+
	<b>N=1</b> Гарант	+	0
	<b>N=133</b> Алена, Алиса, Антошка, Арина, Барин, Белогорский ранний, Белоснежка, Белуха, Болвинский, Большевик, Бородинский розовый, Брянская новинка, Брянский деликатес, Брянский красный, Брянский надежный, Брянский ранний, Брянский юбилейный, Букет, Варсна,–Веселовский 2-4, Весна белая, Ветеран, Виза, Волжский, Выток, Вятка, Гарт, Гатчинский, Горянка, Губернатор, Диво, Донцовский, Дружный, Елизавета, Жаворонок, Загадка Питера, Зарево, Зауральский, Здабытак, Зольский, Ильинский, Имандра, Искра, Кабардинский, Каменский, Катюша (Украина), Кемеровский, Колобок, Колпашевский, Кореневский, Кормилец, Корона, Красная горка, Красная заря, Красная роза, Красноуфимский, Кустаревский, Лазарь, Лаймдота, Лакомка, Ласунак, Лидер, Ломоносовский, Луговойской, Лыбидь, Любава, Майский цветок, Матушка, Маугли, Москворецкий, Мурманский, Мусинский, Надежда, Накра, Нальчикский, Нарт 1, Нарымка, Невский, Никулинский, Огниво, Одиссей, Оредежский, Памяти Осиповой, Парус, Петербургский, Престиж, Прибрежный, Прикульский ранний, Призер, Приморский (При-12), Рамзай, Регги, Резерв, Ресурс, Ромашка, Русич, Русская красавица, Свенский, Светлячок, Северянин, Сентябрь, Синева, Синтез, Сиреневый туман, Сказка, Скороплодный, Смена, Снегирь, Сокольский, Солнышко, Столовый 19, Суйдинский ранний, Танго, Теща, Томич, Удача, Украинский розовый, Успех, Фаленский, Филатовский, Фиолетовый, Хибинский ранний, Чайка, Чародей, Чароит, Чай, Шаман, Энергия, Эффект, Юбилей Жукова, Юбилейный Осетии, Юпитер, Явар	0	0
	Итого восприимчивых по данным фитопатологических тестов без маркера (% от числа восприимчивых сортов)	133 (91%)	134 (92%)
	не известна (N=14)	<b>N=3</b> Алы парус, Пранса, Сердолик	+
<b>N=11</b> Аметист, Брат-2, Горизонт, Горноуральский, Звездочка, Калибр, Лекарь, Наука, Рассвет, Сиверский, Фермер		0	0

Примечание. «+» – наличие маркера; «0» – отсутствие маркера. «N» – число сортов с определенным гаплотипом. Устойчивость/ восприимчивость приведены по литературным данным.

Из 205 изученных сортов 45 (22 %) были устойчивы к патотипу Ro1 *G. rostochiensis* по данным фитопатологических тестов, 146 (71 %) – восприимчивы (Госреестр сортов РФ; Костина, Фомина, 1999; Костина, Королева, 2012; Костина и др., 2016; Симаков и др., 2008, 2010, 2018 b). Для 14 сортов (7 %) нашей выборки не удалось найти опубликованные данные об их группе устойчивости. Уровень совпадения данных фенотипизации и результатов молекулярного скрининга с использованием маркеров 57R и N195 на выборке 191 сорта был высоким и составил 92 % и 90 %, соответственно.

Из 45 сортов выборки, устойчивых по данным фитопатологического анализа к патотипу Ro1 *G. rostochiensis*, 38 (84 %) сортов имели оба маркера гена *HI*. Еще у четырех устойчивых сортов присутствовал маркер 57R, но отсутствовал N195. У трех устойчивых сортов – ‘Калинка’, ‘Лазурит’, ‘Сузорье’ – маркеры гена *HI* не обнаружены (таблица 3).

Из 146 сортов, поражаемых патотипом Ro1 *G. rostochiensis*, 133 (91 %) не имели маркеров гена *HI* (таблица 3). Остальные 13 сортов (‘Амур’, ‘Барон’, ‘Гарант’, ‘Загадка’,

‘Олимп’, ‘Погарский’, ‘Самба’, ‘Тулеевский’, ‘Утенок’, ‘Брянский приусадебный’, ‘Румянка’, ‘Сапрыкинский’, ‘Киви’) обладали маркером 57R, хотя по литературным данным они поражаются патотипом Ro1 ЗКН (Госреестр сортов РФ; Костина и др., 2016).

Несоответствие группы устойчивости, указанной для 13 сортов в Госреестре сортов РФ, и результатов молекулярного скрининга можно объяснить жесткостью шкалы, используемой в РФ при оценке сортов на устойчивость к ЗКН (Симаков и др., 2009 а). По этой шкале при заражении растений ЗКН только сорта без цист на корнях относят к устойчивым, сорта с 1-5 цистами – к слабопоражаемым, остальные – к восприимчивым (Понин, Гладкая, 1985). Однако слабопоражаемые сорта фигурируют в Госреестре сортов РФ как восприимчивые (Симаков и др., 2009 а).

На следующем этапе мы оценили встречаемость сортов с маркером 57R гена *H1* в зависимости от года их выведения (рисунок 2).

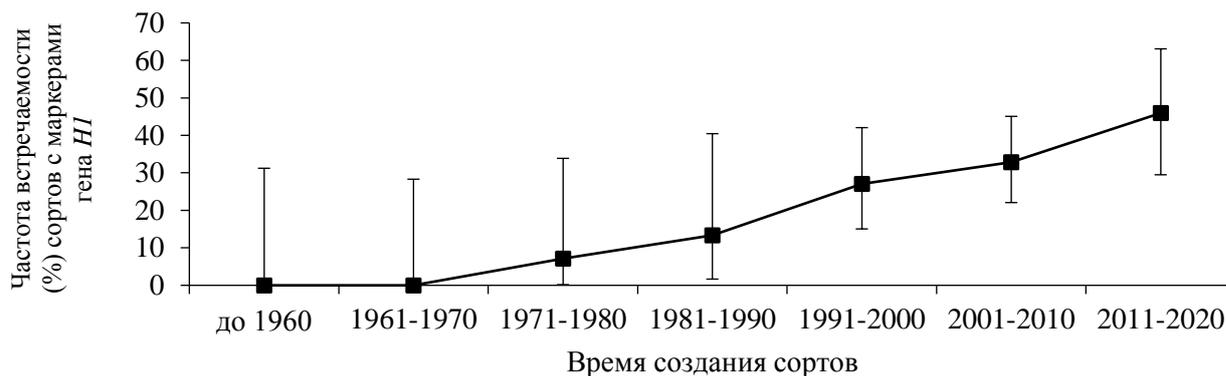


Рисунок 2 – Частота встречаемости сортов, созданных в разные годы, с маркером 57R гена *H1*.

