

На правах рукописи

Рыбаков Даниил Александрович

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

Научно-квалификационной работы (диссертации)

Молекулярная паспортизация сортов картофеля коллекции ВИР по данным микросателлитного анализа и молекулярного скрининга с маркерами генов селекционно-ценных признаков

Направление 06.06.01 Биология

Направленность (профиль) 03.02.07 Генетика

Санкт-Петербург, 2023 г.

Работа выполнена в отделе биотехнологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова».

**И.о. заведующего отделом биотехнологии: Клименко Наталья Станиславовна**, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова».

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

**Консультант: Антонова Ольга Юрьевна**, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией молекулярной селекции и ДНК-паспортизации отдела биотехнологии 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».

## СОДЕРЖАНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	5
ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ	7
НАУЧНАЯ НОВИЗНА, ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ	8
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	10
2.1 <b>Материалы</b>	10
2.1.1 Отечественные селекционные сорта картофеля разных периодов селекции из коллекции ВИР	10
2.1.2 Современные сорта картофеля, выведенные в различных селекцентрах РФ	10
2.1.3 Дублетные образцы - образцы одноименных сортов, полученные из различных биоресурсных коллекций	10
2.1.4 Старые гербарные образцы отечественных селекционных сортов картофеля, сохраняемые в Гербарии WIR	11
2.1.5 Межсортовые гибриды Ленинградского НИИСХ «Белогорка» - филиал ФИЦ картофеля А.Г. Лорха	11
2.2 <b>Методы</b>	11
2.2.1 Оформление номенклатурных стандартов и гербарных ваучеров	11
2.2.2 Генотипирование и создание молекулярно-генетических паспортов сортов картофеля	13
2.2.2.1 Выделение тотальной ДНК	13
2.2.2.2 ДНК маркеры	13
2.2.2.3 ПЦР	14
2.2.2.4 Рестрикция	15
2.2.2.5 Электрофорез	15
2.2.2.6 Оформление генетических паспортов	15
2.3 Анализ идентичности и однородности одноименных образцов сортов картофеля из различных коллекций, выявление дублетных образцов	16
2.4 Введение образцов сортов в культуру <i>in vitro</i> , поддержание <i>in vitro</i> коллекции сортов; создание баз данных <i>in vitro</i> и криоколлекции ВИР	17
3. <b>РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b>	18
3.1 Оформление номенклатурных стандартов и гербарных ваучеров	18
3.2 Молекулярно-генетическая паспортизация современных российских сортов картофеля и генотипирование перспективных селекционных клонов с использованием препаратов ДНК номенклатурных стандартов и ваучерных образцов	22

3.2.1 Оценка уровня полиморфизма SSR-локусов в современном российском генофонде сортов картофеля	22
3.2.2 Маркеры R-генов устойчивости к вредным организмам у современных российских сортов и предсортов картофеля	26
3.2.3 Молекулярный скрининг с использованием органелло-специфичных маркеров	30
3.2.4 Анализ родословных селекционных сортов	32
3.3 Молекулярно-генетический анализ старых советских селекционных сортов, созданных в период 1920 – 1960-х годов	34
3.3.1 Данные SSR-анализа старых отечественных селекционных сортов	34
3.3.2 Молекулярный скрининг старых советских селекционных сортов	38
3.4 SSR-анализ отечественного генофонда сортов картофеля (объединенной выборки советских сортов, созданных в первой половине XX века, и современных российских сортов)	39
3.5 Использование молекулярно-генетических паспортов номенклатурных стандартов в качестве контролей для проверки идентичности одноименных образцов в различных коллекциях и для выявления дублетов	41
3.5.1 Использование данных молекулярно-генетического паспортов номенклатурных стандартов для верификации образцов в <i>in vitro</i> коллекции ВИР	41
3.5.2 Сопоставление микросателлитных профилей номенклатурных стандартов и образцов сортов, полученных в рамках программы КПНИ_ЭГИ	43
3.5.3 Использование микросателлитных профилей номенклатурных стандартов для выявления дублетных образцов в коллекциях	44
3.6 Отбор старых гербарных образцов отечественных селекционных сортов картофеля, сохраняемые в Гербарии WIR	45
3.7 Использование данных ДНК-маркирования сортов для повышения результативности отбора перспективных селекционных клонов (межсортовых гибридов) с комплексом маркеров, ассоциированных с генами устойчивости к вредным организмам	45
ВЫВОДЫ	49
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	51
АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ - СПИСОК НАУЧНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ, НА КОТОРЫХ ДОКЛАДЫВАЛИСЬ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ	51

## АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) является одной из основных сельскохозяйственных культур и первой незерновой мировой культурой. По валовому сбору картофеля Российская Федерация занимает третье место в мире после Китая и Индии (FAOSTAT, 2021). Согласно литературным данным, в мире насчитывается более 7000 селекционных сортов (van Berloo et al, 2007). Общее число образцов селекционных сортов картофеля, сохраняемое во всех генбанках мира превышает 20 000 образцов (Nagel et al., 2022), большинство из которых дублируются в разных коллекциях. Наиболее крупные коллекции селекционных сортов картофеля сохраняются в генбанках ICAR-Central Potato Research Institute (CPRI) – 2952 образцов, в ВИРе – 2800 образцов, в IPK Gene Bank (GLKS) – 1943 образца (Nagel et al., 2022; FAO 2021) и др. В крупнейших генбанках генофонд селекционных сортов сохраняют в трех системах хранения – в полевой, *in vitro* и крио коллекциях. Поддержания таких коллекций довольно трудоемко, необходимо широкое использование эффективных методов регистрации и мониторинга сохраняемого генетического разнообразия, контроля подлинности и однородности сохраняемых образцов, которые в настоящее время в разных генбанках основаны на применении молекулярно-генетических подходов.

Последние два десятилетия для менеджмента коллекций в разных генбанках активно используют методы анализа высокополиморфных микросателлитных локусов. Высокая разрешающая способность SSR маркеров подтверждается исследованиями по генотипированию больших выборок сортов. Так, в работе Рейда с коллегами показана высокая разрешающая способность (99,5%) набора из 9 SSR-маркеров при анализе выборки из 892 образцов из генбанка IPK (Reid et al., 2011); в более поздней работе показано, что для однозначного различения 400 сортов достаточно набора из 6 SSR-маркеров (Reid, Kerr, 2007). Высокую популярность приобрел набор «Potato genetic identity kit» (PGI) (Ghislain et al., 2009), содержащий 24

монолокусных хромосомспецифичных SSR маркера. Этот набор широко использовался для изучения генетического разнообразия и генотипирования больших выборок образцов южноамериканских культурных видов картофеля (Ghislain et al., 2004, 2006, 2009; Gavrilenko et al., 2010; Lee et al., 2021). Различные комбинации данных маркеров активно используются для анализа генетического разнообразия и генотипировании зарубежных селекционных сортов (Есимсеитова и др., 2015; Присяжнюк и др., 2018; Tillault, Yevtushenko, 2019; Duan et al., 2019; Lee et al., 2021; Bhardwaj et al., 2023), отечественных селекционных сортов (Шилов, 2006; Антонова и др., 2016, 2020; Колобова и др., 2017; Клименко и др., 2020) и для выявления дублетов в коллекциях (Reid et al., 2011; Diekmann et al., 2017).

Для оценки генетического разнообразия генофонда селекционных сортов дополнительно используется информация о наличии/отсутствии маркеров, ассоциированных с генами, контролирующими селекционно-ценные признаки (Song et al 2005; Gebhardt et al., 2006; Mori et al., 2011; Asano, Tamiya, 2016; Gavrilenko et al., 2019; Антонова и др., 2016; Бирюкова и др., 2016, 2017; Гавриленко и др., 2018; Зотеева и др., 2017; Клименко и др., 2017, 2019; Воронкова и др., 2019).

Коллекция селекционных сортов картофеля, сохраняемая в ВИР им. Н.И. Вавилова, насчитывает более 2800 образцов (Косарева, 2022). Основная часть коллекции поддерживается в полевом генбанке ВИР. В ВИРе также развиваются современные методы сохранения и изучения генофонда селекционных сортов картофеля – формируются *in vitro*- и крио- коллекции и были начаты работы по генотипированию образцов этих коллекций с использованием различных ДНК маркеров (Гавриленко и др., 2006, 2018, 2019; Антонова и др., 2016, 2020; Клименко и др., 2020; Фомина и др., 2020б; Ефремова и др., 2020, 2023). В последние годы в ВИРе был предложен новый комплексный подход для сохранения идентифицированного генофонда отечественных сортов картофеля (Гавриленко, Чухина, 2020), основанный на

оформлении номенклатурных стандартов отечественных сортов в соответствии с Международным кодексом номенклатуры культурных растений (МКНКР) (International Code Of Nomenclature For Cultivated Plants) (Brickell et al., 2016), разработкой их молекулярно-генетических паспортов и сохранением генотипированных сортов в контролируемых условиях *in vitro* и крио коллекций. Данный подход был реализован на небольшой выборке сортов селекции ЛенНИИСХ «Белогорка» (Клименко и др., 2020). Настоящая работа является продолжением данных исследований.