Первое появление отечественных сортов с маркерами гена *H1* относится к концу 1970-х гг. (рисунок 2). В дальнейшем наблюдается положительная динамика частоты встречаемости устойчивых к ЗКН сортов. При этом среди сортов, созданных в последнее десятилетие, частота встречаемости маркера 57R составляет 46 % (рисунок 2), что указывает на невысокий уровень защищенности современных отечественных сортов против *G. rostochiensis* (патотип Ro1) – объекта внутреннего карантина.

Создание устойчивых к *G. rostochiensis* сортов является одним из приоритетных направлений отечественной селекции картофеля со второй половины 20 века (Симаков и др., 2009 а). Это связано с постепенным распространением вредителя – впервые ЗКН обнаружена на российской территории в 1948, а к 2021 г. карантинные фитосанитарные зоны по *G. rostochiensis* (патотип Ro1) были установлены в 51 субъекте РФ (Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору, 2022). В списке сортов картофеля, допущенных к использованию в РФ, на 3 марта 2021 года большинство (192 из 280) нематодоустойчивых сортов созданы за рубежом (Государственный реестр селекционных достижений..., 2021). Такая ситуация указывает на актуальность интенсификации усилий по созданию сортов картофеля, устойчивых к ЗКН (Симаков и др., 2005; 2009 а). Отбор ДНК маркеров с высокой диагностической ценностью и включение их в селекционный процесс может повысить эффективность работ по созданию нематодоустойчивых сортов.

## 2.2. Молекулярный скрининг отечественных сортов картофеля с использованием маркеров гена *Gro1-4*, контролирующего устойчивость к патотипу Ro1 *Globodera rostochiensis*

Молекулярный скрининг той же самой экспериментальной выборки из 205 отечественных сортов был продолжен с маркерами *Gro1-4* и *Gro1-4-1* гена *Gro1-4*, контролирующего устойчивость к патотипу Ro1 *G. rostochiensis*. Эти маркеры были

детектированы у восьми (4 %) из 205 сортов: ‘Брянский деликатес’, ‘Живица’, ‘Погарский’, ‘Самба’, ‘Сапрыкинский’, ‘Сердолик’, ‘Сиверский’, ‘Сударыня’. Из них сорта ‘Живица’, ‘Сударыня’ были устойчивы к ЗКН патотипу Ro1 по данным Госреестра сортов РФ; для сортов - ‘Сердолик’, ‘Сиверский’ найти данные о группе их устойчивости не удалось. Четыре сорта с маркерами гена *Gro1-4* (‘Брянский деликатес’, ‘Погарский’, ‘Самба’, ‘Сапрыкинский’) восприимчивы к ЗКН по данным Госреестра сортов РФ.

Меньшая по сравнению с маркерами гена *H1* распространенность маркеров гена *Gro1-4* среди отечественных нематодоустойчивых сортов может объясняться более редким использованием в селекции гибридных клонов, полученных с участием устойчивых образцов дикого южноамериканского вида картофеля *S. spgazzini* (источник гена *Gro1-4*), по сравнению с источниками нематодоустойчивости, созданными на основе устойчивых генотипов культурного вида *S. tuberosum* ssp. *andigenum* (источник гена *H1*).

### 3. Молекулярный скрининг сортов с маркерами генов/ *QTL*, контролирующей устойчивость к цистообразующим нематодам – объектам внешнего карантина

#### 3.1. Молекулярный скрининг сортов картофеля с маркерами локуса *Grp1*, контролирующего устойчивость к патотипу Ro5 *Globodera rostochiensis* (ЗКН)

В совместных исследованиях с сотрудниками лаборатории иммунитета растений к болезням ВИЗР д.б.н. О.С. Афанасенко и к.б.н. А.В. Хютти была проведена фитопатологическая оценка устойчивости к патотипу Ro5 ЗКН 26 отечественных и семи иностранных сортов. Устойчивыми к данному патотипу оказались 16 сортов (таблица 4).

Таблица 4 – Результаты молекулярного скрининга сортов с использованием маркеров локуса *Grp1*, контролирующего устойчивость к патотипу Ro5 *G. rostochiensis*

№	Сорт	Группа устойчивости к патотипу Ro5 ЗКН	Результаты скрининга с маркерами:		
			TG432/ RsaI	GP179/ RsaI	GP21/ DraI
<i>Отечественные сорта</i>					
1-3	Алый парус, Сиреневый туман, Red Scarlett	R	+	+	0
4-6	Антонина, Гранд, Колобок	MR	0	+	+
7-11	Варяг, Красавчик, Ломоносовский, Любава, Пламя	S	+	+	+
12-17	Вымпел, Ильинский, Крепыш, Лига, Метеор, Холмогорский	R	+	+	+
18-20	Гусар, Евразия, Наяда	R	0	+	+
21-22	Даная, Утро	R	+	0	+
23-24	Накра, Самба	MR	+	+	+
25	Невский	S	+	0	0
26	Ганго	S	0	+	+
27	Чароит	S	0	0	0
28	Alouette	MR	+	+	0
<i>Контрольные сорта</i>					
29	Damaris	R	+	+	0
30	Estrella	R	+	0	0
31	Labella, Queen Anne	S	+	0	0
33	Red Lady	S	+	+	+
Всего изучено 33 сорта, включая: 16 R (балл 9), 6 MR (балл 5-6), 11 S (балл 1-4) сортов, из них:					
Число (%) высокоустойчивых (балл 9) сортов с маркером			13 из 16 (81,3%)	13 из 16 (81,3%)	11 из 16 (68,8%)
Число (%) высокоустойчивых (балл 9) сортов без маркера			3 из 16 (18,7%)	3 из 16 (18,7%)	5 из 16 (31,2%)
Число (%) восприимчивых (балл 1-4) сортов с маркером			9 из 11 (81,8%)	7 из 11 (63,6%)	7 из 11 (63,6%)
Число (%) восприимчивых (балл 1-4) сортов без маркера			2 из 11 (18,2%)	4 из 11 (36,4%)	4 из 11 (36,4%)
Число среднеустойчивых (балл 5-6) сортов с маркером			3 из 6	6 из 6	5 из 6
Число среднеустойчивых (балл 5-6) сортов без маркера			3 из 6	6 из 6	1 из 6

Примечание. «+» – наличие у сортов маркера локуса *Grp1*; «0» – отсутствие маркера. R – высокоустойчивый, MR – среднеустойчивый, S – восприимчивый сорт.

Данные фенотипизации были сопоставлены с результатами молекулярного скрининга, проведенного нами с использованием трех CAPS-маркеров (TG432/RsaI, GP21/DraI, GP179/RsaI), сцепленных с локусом *Grp1\_QTL*, контролирующим устойчивость к патотипу Ro5 *G. rostochiensis*.