## **ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Цель:** Использование методов ДНК-маркирования для молекулярно-генетической паспортизации образцов номенклатурных стандартов отечественных сортов картофеля и генотипирования коллекционных образцов с целью повышения эффективности менеджмента коллекций.

### **Задачи:**

1. Оформить номенклатурные стандарты отечественных сортов картофеля и гербарные ваучерные образцы перспективных селекционных клонов, созданных в различных селекционных центрах.
2. Провести молекулярно-генетическую паспортизацию отечественных сортов картофеля с использованием препаратов ДНК номенклатурных стандартов и ваучерных образцов, сохраняемых в коллекции Гербария WIR.
3. Провести генотипирование старых селекционных сортов, созданных в первой половине XX века.
4. С использованием SSR анализа провести верификацию дублетных образцов сортов, сохраняемых в полевой и *in vitro* коллекциях ВИР, а также в коллекциях различных селекционных центров; создать базы данных образцов генотипированных селекционных сортов, сохраняемых в контролируемых условиях в *in vitro* и крио- коллекциях ВИР.

5. Провести молекулярный скрининг сформированной экспериментальной выборки отечественных сортов разных периодов селекции с ДНК-маркерами, ассоциированными с генами, детерминирующими устойчивость к ряду вредных организмов.
6. Провести молекулярный скрининг потомства межсортовых гибридов и отобрать перспективные селекционные клоны с комплексом маркеров, ассоциированных с генами устойчивости к вредным организмам.

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

Впервые созданы номенклатурные стандарты российских сортов картофеля селекции ФИЦ картофеля им. А.Г. Лорха, Омского АНЦ и Сибирского НИИРС. Продемонстрирована эффективность совместного использования молекулярно-генетических и ботанических методов для создания идентифицированного генофонда отечественных сортов. На основе использования в качестве контролей генетических паспортов номенклатурных стандартов, достигнута высокая точность оценки идентичности и однородности дублетных образцов, сохраняемых в различных коллекциях. В результате проведенной нами работы были составлены базы данных аллельного состава 8 микросателлитных локусов в расширенной выборке отечественных сортов, сохраняемых в *in vitro* и крио- коллекциях ВИР. Разработанные в настоящей работе генетические паспорта сортов картофеля используются в программах по сохранению и изучению генетических ресурсов картофеля и в селекционных исследованиях.

Выборка *in vitro* образцов современных российских сортов картофеля генетически идентичных номенклатурным стандартам использована для реконструкции пангенома картофеля (Karetnikov et al., 2023).



Впервые методом SSR анализа изучено генетическое разнообразие расширенной выборки старых отечественных сортов картофеля, созданных в 1920 – 1960 годы.

Использование ДНК-маркеров в селекционных исследованиях таких полиплоидных культур как картофель, позволяет определить степень гетерозиготности локусов, контролирующих селекционно-ценные признаки, отобрать генотипы с комплексом маркеров R-генов и с разным уровнем гетерозиготности носителей доминантных аллелей (симплекс, дуплекс, триплекс) и тем самым сократить объемы анализируемых расщепляющихся популяций и удешевить селекционный процесс.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю д.б.н. Татьяне Андреевне Гавриленко за инициацию данных исследований и научное руководство.

Признательность за обучение, помощь в работе и оказанную поддержку автор выражает к.б.н. Ольге Юрьевне Антоновой, к.б.н. Наталье Станиславовне Клименко и Наталье Алексеевне Оськиной.

Автор искренне благодарит к.с.-х.н. Ефремову Ольгу Сергеевну, к.б.н. Чухину Ирену Георгиевну, д.б.н. Костину Людмилу Ильиничну., к.с.-х.н. Косареву Ольгу Сергеевну и д.с.-х.н. Новикову Любовь Юрьевну.

Автор благодарит за сотрудничество своих соавторов, а также коллег из отдела биотехнологии.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**2.1 Материал.** Экспериментальная выборка включала 156 селекционных сортов картофеля, представленных образцами из коллекции ВИР и образцами, полученными от авторов-селекционеров (440 препаратов ДНК из образцов сортов). Более подробная информация о составе выборки представлена ниже.

**2.1.1 Отечественные селекционные сорта картофеля разных периодов селекции из коллекции ВИР.** Из коллекции ВИР от кураторов полевых коллекций ОГРК и ПОС ВИР было получено 58 образцов старых селекционных сортов картофеля (созданных в период с 1920-х до 1960-х годов) отечественной селекции (Приложение 1).

**2.1.2 Современные сорта картофеля, выведенные в различных селекцентрах РФ.** Для оформления номенклатурных стандартов и создания молекулярно-генетических паспортов от селекционеров-авторов из восьми селекционных центров России были получены 85 образцов современных сортов и 15 образцов предсортов картофеля (Приложение 1).

В молекулярно-генетический анализ также были включены 15 предсортов, полученных от авторов-селекционеров; для этого материала также оформлялись гербарные ваучеры (Приложение 1).

Растительный материал для создания номенклатурных стандартов и гербарных ваучерных образцов передавался селекционерами в ВИР в соответствии с разработанным в ВИР протоколом (Гавриленко, Чухина, 2020).

**2.1.3 Дублетные образцы - образцы одноименных сортов, полученные из различных биоресурсных коллекций.** Тридцать шесть современных российских селекционных сортов были представлены разным числом дублетных образцов. При проведении SSR-анализа и в молекулярном скрининге были использованы дополнительные препараты ДНК, выделенные из одноименных образцов сортов, полученных из разных источников: полевой и *in vitro* коллекций ВИР, *in vitro* коллекции БЗСК (банк здоровых сортов

картофеля) ФИЦ картофеля им. А.Г. Лорха, *in vitro* коллекции СибНИИРС, из программы эколого-географических испытаний (ЭГИ) КПНИ (комплексный план научных исследований подпрограммы «Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации» (2016-2017 – из НПБ «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР», ВИР; 2018-2019 – из ВНИИКХ (ЭБ «Коренево»), ФИЦ картофеля им. А.Г. Лорха)).

**2.1.4 Старые гербарные образцы отечественных селекционных сортов картофеля, сохраняемые в Гербарии WIR.** Для анализа генетического разнообразия старых отечественных сортов картофеля (селекции первой половины XX века) нами был проведен анализ литературных данных и изучение старых гербарных образцов, сохраняемых в коллекции WIR. Совместно с сотрудниками отдела агроботаники и *in situ* сохранения генетических ресурсов растений в.н.с. Чухиной И.Г. и м.н.с. Лебедевой Н.В., и н.с. отдела биотехнологии к.б.н. Н.С. Клименко, был отобран растительный материал у 105 гербарных образцов из основного фонда WIR.

**2.1.5 Межсортовые гибриды Ленинградского НИИСХ «Белогорка» - филиал ФИЦ картофеля А.Г. Лорха.** Для повышения результативности традиционного селекционного отбора перспективных генотипов, был проведен MAS с маркерами R-генов устойчивости к разным болезням и вредителям для 112 межсортовых гибридов картофеля, полученных из ЛенНИИСХ «Белогорка» от ведущих селекционеров, сотрудников ЛенНИИСХ «Белогорка» - Н.М. Гаджиева и В.А. Лебедевой.

## 2.2 МЕТОДЫ

**2.2.1 Оформление номенклатурных стандартов и гербарных ваучеров.**

Оформление номенклатурных стандартов проводили в соответствии с положениями Международного кодекса номенклатуры культурных растений

(МКНКР) (Brickell et al., 2016). Растительный материал для оформления номенклатурных стандартов и гербарных ваучерных образцов передавался в ВИР их авторами - селекционерами из разных учреждений России, в соответствии с разработанным в ВИР протоколом (Гавриленко, Чухина, 2020) вместе с пакетом официальных документов: «Анкета сорта», «Описание селекционного достижения», «Оценка отличимости, однородности и стабильности», «Уведомление о приеме заявки» (для предсортов на ГСИ), а также «Авторское свидетельство» и «Патент».

При поступлении растительного материала в гербарную коллекцию выполняли описание и фоторегистрацию морфологических признаков побегов, соцветий, клубней и сопоставление их с признаками, указанными в официальных документах (Анкете сорта и/или Описании селекционного достижения) в соответствии с разработанным в ВИР протоколом (Гавриленко, Чухина, 2020). Гербаризацию растительного материала (побегов с соцветиями, венчиков, тонких срезов клубней и фрагментов кожуры клубней) проводили в соответствии с методическими указаниями «Гербаризация культурных растений» (Belozor, 1989). Перед гербаризацией небольшое количество растительного материала было использовано для выделения ДНК.

В случае, когда у переданных побегов отсутствовали соцветия или были увядшие цветки, эти признаки документировали у растений клубневых репродукций, выращенных из клубней, оставшихся после гербаризации. На этом материале проводили описание также и морфологических признаков световых ростков. Фотографии размещали на гербарных листах.