Все 16 устойчивых сортов выборки имели те или иные маркеры, сцепленные с локусом *Grp1\_QTL* (таблица 4). Из них у 6 сортов были выявлены диагностические фрагменты всех трех маркеров. У 13 сортов выявлены диагностические фрагменты маркеров TG432/RsaI и GP179/RsaI и у 11 сортов – одного маркера – GP21/DraI. Эти же маркеры в различных сочетаниях были найдены и у всех восприимчивых к патотипу Ro5 сортов, за исключением сорта ‘Чароит’. Применение точного теста Фишера не показало значимой ассоциации ( $p < 0,05$ ) между наличием/отсутствием маркеров и устойчивостью/восприимчивостью сортов. Необходимо продолжать работу по идентификации маркеров генов/QTLs, ассоциированных с устойчивостью к патотипу Ro5 *G. rostochiensis*.

### 3.2. Молекулярный скрининг отечественных сортов картофеля с маркерами генов/QTLs, контролирующими устойчивость к патотипам Pa2, Pa3 *Globodera pallida*

В таблице 5 представлены результаты молекулярного скрининга той же выборки сортов отечественной селекции, проведенного с использованием маркера *Gra2-2* гена *Gra2*, контролирующего устойчивость к патотипам Pa2, Pa3 *G. pallida* – бледной картофельной цистообразующей нематоды (БКН).

Таблица 5 – Результаты молекулярного скрининга 202 сортов с использованием маркера *Gra2-2* гена *Gra2*, вовлеченного в контроль устойчивости к патотипам Pa2, Pa3 *G. pallida*

Сорта	Ген
	Маркер
N=29 (14%)	
Алиса, Алый парус, Бежицкий, Болвинский, Бородянский розовый, Букет, Вектар, Вираз, Вымпел, Даная, Дина, Живица, Жуковский ранний, Калибр, Метеор, Одиссей, Оредежский, Пранса, Приморский (При-12), Пролисок, Рамзай, Россиянка, Сердолик, Сиреневый туман, Теща, Утенок, Чайка, Чароит, Юбилейный Осетии	+
Остальные 173 (86%) сорта экспериментальной выборки	0

Только у 29 (14%) сортов изученной выборки был детектирован маркер *Gra2-2*. В связи со сложностью работы с БКН, являющейся для РФ объектом внешнего карантина, данные фенотипизации по устойчивости к *G. pallida* для отечественных сортов отсутствуют. Оценить диагностическую эффективность маркера *Gra2-2* на этом этапе не представлялось возможным из-за неизвестной группы устойчивости сортов к патотипам Pa2, Pa3 *G. pallida*.

Впоследствии у нас появилась возможность оценить эффективность маркеров, ассоциированных с генами и QTLs, вовлеченными в контроль устойчивости к *G. pallida*, на отечественных сортах благодаря проведению совместной работы с сотрудниками лаборатории иммунитета растений к болезням ВИЗР (д.б.н. О.С. Афанасенко и к.б.н. А.В. Хютти). Согласно результатам фитопатологического анализа ограниченной выборки сортов отобраны два сорта – Даная и Вымпел – устойчивые к патотипу Pa3 БКН (таблица 6). Эти результаты были сопоставлены с данными молекулярного скрининга, который мы провели с использованием 12 ДНК маркеров пяти локусов, вовлеченных в контроль устойчивости к патотипам Pa2, Pa3 *G. pallida* (таблица 6).

Ни один из 12 использованных в скрининге маркеров не показал значимой ассоциации ( $p < 0,05$ ) результатов молекулярного скрининга и фенотипизации при

использовании точного теста Фишера (таблица 6). Каждый из маркеров (кроме HC-I/Hind III и C237-I) был детектирован у тех или иных восприимчивых сортов. В то же время комбинация пяти маркеров (Gpa2-1/Gpa2-2, 77R/HaeIII, GP34/TagI – 520 п.н. (Gpa2), TG432/RsaI, GP21/DraI (Grp1\_QTL)) была обнаружена только у двух устойчивых сортов выборки ('Даная' и 'Вымпел') и отсутствовала у всех восприимчивых сортов. Для дальнейшего использования этого перспективного гаплотипа в селекционных исследованиях необходима его верификация на большей выборке фенотипированных сортов.

Таблица 6 – Результаты молекулярного скрининга 21 сорта, проведенного с использованием 12 маркеров пяти локусов, ассоциированных с устойчивостью к патотипу Pa3 *G. pallida*

№	Сорта	Группа устойчивости к патотипу Pa3 <i>G. pallida</i>	QTLs / маркеры											
			<i>Gpa2</i>				<i>Grp1_QTL</i>			<i>GpaV<sup>S<sub>sp</sub></sup></i> _QTL		<i>GpaV<sub>vm</sub></i> _QTL		<i>GpaV<sup>S<sub>adig</sub></sup></i> _QTL
			Gpa2-1, Gpa2-2	77R/HaeIII	GP34/TagI – 520 пн	GP34/TagI – 550 пн	TG432/RsaI	GP21/DraI	GP179/RsaI	GP179/EcoRV	HC	HC-I/Hind III	C237-I	
<i>Отечественные сорта</i>														
1	Алый парус	S	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	0	
2	Антонина	S	0	0	+	+	0	+	+	+	*	0	0	
3	Вымпел	R	+	+	+	+	+	+	+	+	*	0	0	
4	Гранд	S	0	0	+	+	0	+	+	+	0	0	0	
5	Гусар	S	0	0	0	+	0	+	+	+	0	0	0	
6	Даная	R	+	+	+	0	+	+	0	0	+	0	+	
7	Красавчик	S	0	0	0	+	+	+	+	+	*	0	0	
8	Крепыш	S	0	0	+	+	+	+	+	+	0	0	0	
9	Ломоносовский	S	0	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	
10	Наяда	S	0	0	+	0	0	+	+	+	*	0	0	
11	Невский	S	0	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0	
12	Пламя	S	0	0	+	+	+	+	+	+	0	0	0	
13	Самба	MR	0	0	+	0	+	+	+	+	0	0	0	
14	Танго	S	0	0	0	0	0	+	+	+	+	0	0	
15	Утро	S	+	+	0	0	+	+	0	0	0	0	0	
16	Чароит	S	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Контрольные сорта</i>														
17	Alouette	S	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	0	
18	Sara	S**	нд	+	+	+	нд	нд	нд	нд	нд	нд	нд	
19	Innovator	R**	нд	нд	нд	нд	нд	нд	нд	нд	+	+	нд	
20	Red Lady	S	0	0	0	0	+	+	+	+	*	0	0	
21	Red Scarlett	S	0	0	+	+	+	0	+	+	*	0	0	
Всего изучено 21 сорт, включая: три устойчивых, балл 9 (R), один с баллом 6 (MR), и 17 восприимчивых, 1-4 балла (S)														
Число высокоустойчивых (балл 9) сортов с маркером	2 из 2	2 из 2	2 из 2	1 из 2	2 из 2	2 из 2	1 из 2	1 из 2	1 из 2	–	0	1 из 2		
Число высокоустойчивых (балл 9) сортов без маркера	0	0	0	1 из 2	0	0	1 из 2	1 из 2	–	2 из 2	1 из 2			
Число восприимчивых (балл 1-4) сортов с маркером	3 из 16	3 из 16	10 из 16	9 из 16	10 из 16	11 из 16	13 из 16	13 из 16	–	0	0			
Число - % восприимчивых (балл 1-4) сортов без маркера	13 из 16 (81,3%)	13 из 16 (81,3%)	6 из 16 (37,5%)	7 из 16 (43,8%)	6 из 16 (37,5%)	5 из 16 (31,3%)	3 из 16 (18,8%)	3 из 16 (18,8%)	–	16 из 16	16 из 16			

Примечание. «+» – наличие маркера; «0» – отсутствие маркера; «нд» – нет данных. R – высокоустойчивый, MR – среднеустойчивый, S – восприимчивый сорт. \* – невозможно однозначно оценить результат MAS. \*\* – по информации «Potato Variety Database». Комбинация 5 маркеров у устойчивых сортов выделена серым цветом.

Отметим, что два сорта – ‘Даная’ и ‘Вымпел’, устойчивые к патотипу Pa3 *G. pallida*, были также устойчивы и к патотипам Ro1 и Ro5 *G. rostochiensis* согласно данным фитопатологических тестов. Эти отечественные сорта являются примером пирамидирования определенных аллелей генов/QTLs, контролирующими устойчивость к разным патотипам двух видов цистообразующих картофельных нематод.

Согласно данным литературы, устойчивость к цистообразующим картофельным нематодам (ЗКН и БКН) была интрогрессирована в селекционный генофонд от образцов андийского культурного вида *S. tuberosum* ssp. *andigenum*, диких видов доместикационного комплекса *S. brevicaulis* и родственного аргентинского дикого вида картофеля *S. vernei* (Gartner, et al., 2021). В литературе сообщалось о выявлении у образцов этих видов А-, Р-, М-типов цитоплазм (Hosaka, Sanetomo, 2009; Gavrilenko et al., 2013, Spooner et al., 2014). В то же время, в нашей работе ни у одного из устойчивых к ЗКН и БКН сортов эти типы цитоплазм не были выявлены, что подтверждает наше предположение о том, что андийские виды картофеля участвовали в селекционном процессе в качестве опылителей.

#### 4. Молекулярный скрининг отечественных сортов картофеля с маркерами генов *Ry<sub>sto</sub>/Ry-*f<sub>sto</sub>**, контролирующих иммунитет к Y вирусу картофеля (PVY)

Результаты нашей работы показали, что ~10 % современных сортов имеют W/γ-тип цитоплазмы (раздел 1, «Результаты и обсуждения»), полученный от дикого мексиканского вида вторичного генпула – *S. stoloniferum*, который использовался в селекционных программах, направленных на создание иммунных к PVY сортов картофеля. Мы провели молекулярный скрининг сортов, изученных ранее с помощью маркеров разных типов цитоплазм, с использованием трех маркеров (STM0003, YES3-3A, GP122-406/EcoRV), сцепленных с генами *Ry<sub>sto</sub>/Ry-*f<sub>sto</sub>**, детерминирующими иммунный ответ растений к PVY.

Из 21 сорта с W/γ-типом цитоплазмы ДНК-маркеры генов *Ry<sub>sto</sub>/Ry-*f<sub>sto</sub>** были обнаружены у 15 (71,4 %) сортов. У шести сортов с W/γ-типом маркеры генов *Ry<sub>sto</sub>/Ry-*f<sub>sto</sub>** обнаружены не были. Каждый из этих 15 сортов имел все три маркера STM0003, YES3-3A, GP122-406/EcoRV, что вероятно, связано с тесным сцеплением указанных маркеров с *Ry<sub>sto</sub>/Ry-*f<sub>sto</sub>** (Valkonen et al, 2017).

Ни у одного из 105 сортов с D-типом цитоплазмы и из 84 сортов с T-типом цитоплазмы маркеры STM0003, YES3-3A, GP122-406/EcoRV не были обнаружены (рисунок 3).

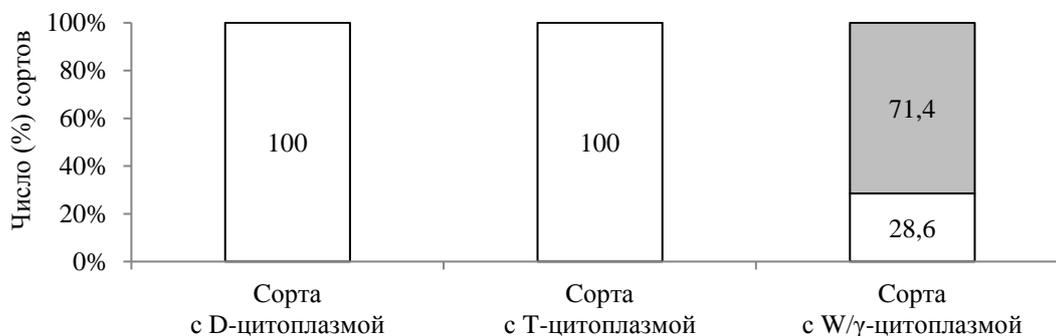


Рисунок 3 – Встречаемость маркеров STM0003, YES3-3A, GP122-406/EcoRV генов *Ry<sub>sto</sub>/Ry-*f<sub>sto</sub>** у сортов с D-, T- и W/γ-типами цитоплазм.

Серый цвет – частота сортов, у которых найдены диагностические фрагменты этих маркеров; белый цвет – частота сортов без этих маркеров.

Анализ доступных нам литературных данных подтвердил участие *S. stoloniferum* в родословных 11 из 15 сортов. Для 13 из 15 сортов с маркерами генов *Ry<sub>sto</sub>/Ry-*f<sub>sto</sub>** в литературе сообщается о высокой и очень высокой устойчивости к PVY (Яшина, 2010;

каталог «Российские сорта картофеля», 2011; Костина, Королева, 2012; Маханько и др., 2018; Симаков и др., 2018 а; Бирюкова и др., 2019).

### 5. Молекулярный скрининг отечественных сортов картофеля с маркерами генов *R1*, *R3a*, контролирующей расоспецифическую устойчивость к фитофторозу, интрогрессированных в селекционные сорта от *Solanum demissum*

Согласно полученным нами данным, D-тип цитоплазмы от *S. demissum* широко распространен среди селекционных сортов картофеля, что объясняется односторонней межвидовой несовместимостью в скрещиваниях этого мексиканского вида с *S. tuberosum*. Отметим, что японские исследователи опубликовали данные о функциональной стерильности пыльцы носителей D-типа цитоплазмы (Sanetomo et al., 2011; Hosaka, Sanetomo, 2012). В этом случае, гибриды, селекционные клоны и сорта с D-типом цитоплазмы могли участвовать в скрещиваниях только как материнские формы, следовательно, можно ожидать, что ядерные гены *R1*, *R3a*, контролирующие расоспецифическую устойчивость к фитофторозу, будут выявляться только у носителей D-типа цитоплазмы. Если же среди сортов «демиссоидов» с D-типом цитоплазмы встречаются формы с мужской фертильностью, то ядерные гены *R1*, *R3a*, интрогрессированные в селекционный генофонд от *S. demissum*, будут встречаться у сортов с разными типами цитоплазм.