Оформленные номенклатурные стандарты были зарегистрированы в Гербарии WIR, после чего проводили их обнародование в виде публикации в научном журнале.

## **2.2.2 Генотипирование и создание молекулярно-генетических паспортов сортов картофеля**

В генетические паспорта включена информация о полиморфизме 8 монолокусных хромосомспецифичных SSR локусов, а также о наличии/отсутствии диагностических фрагментов 15 маркеров 11 генов устойчивости к вредным организмам, и о типах цитоплазм сортов. Описание методов SSR анализа и молекулярного скрининга приведено ниже.

**2.2.2.1 Выделение тотальной ДНК** проводили с использованием модифицированного метода СТАВ-экстракции (Gavrilenko et al., 2013; Антонова и др., 2020). Растительным материалом для выделения ДНК послужили – листья побегов, микрорастения, кожура клубней и световые ростки картофеля.

**2.2.2.2 ДНК маркеры**, использованные для генотипирования и паспортизации в данной работе приведены в Приложении 2.

Генотипирование с использованием SSR-маркеров было проведено для нескольких выборок, включающих: (а) 76 старых отечественных сортов селекции 1930х – 1960х годов из полевой коллекции ВИР; (б) 15 предсортов (находящихся сейчас на госсортоиспытании); (в) 6 сортов более раннего периода селекции, которые часто встречались в родословных отечественных сортов; (г) дублетные номенклатурным стандартам одноименные образцы сортов, полученные из различных источников.

Молекулярно-генетическая паспортизация проведена для верифицированной и документированной выборки, включавшей 75 современных сортов, переданных их авторами, для которых оформлялись номенклатурные стандарты.

В нашем исследовании изучался полиморфизм восьми SSR локусов (Приложение 2); из них шесть SSR маркеров входят в PGI набор (Ghislain et al., 2009), и по одному маркеру в наборы, разработанные Milbourne et al., 1998 и Feingold et al., 2005. Эти SSR локусы имеют высокие индексы полиморфизма

согласно литературным данным (Антонова и др., 2016, 2020; Колобова и др., 2017; Ghebreslassie et al., 2016; Bali et al., 2018; Duan et al., 2019).

Определение размеров ПЦР-продуктов на полученных изображениях гелей проводили при помощи пакета программ Saga2. Полученные размеры фрагментов у сортов сопоставляли с данными генотипирования образцов культурных видов картофеля (Supplementary material XLS 5903kb in Ghislain et al., 2009; Gavrilenko et al., 2010). Результаты генотипирования заносили в базу в формате MS Excel (Microsoft, США). Наличие фрагмента определенного размера регистрировали как «1», его отсутствие, соответственно, как «0». Для оценки полиморфизма микросателлитных локусов использовали индекс PIC (polymorphic index content), значения которого были рассчитаны по формуле:  $PIC = 1 - \sum p_i^2$ , где  $p_i$  – частота  $i$ -й аллели (Nei, 1973). Статистический анализ проведен в пакете Statistica 13.3. Кластерный анализ выполнен методом UPGMA (невзвешенный метод средней связи) (Боровиков, 2013), расстояние между образцами – процент несовпадений (Percent disagreement). Сравнение показателей полиморфизма локусов между выборками старых и современных сортов выполнено с использованием критерия Уилкоксона (Wilcoxon Matched Pairs Test).

**Молекулярный скрининг.** По литературным данным были подобраны CAPS- и STS- маркеры, ассоциированные с *R*-генами устойчивости к золотистой (*Globodera rostochiensis*) и бледной (*Globodera pallida*) цистообразующим картофельным нематодам, X и Y вирусам картофеля, а также фитофторозу (*Phytophthora infestans*) (Приложение 2).

По литературным данным также были подобраны CAPS-, STS- маркеры для определения типов цитоплазм сортов (Приложение 2).

**2.2.2.3 ПЦР** проводили в 96-луночных планшетах, в каждую лунку предварительно вносили по 4 мкл тотальной ДНК (концентрация 10 нг), а затем 16 мкл реакционной смеси содержащую, 1× реакционный буфер (Диалат, Россия), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Евроген, Россия), 0,5 mM каждого из dNTPs,

0,2 мкМ прямого и обратного праймера и 1 ед. Taq-полимеразы (Диалат, Россия). Условия проведения ПЦР соответствовали рекомендациям разработчиков праймеров. 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. В реакциях с SSR-маркерами дополнительно использовали флуоресцентную метку M13 (5'-CACGACGTTGTA AAAACGAC-3'), метки IRD700 и IRD800, реакцию проводили в 10 мкл реакционной смеси (общий объем 14 мкл).

**2.2.2.4 Рестрикцию** продуктов ПЦР проводили в соответствии с протоколами фирмы-изготовителя фермента (СибЭнзим, Россия), в 30 мкл реакционной смеси, реакция проходила не менее 8 часов.

**2.2.2.5 Электрофорез (1)** продуктов амплификации с маркерами разных типов цитоплазм и с маркерами *R*-генов устойчивости проводили в 2% агарозном геле, буфере 1×TBE, с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в УФ-свете (Bio-Rad, США). Для анализа подвижности фрагментов использовался маркер молекулярного веса (СибЭнзим, Россия); **(2)** разделение ПЦР-продуктов SSR-маркеров проводили в 8% денатурирующем полиакриламидном геле на приборе Li-Cor 4300S DNA Analyzer (licor.com, США). Маркером молекулярного веса служили маркеры фирмы Li-Cor «50-350 b.p.» (licor.com, США).

#### **2.2.2.6 Оформление генетических паспортов**

Микросателлитные профили, полученные при амплификации восьми пар SSR-праймеров, заносили в генетические паспорта сортов при условии совпадения результатов в нескольких вариантах постановки ПЦР с использованием 2 – 3 препаратов ДНК каждого сорта, независимо выделенных из растительного материала (побеги, клубни), переданного в Гербарий ВИР

авторами сортов. Для сортов селекции ВНИИКХ третий препарат ДНК был получен из ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН от д.б.н. Кочиевой Е.З.

В генетические паспорта также была занесена информация о наличии/отсутствии диагностических фрагментов 15 маркеров, ассоциированных с 10 генами устойчивости к вредным организмам и маркеров разных типов цитоплазм (Приложение 2).

Дополнительно к результатам молекулярно-генетического анализа в генетический паспорт также заносили информацию об учреждении, где был создан сорт, о годе внесения сорта в Госреестр, коде сорта в Госреестре, номере патента/дате его выдачи (у сортов, для которых оформлялся патент), об авторах сорта. Эти сведения были получены из официальных документов: «Авторских свидетельств», «Патентов», а также из «Государственного реестра селекционных достижений, допущенных к использованию» (URL: <https://reestr.gosortrf.ru/>).

### **2.3 Анализ идентичности и однородности одноименных образцов сортов картофеля из различных коллекций, выявление дублетных образцов**

Тридцать шесть сортов выборки были представлены разным числом дублетных образцов. Для всех образцов были получены препараты ДНК, которые были включены в анализ. С использованием этих препаратов был проведен анализ полиморфизма микросателлитных локусов и наличия/отсутствия маркеров R-генов. Данные ПЦР-анализа дублетных образцов соотносились с результатами, полученными на препаратах ДНК, выделенных из номенклатурных стандартов.

### **2.4 Введение образцов сортов в культуру *in vitro*, поддержание *in vitro* коллекции сортов; создание баз данных *in vitro* и криоколлекции ВИР**



В соответствии с рекомендациями FAO, коллекции сортов должны поддерживаться в трех системах хранения – полевой, *in vitro*, а также в криоколлекциях (FAO, 2014). В то же время реализация таких рекомендаций в полном объеме трудозатратна и требует больших финансовых и временных затрат, поэтому реализуется только в крупнейших генбанках мира (Перу, Германия, Япония) (Nagel et al., 2022). Исходя из этого, для комплексного сохранения (*in vivo*, *in vitro* и крио), отбирают, прежде всего, генетически идентифицированные образцы сортов.

В качестве источников эксплантов для введения в культуру *in vitro* использовали световые ростки клубней, переданных в ВИР селекционерами-авторами сортов с целью создания номенклатурных стандартов. Введение в культуру *in vitro* и поддержание образцов сортов в *in vitro* коллекции ВИР проводили согласно Методическим указаниям, разработанным в отделе биотехнологии ВИР (Дунаева и др., 2017).