С другой стороны, известно, что некоторые образцы *S. demissum* характеризовались мужской фертильностью и использовались в межвидовых скрещиваниях как опылители (Костина, Косарева, 2017; Sanetomo et al., 2011). При использовании в селекционном процессе таких образцов *S. demissum* можно ожидать, что гены *R1*, *R3a* будут встречаться у сортов не только с D-типом цитоплазм.

Для проверки этих предположений был проведен молекулярный скрининг отечественных сортов картофеля, имеющих разные типы цитоплазм, с использованием внутригенных маркеров генов *R1* и *R3a*, вовлеченных в контроль расоспецифической устойчивости к фитофторозу. В скрининге участвовали 80 сортов картофеля отечественной селекции с D-типом цитоплазмы, 67 сортов с T-типом, 10 – с W/γ-типом и один сорт с A-типом цитоплазмы. Оказалось, что 113 сортов имели как минимум один из маркеров R1 или RT-R3a (рисунок 4). Из них 28 сортов имели оба эти маркера, остальные 85 – по одному из них. У 45 сортов маркеры R1 и RT-R3a обнаружены не были (списки сортов приведены в диссертации). Важно отметить, что данные маркеры генов *R1* и *R3a*, контролирующей расоспецифическую устойчивость к фитофторозу, интрогрессированные от *S. demissum*, встречались у сортов с разными типами цитоплазм примерно в равном соотношении (рисунок 4) – эти маркеры выявлены не только у сортов с D-, но и с T-, W/γ-типами цитоплазм.

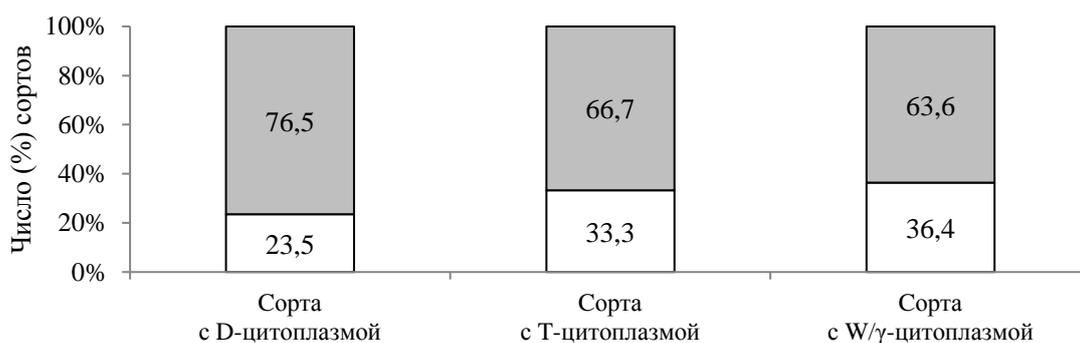


Рисунок 4 – Частота (%) сортов с маркерами R1 и/или R3a генов *R1* и *R3a*.

Серый цвет – частота сортов, у которых найдены диагностические фрагменты маркеров R1 и/или R3a; белый цвет – сорта без этих маркеров.

Наличие маркеров R1 и/или RT-R3a у сортов с T- и W/γ-типами цитоплазм можно объяснить использованием в селекционном процессе доноров соответствующих генов *R1*, *R3a* *S. demissum* в качестве опылителей. Это заключение согласуется с нашими данными о выявлении «эффективных» опылителей среди сортов с цитоплазмой D-типа. В то же время, наше заключение противоречит данным японских исследователей о функциональной стерильности пыльцы носителей D-типа цитоплазмы (Sanetomo et al., 2011; Hosaka, Sanetomo, 2012), что может быть объяснено привлечением в отечественную селекцию источников D-типа цитоплазмы, отличающихся от зарубежных.

## **6. Молекулярный скрининг отечественных сортов картофеля с маркерами генов *RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1*, вовлеченных в контроль устойчивости к широкому спектру рас *Phytophthora infestans***

Согласно литературным данным, у образцов дикого мексиканского вида *S. stoloniferum* был идентифицирован ген *Rpi-sto1*, который является функциональным гомологом гена *RB/Rpi-blb1*, контролирующего устойчивость к широкому спектру рас *P. infestans* (Wang et al., 2008; Lokossou et al., 2010). Поскольку в экспериментальной выборке были обнаружены сорта с генетическим материалом *S. stoloniferum*, мы также провели скрининг выборки с пятью внутривидовыми маркерами *Rpi*-генов *RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1*: *Rpi-sto1*, BLB1F/R, 1/1', 517/1519, RB-629. Среди 207 изученных сортов диагностические фрагменты всех пяти маркеров были обнаружены у восьми генотипов – шести сортов 'Евразия', 'Сиверский', 'Сударыня', 'Балтийский', 'Аврора', 'Огниво' и у двух родственных селекционных клонов 1604/16 и 1101/10.

Продукты амплификации, полученные с праймерами *Rpi-sto1* и BLB1F/R (амплифицируют участки гена, кодирующие СС- и LRR-домены белка-эффектора), у восьми отобранных в молекулярном скрининг генотипов, а также у устойчивого к фитофторозу контрольного образца *S. stoloniferum* PI 205522 (Левый и др., 2017) были секвенированы. В качестве референсных были использованы полные последовательности гена *RB/Rpi-blb1* образца дикого мексиканского вида *S. bulbocastanum* (AY426259, van der Vossen et al., 2003) и гена *Rpi-sto1* образца *S. stoloniferum* (EU884421, Vleeshouwers et al., 2008); оба образца устойчивы к широкому спектру рас патогена.

Все секвенированные последовательности фрагментов, амплифицированных праймерами *Rpi-sto1*, у изученных образцов и у контрольного устойчивого образца *S. stoloniferum* PI 205522 оказались одинаковыми, но отличались от референсной последовательности EU884421 *S. stoloniferum* тремя однонуклеотидными заменами (рисунок 5).

Одна замена (С на Т, позиция 315) была выявлена в области первого экзона, но была синонимичной и приводила к образованию другого кодона для аминокислоты валин (GTC → GTT). Две другие замены произошли в интроне (позиции 631 и 975). При сопоставлении полученных с использованием праймеров *Rpi-sto1* последовательностей с референсом AY426259 *S. bulbocastanum*, были установлены две однонуклеотидные замены: в позиции 315 (как и в случае с референсной последовательностью EU884421 *S. stoloniferum*) и в позиции 538, находящейся в интроне.