Для образцов введенных в *in vitro* и крио- коллекции ВИР заполнялись базы данных в формате Excel (Microfoft, США), в которых вводили информацию о названии вида, названии сорта, интродукционном номере ВИР, номере постоянного каталога ВИР, уровне посткриогенной регенерации и публикации, в которой был опубликованы результаты.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1 Оформление номенклатурных стандартов и гербарных ваучеров

В таблице 3.1 представлены суммированные данные по оформлению и обнаружению номенклатурных стандартов современных российских сортов картофеля. Из восьми российских селекционных центров поступил растительный материал 75 сортов и 15 предсортов картофеля. Для всех образцов мы провели верификацию морфологических признаков (клубня, светового ростка, соцветия; всего 17 признаков), сопоставляя их с указанными в официальных документах, переданных авторами сортов («Анкета сорта», «Описание селекционного достижения», «Оценка отличимости, однородности и стабильности», «Уведомление о приеме заявки»). Для подавляющего числа сортов (96%) верификация морфологических признаков не выявила отличий от указанных в официальных документах. В единичных случаях были выявлены разночтения с официальными документами. Так, например, в Гербарий ВИР (WIR) поступил образец сорта Сигнал, имеющий желтую окраску кожуры клубней с желтым основанием глазков (в официальном документе для этого сорта отмечена частично красная кожура с красным основанием глазков). Образец сорта Садон, переданный в Гербарий ВИР (WIR) в 2019 году, имел красную кожуру и красные основания глазков клубней (в документах - желтая окраска кожуры с желтым основанием глазков). Поэтому данный растительный материал не был включен в последующую работу по оформлению номенклатурных стандартов. У образца сорта Фаворит, переданного в 2018 году, кожура клубней имела желтую окраску (в документах – красная кожура с красным основанием глазков); для сорта Фаворит мы запросили у авторов сорта повторную передачу растительного материала, признаки которого соответствовали официальным документам. Для данного сорта был оформлен и зарегистрирован номенклатурный стандарт (см. приложение 3).

Однако для сорта Вечерний Омск выявлена другая ситуация. При сравнении морфологических признаков - четкого проявления признака окраски кожуры клубня, которая в документах указана как «частично красная (светло-розовая)», не выявлено. Автор сорта Вечерний Омск (А.И. Черемисин), подтверждая подлинность переданного материала, объясняет это нестабильностью проявления у данного сорта этого признака.

Таким образом, верифицированный растительный материал (побеги и клубни) 65 современных российских сортов картофеля, переданных из восьми селекционных центров, соответствовал морфологическим признакам, указанным в официальных документах, и мог быть использован для оформления номенклатурных стандартов. Переданный растительный материал фотографировали, чтобы зафиксировать комплекс сортоспецифических признаков побега, соцветия, клубня и световых ростков. Окраску венчика отмечали в соответствии с цветовой палитрой RHS Colour Chart Edition V Fan 2. Фотографии размещали на гербарном листе (см. приложение 3).

Растительный материал с подтвержденным соответствием морфологических признаков, указанным в официальных документах, был гербаризирован и зарегистрирован в Гербарии WIR (см. приложение 3). К настоящему времени обнародованы номенклатурные стандарты 47 сортов селекции ФИЦ картофеля им. А.Г. Лорха, Сибирского НИИРС и Омского АНЦ (табл. 3.1). Для восьми сортов селекции УрФАНИЦ УРО РАН гербарные листы зарегистрированы в типовом фонде Гербария WIR и готовятся к обнародованию в научной публикации. Всем гербарным листам присвоены уникальные номера типового фонда WIR- (см. приложение 3) (табл. 3.1). Гербарные листы сортов, выведенные в Агробиотехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки, Камчатского НИИСХ, Ленинградского НИИСХ «Белогорка», в данный момент оформляются.

Все зарегистрированные гербарные листы номенклатурных стандартов и гербарных ваучеров сохраняются в типовом и основном фондах Гербария ВИР (WIR). Всем гербарным листам были присвоены уникальные номера (Приложение 3).

Таблица 3.1 - Номенклатурные стандарты и ваучерные образцы современных российских сортов (а также предсортов), переданных их авторами в Гербарий ВИР (WIR)

№	Растительный материал получен от:	Номенклатурные стандарты	Гербарные ваучеры	Результаты опубликованы в:
1	ФИЦ картофеля им. А.Г. Лорха	38	1	Рыбаков и др., 2020 Фомина и др., 2020а
2	КПНИ ЭГИ 2018 и КПНИ ЭГИ 2019	-	8	Фомина и др., 2020а
3	Сибирский НИИРС – филиал ФИЦ Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН	4	-	Фомина и др., 2020а
4	Омский аграрный научный центр	5	-	Рыбаков и др., 2022
5	ФГБНУ УрФАНИЦ УРО РАН	8*	1	Готовится публикация
6	ФНЦ Агробиотехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки	4*	8	
7	Камчатский НИИСХ	5*	0	
8	Ленинградский НИИСХ «Белогорка»	1*	5	
Всего:		65	23	Σ96

Десять зарегистрированных гербарных ваучеров российских предсортов сохраняются в основном фонде Гербария WIR. Для 14 предсортов селекции Агробиотехнологий Дальнего Востока, Ленинградского НИИСХ «Белогорка» в данный момент оформляются гербарные ваучеры, которые также будут зарегистрированы в основном фонде Гербария ВИР (WIR).

Новым направлением этой работы является регистрация отечественных сортов картофеля, созданных в 50-90-х годах XX века; в этих случаях не представляется возможным контактировать с авторами-селекционерами. Однако такая ситуация оговаривается в Международном кодексе номенклатуры культурных растений (МКНКР) (Brickell et al., 2016); в таких случаях растительный материал для создания номенклатурных стандартов

может быть получен от ведущих специалистов по культуре. При выборе сортов мы советовались с такими специалистами, а также опирались на данные из литературных источников. Выбранные старые сорта представляют большой интерес, поскольку они участвовали в создании большого числа сортов отечественной селекции. К ним относятся: (Зарево (к-10773), Кореневский (к-753), Лорх (к-766), Приекульский ранний (к-1050), Ресурс (к-11663), Свитанок киевский (к-11665), Смена (к-10146), Эффект (к-12178)); растительный материал этих восьми сортов был получен от ведущего специалиста по сортам картофеля в России - д.б.н., почетного профессора ВИР Костиной Л.И. и куратора коллекции сортов ВИР к.с.-х.н. Косаревой О.С. Часть из них по результатам анализа родословных и по литературным данным являются «эффективными опылителями», т.е. сортами, которые часто использовали в качестве опылителей в селекционном процессе, например: Приекульский ранний, который участвовал в создании более 33 отечественных сортов, Зарево - более 16 сортов, Смена - около десяти сортов (Симаков и др., 2005; Складорова и др., 2008; Костина, Косарева, 2017). Для этих сортов номенклатурные стандарты и гербарные ваучеры оформлялись по тому же протоколу, в данный момент зарегистрированы в типовом и основном фондах Гербария ВИР (WIR). Для широкого ознакомления с результатами. Готовится статья для их обнародования. Таким образом, с учетом этих восьми отечественных сортов, мы провели оформление и обнародование номенклатурных стандартов для 55 современных отечественных сортов картофеля и одного гербарного ваучера для одного предсорта. Для 18 сортов и 14 предсортов в настоящее время продолжается оформление номенклатурных стандартов и гербарных ваучеров.

**3.2 Молекулярно-генетическая паспортизация современных российских сортов картофеля и генотипирование перспективных селекционных клонов с использованием препаратов ДНК номенклатурных стандартов и ваучерных образцов**

Молекулярно-генетическую паспортизацию на основе результатов SSR-анализа проводили для верифицированной и документированной выборки, включавшей 75 современных сортов (Приложение 1). В SSR генотипировании участвовали 15 предсортов, находящихся в настоящее время на госсортоиспытании (Приложение 1). Девяносто образцов этой выборки были созданы в период 1990 – 2022 гг., далее данная выборка обозначена как ‘современные российские сорта и предсорта картофеля’.

Важно отметить, что для каждого из этих 75 сортов и 15 предсортов имеются подписанные авторами акты передачи, пакеты официальных документов, для каждого из этих образцов нами была проведена верификация морфологических признаков (см. выше) и для каждого из этих 75 сортов и 15 предсортов был оформлен номенклатурный стандарт или гербарный ваучер (табл. 3.1). Каждый из 75 сортов и 15 предсортов в молекулярно-генетическом анализе был представлен 2 – 3 независимо выделенными препаратами ДНК (см. Материалы и методы).

### 3.2.1 Оценка уровня полиморфизма SSR-локусов в современном российском генофонде сортов картофеля.

В Таблице 3.2 приведены суммарные данные об уровне полиморфизма восьми хромосомспецифичных SSR-локусов в выборке, включающей 75 современных российских сортов и 15 предсортов картофеля,

Таблица 3.2 – Характеристика полиморфизма восьми SSR-локусов в выборке 75 современных российских сортов и 15 предсортов картофеля

№ п/п	SSR-локус	PIC	Размер аллельных фрагментов		Число ненулевых аллелей	Для изученной выборки число	
			Min	Max		редких аллелей (менее 5%)	уникальных аллелей
1	STG0016	0,766	117	153	9	3	2
2	StI004	0,768	64	103	8	2	1
3	StI032	0,802	109	130	8	0	2
4	StI033	0,787	113	137	9	4	0
5	StI046	0,849	179	218	11	3	1
6	STM0037	0,824	72	92	10	3	1
7	STM2005	0,703	148	190	4	0	0

№ п/п	SSR-локус	PIC	Размер аллельных фрагментов		Число ненулевых аллелей	Для изученной выборки число	
			Min	Max		редких аллелей (менее 5%)	уникальных аллелей
8	STM5114	0,721	280	304	7	0	2
Итого:					<b>65</b>	<b>14</b>	<b>8</b>

В совокупности с восемью проанализированными микросателлитными локусами были амплифицированы 65 фрагментов размером от 72 п.н. (STM0037) до 304 (STM5114). Число аллелей в изученных SSR-локусах варьировались от четырех (STM2005) до одиннадцати (StI046). Индекс полиморфизма (PIC) варьировал от 0,702 (min) до 0,843 (max) для локусов STM2005 и StI046, соответственно (табл. 3.2).

При анализе полиморфизма микросателлитных локусов мы также отмечали частоту редких аллелей (с встречаемостью в выборке менее 5%) и уникальных аллелей для анализируемой выборки (табл. 3.2). Число редких аллелей варьировало от нуля (StI032, STM2005, STM5114) до четырех (StI033); число уникальных аллелей от нуля (StI004) до двух (STG0016, StI032, STM5114). Уникальные аллели для данной выборки обнаружены в шести локусах – STG0016, StI032, StI046, STM037, STM2005, STM5114 (табл. 3.3).

Таблица 3.3 – Уникальные и редкие аллели, выявленные у 75 сортов и 15 предсортов российской селекции

№ п/п	Локус	Аллель	Встречаемость в выборке	Сорта/предсорта
1	STG0016	STG0016_120	уникальный	Казачок
2		STG0016_141	уникальный	Василек
3		STG0016_129	редкий	Алена, Аляска, Арго, Метеор, Пламя, Розовый чародей, Северное сияние, Третьяковка, Фиолетовый
4		STG0016_150	редкий	Алена, Былина Сибири, Хозяюшка
5	StI004	StI004_64	уникальный	Голубизна
6		StI004_73	редкий	Алена, Памяти Рогачева, Терра, при-16-09-2
7		StI004_103	редкий	Василек, Фиолетовый
8	StI032	StI032_115	уникальный	Дебют
9		StI032_130	уникальный	Северянин
10	StI033	StI033_116	редкий	Арлекин, Фиолетовый, Эликсред
11		StI033_122	редкий	Дебют, Солнышко, Утро
12		StI033_128	редкий	Бабушка, Дебют, Посейдон

№ п/п	Локус	Аллель	Встречаемость в выборке	Сорта/предсорта
13		StI033_137	редкий	Былина Сибири, Зарево, Памяти Рогачева, Русский сувенир, Хозяюшка, Эликсред
14	StI046	StI046_218	уникальный	Русский сувенир
15		StI046_179	редкий	Арго, Моряк, Нальчикский, Розовый чародей, Северянин, Шах, 415/6
16		StI046_182	редкий	Ирбитский, Кореневский, Краса Мещеры, Лорх, Терра, Шах, при-16-02-4
17		StI046_185	редкий	Златка, Триумф
18	STM0037	STM0037_90	уникальный	415/6
19		STM0037_76	редкий	Багира, Кемеровчанин, Солнечный, Танай
20		STM0037_82	редкий	Златка, Эликсред
21		STM0037_93	редкий	Краса Мещеры, Нальчикский, при-17-05-4
22	STM5114	STM5114_283	уникальный	Люкс
23		STM5114_301	уникальный	Накра
7 локусов		9 уникальных 14 редких аллелей		68 образцов

Редкий аллель StI033\_137 был обнаружен у сортов Былина Сибири, Памяти Рогачева, Хозяюшка, и у советского сорта Зарево, который участвовал в выведении данных сортов, поэтому мы предполагаем, что именно сорт Зарево передал своим потомкам этот редкий аллель (табл. 3.3). Редкий аллель StI033\_137 был обнаружен у сортов Былина Сибири, Памяти Рогачева, Хозяюшка, и у советского сорта Зарево, который участвовал в выведении данных сортов, поэтому мы предполагаем, что именно сорт Зарево передал своим потомкам этот редкий аллель (табл. 3.3).

Результаты приведённого нами кластерного анализа (с использованием невзвешенного метода средней связи - UPGMA) также показали отсутствие четкой кластеризации сортов, созданных в одном и том же селекционном центре (рис. 3.1).

Важно отметить, что каждый из проанализированных образцов в выборке современных сортов и предсортотв имел свой уникальный профиль (рис. 3.1), на основании чего можно сделать вывод об эффективности использования данного набора маркеров для генотипирования образцов в коллекциях генбанков и различения сортов в селекционных программах.



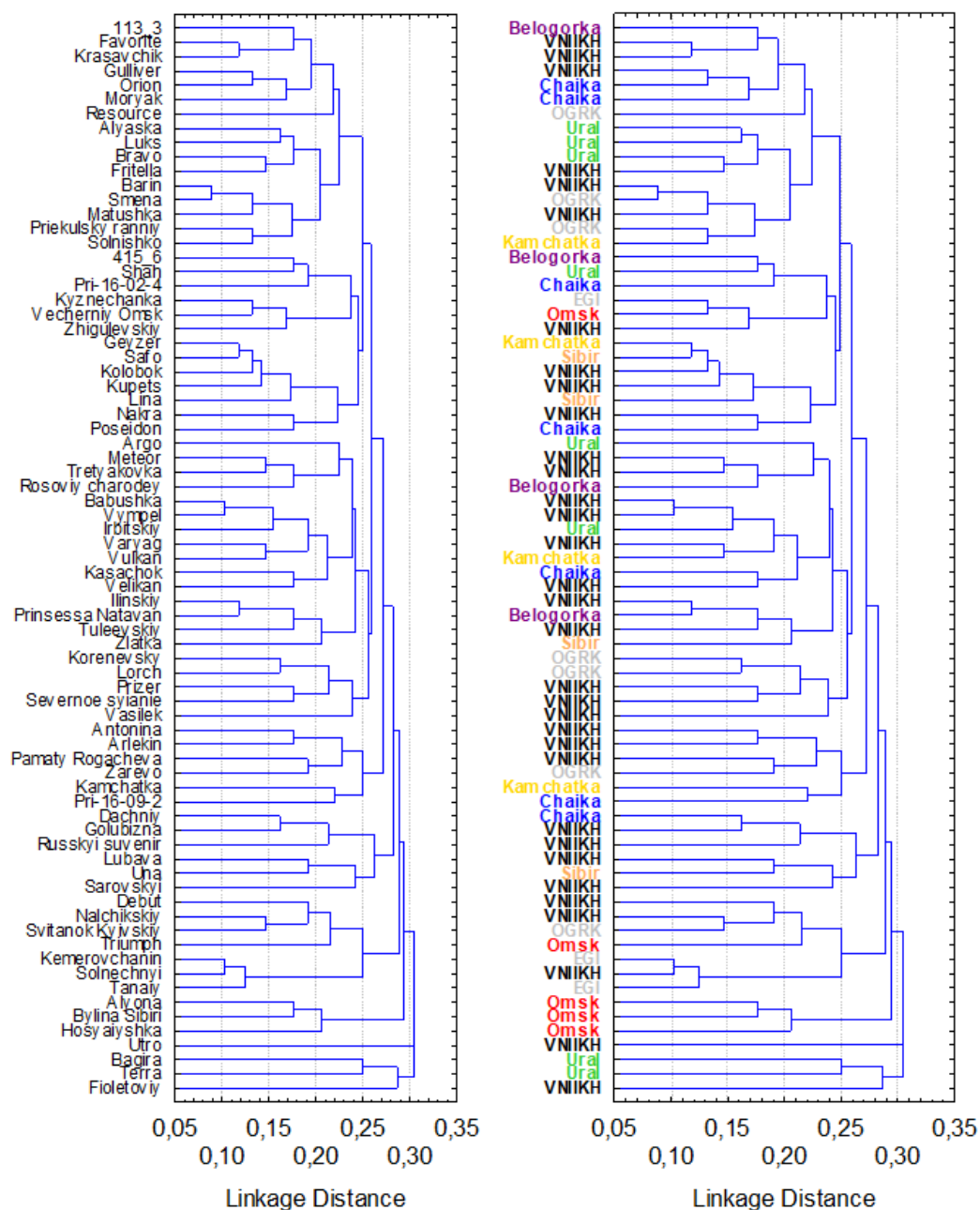


Рисунок 3.1 – Кластеризация современных селекционных сортов и предсортов картофеля по 8 SSR-локусам с использованием метода кластеризации – UPGMA. Цветом обозначены оригинаторы сортов, серым цветом – 6 советских сортов, часто использованных в отечественной селекции, полученных из ОГРК и три образца полученные из КПНИ ЭГИ.