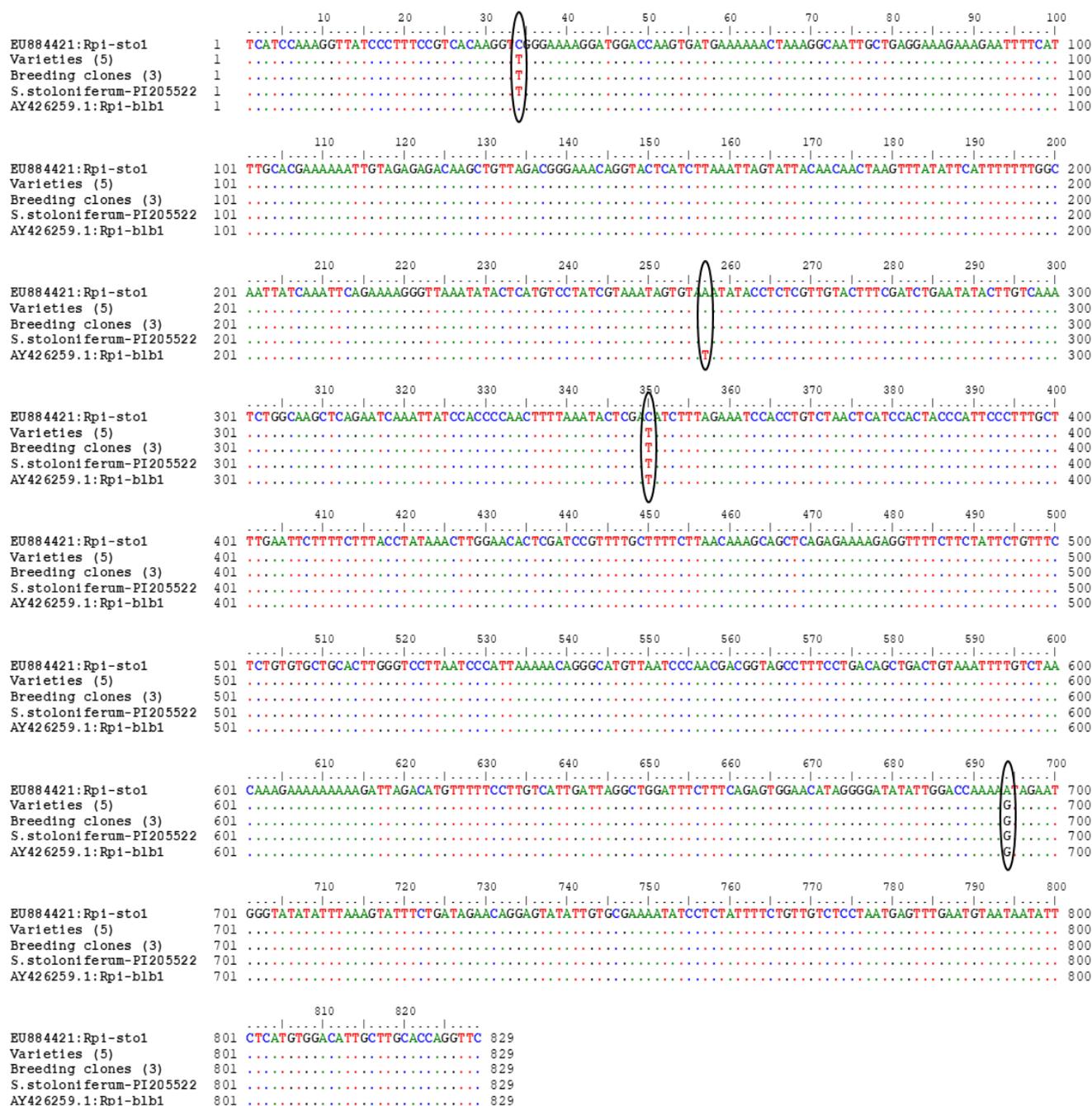


Рисунок 5 – Последовательности ампликонов маркера Rpi-sto1 восьми генотипов, выровненные относительно референсных последовательностей AY426259.1 и EU884421.

Сорта (6): ‘Аврора’, ‘Балтийский’, ‘Евразия’, ‘Огниво’, ‘Сударыня’, ‘Сиверский’ (гибрид 3602/28); селекционные клоны (2): 1101/10, 1604/16.

Результаты выравнивания последовательностей показали, что амплификационные продукты праймеров VLB1F/R всех восьми отобранных нами в молекулярном скрининге генотипов были идентичны соответствующему участку обоих референсных генов, то есть уровень гомологии составил 100 %.

Таким образом, последовательности амплифицированных фрагментов Rpi-sto1 и VLB1F/R у отобранных 6 сортов и двух селекционных клонов соответствовали референсным последовательностям участков функциональных аллелей генов *Rpi-sto1* и *RB/Rpi-blb1*, контролирующей устойчивость к широкому спектру рас фитофторы у устойчивых образцов диких мексиканских видов картофеля.

Насколько нам известно, это первый пример селекционных сортов, в которые ген *RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1* был перенесен традиционными методами межвидовой гибридизации; ранее сообщалось о цис-генных сортах картофеля с этими генами (Haverkort et al 2016). Из восьми генотипов с маркерами генов *RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1* –

четыре сорта ('Балтийский', 'Евразия', 'Сиверский', 'Сударыня') и два гибрида (1101/10, 1604/16) были созданы селекционером Ленинградского НИИСХ «Белогорка» З.З. Евдокимовой с участием одной и той же интрогрессивной формы 8889/3, отобранной в потомстве межвидового гибрида с *S. stoloniferum*. Анализ родословных этих сортов (Гавриленко и др., 2018) показал, что селекционный клон 8889/3, обладавший геном *Rpi/sto1*, характеризовался мужской фертильностью и использовался в качестве опылителя, поэтому сорта, созданные с его участием, имеют разные типы цитоплазм: 'Балтийский' (Т-тип), 'Евразия' (W/γ-тип), 'Сиверский' (W/γ-тип), 'Сударыня' (W/γ-тип), 1101/10 (D-тип), 1604/16 (W/γ-тип).

## **7. Сопоставление результатов молекулярного скрининга образцов отечественных сортов картофеля из коллекции ВИР с результатами, полученными для образцов тех же сортов из других источников**

77 сортов экспериментальной выборки были представлены двумя-пятью дублетами, полученными из разных источников: образцы полевой и *in vitro* коллекции ВИР и образцы тех же сортов из разных селекционных центров. Дублетные образцы, полученные из разных источников, были вовлечены в молекулярный скрининг с маркерами генов *H1*, *Gro1-4*, *Gpa2*, *Rysto/Ry-fsto*, *R1*, результаты которого были сопоставлены с данными, полученными для образцов тех же сортов из полевой коллекции ВИР. Несовпадения были выявлены в 8 % случаев.