В кластерном анализе помимо современных сортов участвовали и шесть советских сортов, которые часто использовались в отечественно селекции. Четкой кластеризацией этих сортов с их потомками не выявлено, что объясняется активным вовлечением этих сортов в селекцию и недостаточно

подробной информацией родословных, предоставленных для большинства сортов.

Данные об аллельном составе 8 SSR-локусов были занесены в молекулярно-генетические паспорта 75 современных российских сортов генетически идентичных номенклатурным стандартам (Приложение 3). Суммарные результаты, проведенной молекулярно-генетической паспортизации, представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Разработанные молекулярно-генетические паспорта современных российских селекционных сортов и данные о SSR-генотипированию предсортот картофеля, созданных в различных селекцентрах РФ

№	Растительный материал получен от:	Генетические паспорта сортов	SSR профили предсортот	Результаты опубликованы в:
1	ФИЦ картофеля им. А.Г. Лорха	37	1	Рыбаков и др., 2020 Фомина и др., 2020а
2	КПНИ ЭГИ 2018 и КПНИ ЭГИ 2019	3	-	Фомина и др., 2020а
3	Сибирский НИИРС – филиал ФИЦ Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН	4	-	Фомина и др., 2020а
4	Омский аграрный научный центр	5	-	Рыбаков и др., 2022
Всего:		49	1	
5	ФГБНУ УрФАНИЦ УРО РАН	8*	1	Готовится публикация
6	ФНЦ Агробиотехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки	4*	8	
7	Камчатский НИИСХ	5*	0	
8	Ленинградский НИИСХ «Белогорка»	1*	5	
9	Отдел генетических ресурсов картофеля	8*		
Всего:		75	15	Σ90

**3.2.2 Маркеры R-генов устойчивости к вредным организмам у современных российских сортов и предсортот картофеля.** В качестве дополнительной характеристики российских сортов генетический паспорт (помимо аллельного состава SSR-локусов) был дополнен результатами проведенного нами молекулярного скрининга, в котором были использованы маркеры, ассоциированные с генами, контролирующими устойчивость к PVY,

PVX, фитофторозу, золотистой и бледной цистообразующим картофельным нематодам. В паспорта вносили данные о наличии/отсутствии диагностических фрагментов *R*-генов устойчивости к болезням и вредителям (Приложение 3).

В настоящее время селекционные исследования, направленные на создание новых сортов картофеля, включают маркер-опосредованный отбор (MAS) с применением ДНК-маркеров, ассоциированных с генами/QTL, детерминирующими признаки устойчивости. Использование MAS особенно актуально для объектов внутреннего и внешнего карантина, работа с которыми сопряжена с большими ограничениями. Приоритетным направлением российской селекции является создание новых сортов, устойчивых к патотипу Ro1 ЗКН, широко распространенному на территории нашей страны (Khiutti et al., 2017; Mironenko et al., 2020). В современных селекционных программах активно используется молекулярный скрининг с маркерами генов устойчивости к патотипу Ro1 ЗКН (Birjukova et al., 2008; Antonova et al., 2016; Klimenko et al., 2017; Pakul et al., 2019).

Результаты проведенного нами молекулярного скрининга показали, что почти половина образцов проанализированной выборки современных сортов (46 из 90, или 51%) имели маркеры гена *H1*, контролирующего устойчивость к ЗКН (Ro 1) (табл. 3.5).

Только у трех сортов (5,5%) в изученной выборке выявлен другой ген, вовлеченный в контроль устойчивости к ЗКН патотипу Ro1 – ген *Gro1-4* (Гранд, Дебют, Пламя). Таким образом, мы подтвердили литературные данные (Birjukova et al., 2008; Antonova et al., 2016; Klimenko et al., 2017) о редкой встречаемости гена *Gro1-4* в отечественном генофонде сортов картофеля.

Таблица 3.5 – Молекулярный скрининг выборки современных отечественных сортов при помощи маркеров, ассоциированных с геном *H1* устойчивости к золотистой цистообразующей картофельной нематоде.

Сорта картофеля, участвовавшие в молекулярном скрининге R – устойчивые к ЗКН по данным Госреестра, S – восприимчивые к ЗКН по данным Госреестра * по данным селекционного центра	Ген <i>HI</i>	
	Маркер	
	57R	N195
<b>Нет данных о нематодоустойчивости (N=11):</b> Багира, Орион, Посейдон, Принцесса Натаван, 415/6, 614/4, при-16-02-4, при-16-09-2, при-16-13-2, при-17-05-1, при-17-05-4	+	+
<b>Нет данных о нематодоустойчивости (N=10):</b> Зарево, Корневский, Приекульский Ранний, Свитанок Киевский, Смена, Северянин, Моряк, Эликсред, 113/3, 211/1,	-	-
<b>R (N=27)</b> Аляска, Арго, Браво, Вечерний Омск, Вымпел, Гранд, Гейзер*, Гулливер, Дебют, Ирбитский, Кемеровчанин, Краса Мещеры, Крепыш, Легенда, Люкс, Метеор, Пламя, Саровский, Сафо, Северное сияние, Танай, Терра, Третьяковка, Тулеевский, Хозяюшка, Шах, Юна	+	+
<b>S (N=33)</b> Алена, Антонина, Арлекин, Бабушка, Барин, Былина Сибири, Варяг, Василек, Великан, Голубизна, Дачный, Златка, Ильинский, Казачок, Колобок, Красавчик, Кузнечанка, Купец, Лорх, Любава, Матушка, Накра, Нальчикский, Призер, Ресурс, Розовый чародей, Русский сувенир, Солнышко, Триумф, Утро, Фиолетовый, Фрителла, Эффект	-	-
<b>S (N=5):</b> Вулкан, Жигулевский, Памяти Рогачева, Лина, Солнечный	+	+
<b>R (N=1):</b> Фаворит	-	-
<b>S (N=3)</b> Камчатка, Смак, Янтарь	+	н/д
Итого: общее число сортов - 90 Устойчивых сортов с маркерами – 27 (30%) Сортов с маркерами, но без данных Госреестра – 11 (12,2%) Неустойчивых сортов без маркеров – 33 (36,6%) Сортов без маркеров и без данных Госреестра – 10 (11,1%) Сорта, для которых выявлены несовпадения – 6 (6,6%) Сорта, для которых продолжается изучение – 3 (3,33%)		

При проведении госсортоиспытаний (ГСИ) оценивается нематодоустойчивость сортов, данные публикуются в открытом доступе (Госреестр селекционных достижений), поэтому данные этой фитопатологической оценки можно сопоставить с полученными результатами молекулярного скрининга. Для 60 сортов данные о наличии/отсутствии маркеров гена *HI* и фитопатологической оценки устойчивости/восприимчивости совпали (табл. 3.5). Для 21 образца нет данных об уровне их нематодоустойчивости. Для небольшого числа сортов отмечено несовпадение данных. Например, для сорта Вулкан с маркерами гена

*H1*, в брошюре Камчатского НИИСХ, указано, что он слабо поражаем ЗКН Ro1 (Камчатский НИИСХ картофель, 2022). У неустойчивого к ЗКН (по данным Госреестра) сорта Жигулевский были детектированы маркеры гена *H1*. Напротив, у устойчивого к ЗКН (по данным Госреестра) сорта Фаворит маркеры этого гена отсутствовали, что согласуется с данными его родословной (Удача × Романо (1313-103) – оба родителя неустойчивы к ЗКН по данным Госреестра).

Примерно у трети образцов в выборке современных сортов и предсортот выявлены маркеры генов *R1* и *R3a*, контролирующие расоцспецифическую устойчивость к фитофторозу, которые встречались у 38% и 36% изученных проанализированных сортов, соответственно (табл. 3.6).

Относительно редко встречались маркеры генов, контролирующих устойчивость к наиболее вредоносным вирусам PVY и PVX. Так, у 11% сортов выявлены маркеры генов *Rysto/Ry-fsto* и у 5% - маркер гена *Ryadg*, детерминирующих устойчивость к PVY (табл. 3.6). Маркеры 1Rx1 и 5Rx1 гена *Rx1*, контролирующего устойчивость к вирусу PVX, встречались у 12,7% образцов. Маркер RYSC3 гена *Ryadg*, контролирующего устойчивость к PVX был детектирован только у трех сортов выборки - Барин, Голубизна, Фрителла селекции ФИЦ картофеля им. А.Г. Лорха (табл. 3.6).

Из 90 современных российских сортов и предсортот у 82 в молекулярном скрининге выявлены те или иные маркеры *R*-генов устойчивости. На настоящий момент у 90% образцов изученной выборки выявлены маркеры *R*-генов устойчивости, что отражает основные тенденции в селекции отечественных сортов. По литературным данным, эти гены были интродуцированы в селекционный генофонд от различных диких и культурных видов в процессе межвидовой гибридизации.