Кроме того, для небольшой части сортов, изученных в настоящей работе, данные по отдельным маркерам были опубликованы другими авторами. При сопоставлении полученных нами результатов с литературными данными в 22 % случаев выявлены несовпадения по отдельным маркерам.

Для решения подобных спорных вопросов необходимо создание контрольных образцов – эталонов, которые помогут проверить идентичность разных образцов одного и того же сорта. Такой подход может быть реализован при создании номенклатурных стандартов, соответствующих положениям Международного кодекса номенклатуры культурных растений (МКНКР) (Brickell et al., 2016).

## **8. Оформление и регистрация в Гербарии ВИР номенклатурных стандартов сортов, выведенных сотрудниками Ленинградского НИИСХ «Белогорка», а также разработка молекулярно-генетических паспортов этих сортов**

В соответствии с положениями МКНКР в рамках настоящей работы были созданы номенклатурные стандарты 21 сорта, выведенных селекционерами Ленинградского НИИСХ «Белогорка». Растительный материал для гербаризации, включавший побег с соцветиями и клубни одного и того же индивидуального растения каждого сорта, были отобраны лично авторами (к.с.- х.н. Н.М. Гаджиев, к.с.-х.н. З.З. Евдокимова и д.с.- х.н. В.А. Лебедева) на опытном поле Ленинградского НИИСХ «Белогорка» и вместе с документами переданы в Гербарий культурных растений, их диких родичей и сорных растений (WIR) для оформления номенклатурных стандартов. Непосредственно перед гербаризацией побегов мы проводили фоторегистрацию и верификацию морфологических признаков переданного растительного материала, а также их сопоставление с данными, приведенными в официальных документах: «Анкете сорта» и в «Описании селекционного достижения». Номенклатурные стандарты, подготовленные в совместных исследованиях, были зарегистрированы в базе данных «Гербарий ВИР», переданы на хранение в типовой фонд гербария ВИР и опубликованы (Клименко и др., 2020).

Перед гербаризацией часть растительного материала отбирали для выделения ДНК с целью проведения молекулярно-генетической паспортизации. Генетические паспорта,

содержащие информацию о полиморфизме 10 хромосомспецифичных однокопийных микросателлитных локусов, были дополнены данными о наличии/отсутствии диагностических фрагментов 12 маркеров 11 генов, контролирующих устойчивость к вредным организмам.

Результаты SSR-генотипирования образцов номенклатурных стандартов, приведенные в генетических паспортах, были использованы для верификации 35 образцов белогорских сортов и селекционных клонов, полученных из пяти различных источников. Сопоставление микросателлитных профилей номенклатурных стандартов и образцов одноименных сортов выявили совпадение аллельного состава изученных SSR-локусов в большинстве случаев – для 30 из 35 образцов. По результатам SSR-генотипирования были выявлены два различных генотипа, обозначенных как сорт ‘Ломоносовский’; три отличающихся генотипа, обозначенных как сорт ‘Сударыня’, и три разных генотипа под названием сорт ‘Невский’. Можно заключить, что наличие генетического паспорта номенклатурного стандарта позволяет оценить генетическую однородность сорта и верифицировать подлинность образцов сорта, полученных из различных источников.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. С использованием маркеров разных локусов пластидной и митохондриальной ДНК охарактеризовано генетическое разнообразие по типам цитоплазм 214 сортов картофеля отечественной селекции; в изученной выборке выявлены четыре из восьми известных типов цитоплазм – чилийский Т-тип (у 39 % сортов) и интрогрессированные от диких мексиканских видов вторичного генпула D-тип от *S. demissum* (у 50,5%) и W/γ-тип от *S. stoloniferum* (у 10%). За единственным исключением для А-типа (0,5%) в проанализированной выборке не выявлены сорта с А-, М-, Р- типами цитоплазм андийских культурных видов.

2. Выявлена положительная динамика в изменении частоты встречаемости сортов с генетическим материалом, интрогрессированным от мексиканских диких видов вторичного генпула. При сравнении сортов, выведенных в 21 веке, с сортами селекции второй половины 20 века частота сортов с D-типом цитоплазмы увеличилась с 37,5 % до 61 %, тогда как частота сортов с «культурным» чилийским Т-типом снизилась с 53 % до 28 %.

3. Выявлен низкий уровень защищенности изученных отечественных сортов по отношению к патотипу Ro1 золотистой цистообразующей картофельной нематоды (*G. rostochiensis*) по данным молекулярного скрининга с маркерами генов *H1* и *Gro1-4*, контролирующих устойчивость к данному патотипу. Маркеры гена *H1* детектированы у 28% сортов выборки, маркеры гена *Gro1-4* детектированы только у 4 % изученных сортов.

4. В изученной выборке отечественных сортов отмечена низкая частота (14 %) встречаемости маркера *Gpa2-2* гена *Gpa2*, детерминирующего устойчивость к патотипу Pa3 бледной цистообразующей картофельной нематоды (*G. pallida*). На ограниченной выборке, включающей 21 сорт, показано отсутствие связи между наличием/отсутствием данного маркера и фитопатологической устойчивостью. С использованием в скрининге 11 ДНК-маркеров, ассоциированных с 5 локусами, вовлеченными в контроль к этому патотипу, выявлен перспективный гаплотип для молекулярной селекции на устойчивость к бледной нематоды, при этом диагностическая эффективность каждого из 11 ДНК-маркеров была низкой.

5. Все сорта изученной выборки с маркерами ядерных генов *Ry<sup>stol</sup>*/*Ry<sup>fsto</sup>*, контролирующих устойчивость к Y вирусу картофеля, интрогрессированных от мексиканского дикого вида *S. stoloniferum*, имели W/γ-тип цитоплазмы и характеризовались тетрадной мужской

стерильностью; данные сорта могут использоваться в дальнейших скрещиваниях только как материнские формы.

6. Маркеры генов *R1* и *R3a*, контролирующих расоспецифическую устойчивость к фитофторозу, интрогрессированных в селекционные сорта от мексиканского дикого вида *S. demissum*, выявлены у 23,5 % сортов с цитоплазмой D-типа, у 33,3 % сортов с цитоплазмой T-типа и у 36,4 % сортов с цитоплазмой W/γ-типа, что не подтверждает литературные данные о функциональной стерильности пыльцы носителей D-типа цитоплазмы. Среди сортов с D-типом цитоплазмы выявлены формы с мужской фертильностью.

7. Впервые среди селекционных сортов, выведенных традиционными методами, обнаружены генотипы с маркерами генов *RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1*, контролирующих устойчивость к широкому спектру рас возбудителя фитофтороза (*P. infestans*), которые согласно литературным данным были идентифицированы у диких мексиканских видов *S. bulbocastanum* и *S. stoloniferum*. Структурный анализ участков генов *RB/Rpi-blb1* и *Rpi-sto1* отобранных в молекулярном скрининге сортов выявил их гомологию с представленными в GeneBank нуклеотидными последовательностями функциональных аллелей этих генов у устойчивых образцов диких мексиканских видов.

8. Оформлены номенклатурные стандарты и генетические паспорта 21 сорта картофеля селекции Ленинградского НИИСХ «Белогорка», которые могут быть использованы в качестве контроля в изучении генетической идентичности и однородности образцов одного и того же сорта, полученных из различных источников.

**Дальнейшее развитие темы диссертационного исследования** может быть связано с расширением выборки отечественных сортов и с использованием новых ДНК-маркёров, ассоциированных с различными хозяйственно ценными признаками, что в перспективе будет способствовать повышению эффективности разных направлений селекционно-генетических исследований картофеля.

В дальнейших исследованиях целесообразно продолжить оформление номенклатурных стандартов отечественных сортов и разработку их молекулярно-генетических паспортов, что повысит эффективность оценки генетической однородности сорта и подлинности разных образцов определенного сорта, а также будет способствовать повышению качества документации и сохранения генофонда сортов картофеля в различных коллекциях.

## **СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:**

### ***Работы, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:***

1. Антонова, О.Ю. Генетическое разнообразие сортов картофеля российской селекции и стран ближнего зарубежья по данным полиморфизма SSR-локусов и маркеров R-генов устойчивости / О.Ю. Антонова, Н.А. Швачко, Л.Ю. Новикова, О.Ю. Шувалов, Л.И. Костина, **Н.С. Клименко**, А.Р. Шувалова, Т.А. Гавриленко // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016. 20(5): 596606.

2. **Клименко, Н.С.** Маркер-опосредованная селекция отечественных сортов картофеля с маркерами генов устойчивости к золотистой картофельной нематоды (патотип Ro1) / **Н.С. Клименко**, О.Ю. Антонова, Л.И. Костина, Ф.Т. Мамадбокирова, Т.А. Гавриленко // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2017. 178(4): 6675.

3. Antonova, O.Y. Finding *RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1*-like sequences in conventionally bred potato varieties / O.Y. Antonova, **N.S. Klimentko**, Z.Z. Evdokimova, L.I. Kostina, T.A. Gavrilenko // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018. 22(6): 693-702.

4. Гавриленко, Т.А. Молекулярный скрининг сортов и гибридов картофеля северо-западной зоны Российской Федерации / Т.А. Гавриленко, **Н.С. Клименко**, О.Ю. Антонова, В.А. Лебедева, З.З. Евдокимова, Н.М. Гаджиев, О.В. Апаликова, Н.В. Алпатьева, Л.И. Костина, Н.М. Зотеева, Ф.Т. Мамадбокирова, К.В. Егорова // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018. 22(1): 3545.
5. Гавриленко, Т.А. Генетическое разнообразие сортов картофеля российской селекции и стран ближнего зарубежья по типам цитоплазм / Т.А. Гавриленко, **Н.С. Клименко**, Н.В. Алпатьева, Л.И. Костина, В.А. Лебедева, З.З. Евдокимова, О.В. Апаликова, Л.Ю. Новикова, О.Ю. Антонова // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019. 23(6): 753764.
6. **Клименко, Н.С.** Скрининг сортов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) российской селекции с помощью маркеров R-генов устойчивости к Y-вирусу картофеля / **Н.С. Клименко**, О.Ю. Антонова, В.В. Желтова, Н.А. Фомина, Л.И. Костина, Ф.Т. Мамадбокирова, Т.А. Гавриленко // Сельскохозяйственная биология. 2019. 54(5): 958969.

#### **Работы, опубликованные в других изданиях:**

7. **Клименко, Н.С.** Поиск источников устойчивости к *Globodera pallida* и к вирусу X картофеля в коллекции отечественных сортов картофеля с использованием молекулярных маркеров / **Н.С. Клименко**, Т.А. Гавриленко, Л.И. Костина, Ф.Т. Мамадбокирова, О.Ю. Антонова // Биотехнология и селекция растений. 2019. 2(1): 4248.
8. **Клименко, Н.С.** Номенклатурные стандарты и генетические паспорта сортов картофеля, выведенные селекционерами Ленинградского НИИСХ «Белогорка» / **Н.С. Клименко**, Т.А. Гавриленко, И.Г. Чухина, Н.М. Гаджиев, З.З. Евдокимова, В.А. Лебедева // Биотехнология и селекция растений. 2020. 3(3): 1854.
9. Gavrilenko, T.A. Phenotypic and DNA Marker-Assisted Characterization of Russian Potato Cultivars for Resistance to Potato Cyst Nematodes / T.A. Gavrilenko, A.V. Khiutti, **N.S. Klimentko**, O.Y. Antonova, N.A. Fomina, O.S. Afanasenko // Agronomy. 2021. 11: 2400.
10. Антонова, О.Ю. SSR-анализ современных российских сортов картофеля с использованием ДНК номенклатурных стандартов / **Н.С. Клименко**, Д.А. Рыбаков, Н.А. Фомина, В.В. Желтова, Л.Ю. Новикова, Т.А. Гавриленко // Биотехнология и селекция растений. 2021. 3(4): 7796.

### **БЛАГОДАРНОСТИ**

Автор выражает огромную благодарность своему научному руководителю д.б.н. Т.А. Гавриленко за постоянное внимание и помощь в работе на всех ее этапах. Автор глубоко признателен д.б.н. Л.И. Костиной за совместную работу по формированию выборки образцов сортов из коллекции ВИР и консультирование. Автор признателен за помощь в проведении молекулярного скрининга и SSR анализа к.б.н. О.Ю. Антоновой и всем коллегам отдела биотехнологии, способствовавшим реализации данного исследования; особая благодарность аспирантам Н.А. Фоминой, Д.А. Рыбакову, В.В. Желтовой, и студентам Ф.Т. Мамадбакировой, К.В. Егоровой. Автор выражает благодарность за помощь в подготовке номенклатурных стандартов сортов сотрудникам отдела агроботаники и *in situ* сохранения генетических ресурсов растений ВИР к.б.н. И.Г. Чухиной и к.б.н. Л.Ю. Шипилиной, а также д.б.н. В.А. Лебедевой, к.б.н. З.З. Евдокимовой, к.б.н. Н.М. Гаджиеву (Ленинградского НИИСХ «Белогорка» и селекционная фирма «Лига»). Автор признателен за обучение процессу клонирования продуктов ПЦР и анализу сиквенсов к.б.н. Н.В. Алпатьевой. Автор благодарен к.т.н. Л.Ю. Новиковой и к.б.н. П.В. Озерскому (ВИР) за помощь в проведении статистической обработки результатов. Автор выражает благодарность сотрудникам лаборатории иммунитета растений к болезням ВИЗР д.б.н. О.С. Афанасенко и к.б.н. А.В. Хютти за продуктивное сотрудничество.