Только у восьми сортов изученной выборки (Арлекин, Бабушка, Варяг, Василек, Матушка, Русский сувенир, Фиолетовый, Триумф) не было выявлено ни одного маркера *R*-генов устойчивости, использованных в нашей работе.

Таблица 3.6 - Встречаемость маркеров *R*-генов устойчивости к вредным организмам среди изученных нами современных селекционных сортов и перспективных селекционных клонов картофеля

Вредный организм	Ген	Маркер	Встречаемость в выборке, %
PVY	<i>Rysto/Ry-fsto</i>	YES3-3A	11%
		YES3-3B	11%
		GP122 406/EcoRV	11%
	<i>Ryadg</i>	RYSC3	5,5%
PVX	<i>Rx1</i>	1Rx1	12,7%
		5Rx1	12,7%
<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Rpi-sto1</i> , <i>Rpi-blb1</i>	Rpi-sto1	2%
		BLB1F/R	2%
	<i>R1</i>	R1	38%
	<i>R3a</i>	RT-R3a	36%
<i>G. pallida</i> (Pa2,3)	<i>Gpa2</i>	Gpa2-2	5,5%
Изученная выборка = 55*			

\* актуальное число сортов, проанализированных с этими маркерами к настоящему времени

Полученные в результате молекулярного скрининга данные о наличии/отсутствии диагностических фрагментов 15 маркеров, ассоциированных с 11 *R*-генами устойчивости к различным заболеваниям картофеля, были включены в молекулярно-генетические паспорта (см. приложение 3).

### 3.2.3 Молекулярный скрининг с использованием оргanelло-специфичных маркеров

В таблице 3.7 и на рисунках 3.2, 3.3 приведены результаты молекулярного скрининга, проведенного с использованием маркеров из набора К. Хосака и Р. Санетомо (Hosaka, Sanetomo, 2012), специфичных к различным локусам пластидной и митохондриальной ДНК.

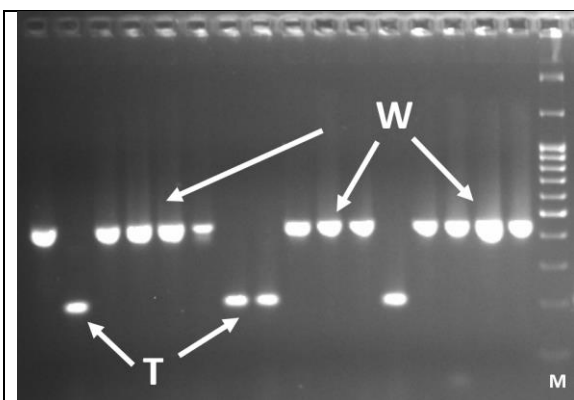


Рисунок 3.2 - Определение типа хлДНК при помощи маркера Н1  
Примечание: делеция 241 п.н. в ПЦР-продукте: Т тип хлДНК

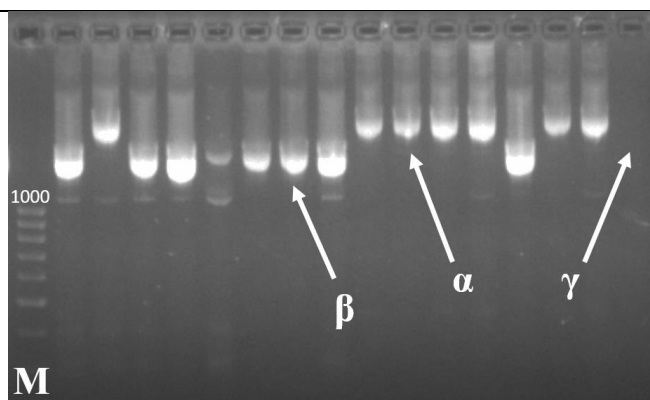


Рисунок 3.3 - Определение типа мтДНК при помощи маркера ALM4/5  
Примечание: ПЦР-продукт 2400 п.н. - α тип мтДНК; 1600 п.н. - β тип мтДНК; нет ПЦР продукта - γ тип мтДНК

Согласно полученным результатам, большая часть проанализированных современных сортов имела D (W/α) тип цитоплазмы, который, согласно литературным данным, был интрогрессирован в селекционный генофонд от дикого мексиканского вида *S. demissum*.

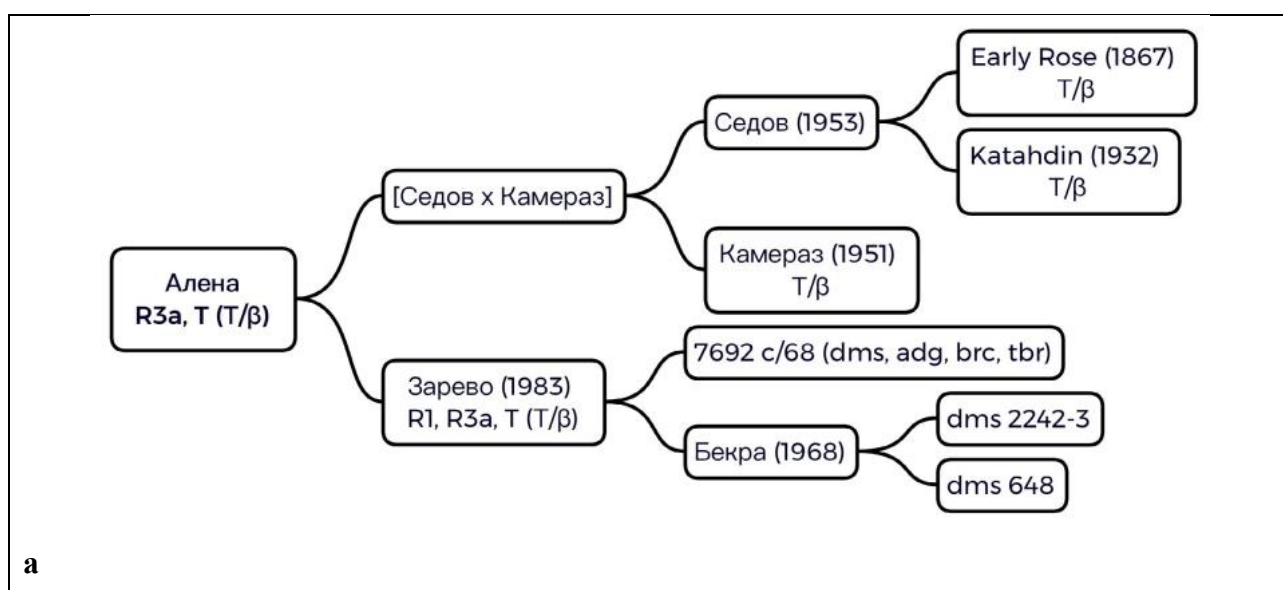
Таблица 3.7 - Встречаемость различных типов цитоплазм среди выборки современных отечественных сортов

Сорта и предсорта картофеля	Процент от всей выборки
<p><b>Сорта с D (W/α) типом цитоплазмы (N=48)</b> Аляска, Арго, Арлекин, Бабушка, Барин, Браво, Былина Сибири, Варяг, Вечерний Омск, Вымпел, Гейзер, Дачный, Дебют, Жигулевский, Златка, Ирбитский, Камчатка, Кемеровчанин, Краса Мещеры, Крепыш, Кузнечанка, Любава, Матушка, Моряк, Нальчикский, Орион, Посейдон, Призер, Принцесса Натаван, Розовый чародей, Саровский, Свитанок киевский, Танай, Третьяковка, Триумф, Тулеевский, Утро, Фаворит, Фрителла, Эффект, Юна, 113/3, 211/1, 614/4, при-16-02-4, при-16-13-2, при-17-05-1, при-17-05-4</p>	54,5%
<p><b>Сорта с T (T/β) типом цитоплазмы (N=33)</b> Алена, Антонина, Багира, Василек, Великан, Вулкан, Голубизна, Зарево, Казачок, Корневский, Красавчик, Купец, Легенда, Лина, Лорх, Люкс, Памяти Рогачева, Приекульский ранний, Русский сувенир, Сафо, Северное сияние, Северянин, Смак, Смена, Солнечный, Солнышко, Терра, Фиолетовый, Хозяюшка, Шах, Янтарь, 415/6, при-16-09-2</p>	37,5%
<p><b>Сорта с W/γ типом цитоплазмы (N=7)</b> Гранд, Ильинский, Колобок, Метеор, Накра, Пламя, Ресурс</p>	8%
Итого: N=88. D (W/α) – 54,5%; T (T/β) – 37,5%; W/γ – 8%	

Чилийский тип цитоплазмы, который типичен для старых селекционных сортов, выведенных в XIX-XX веках, встречался только у 35% современных селекционных сортов картофеля. Тип цитоплазмы W/γ встречался только у 8% сортов проанализированной выборки; этот тип цитоплазмы был интрогрессирован в селекционный генофонд в 1970-1980-х годах от дикого мексиканского вида *S. stoloniferum*.

### 3.2.4 Анализ родословных селекционных сортов

Полученные нами данные молекулярно-генетических паспортов сортов также были сопоставлены с их родословными и с данными литературы, что позволило установить источники разных типов цитоплазм, а также источники генов устойчивости к вредным организмам. Пример такого анализа приведен на рисунке 3.4 для сортов селекции Омского АНЦ.





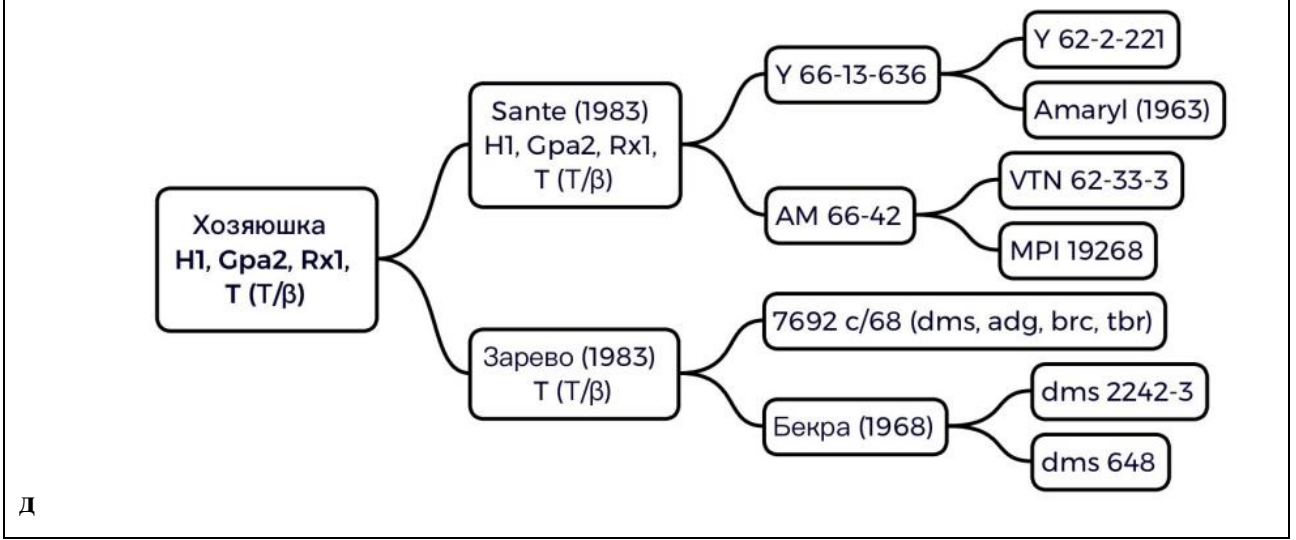
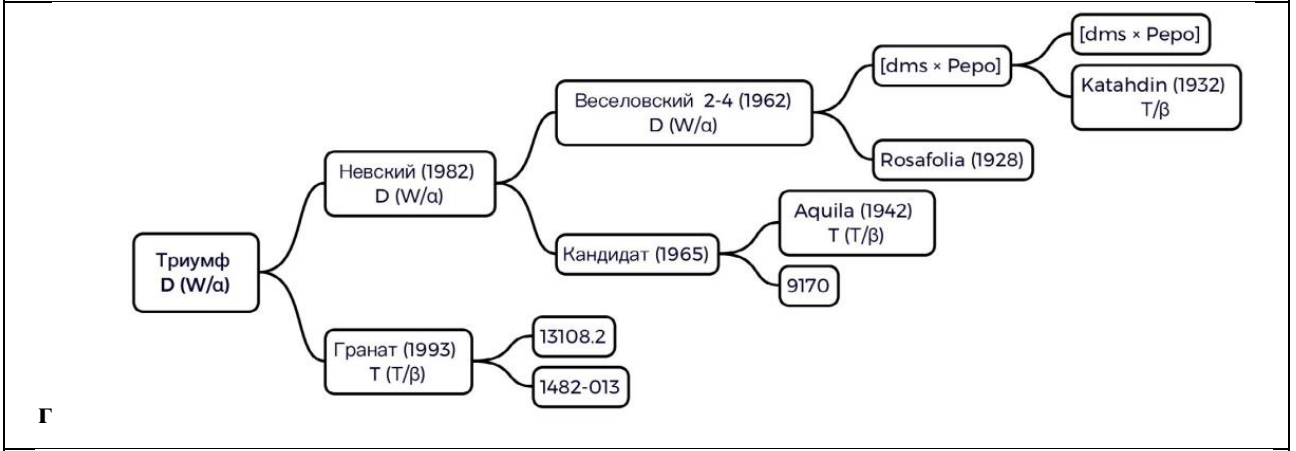
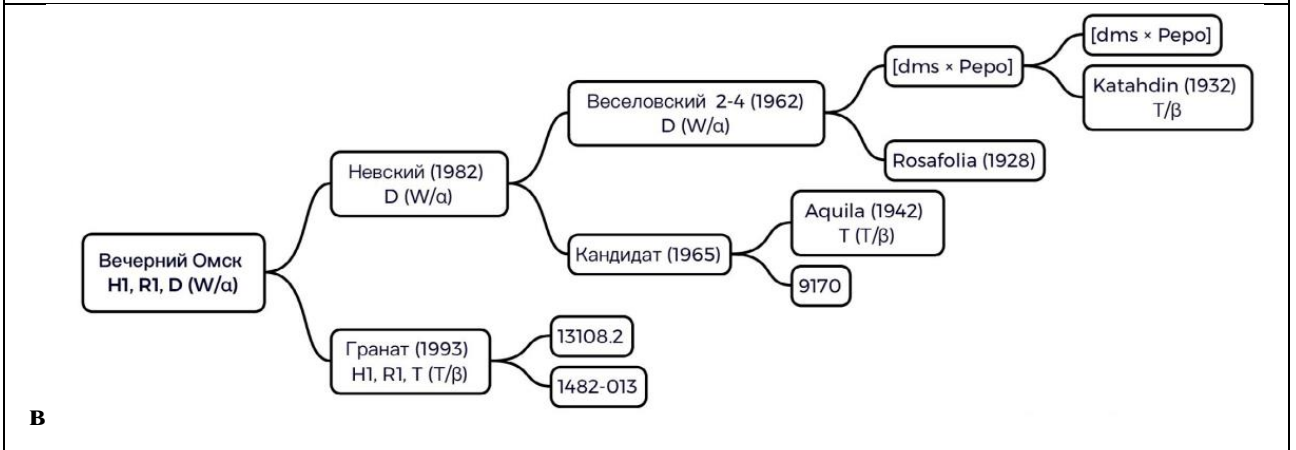
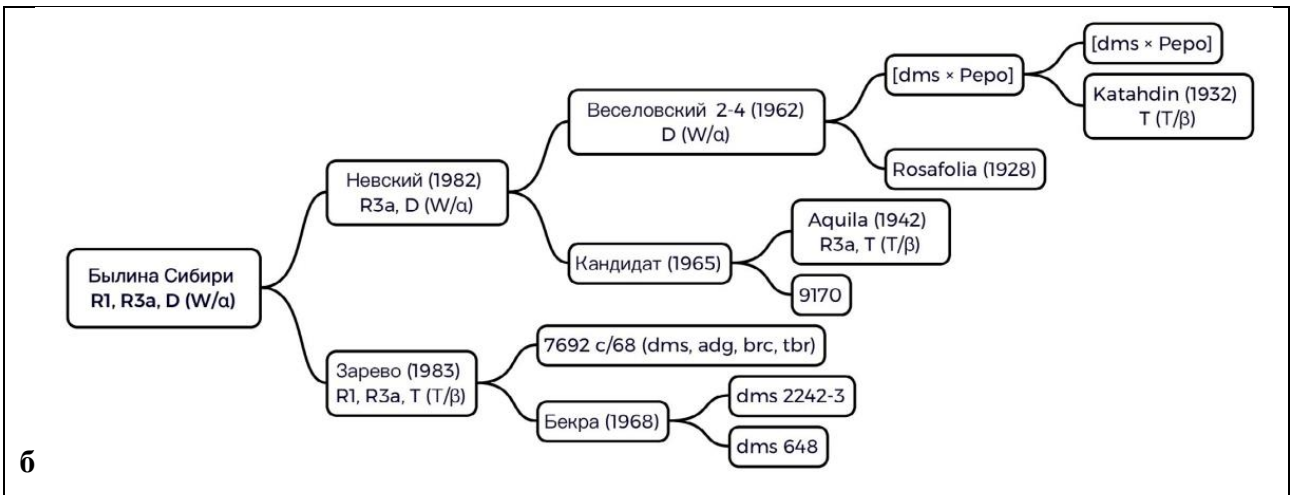


Рисунок 3.4 – Родословные сортов селекции Омского АЦН.

(а) Алена, (б) Былина Сибири, (в) Вечерний Омск, (г) Триумф, (д) Хозяюшка

Установлено, что сорта Былина Сибири, Вечерний Омск и Триумф получили D-тип цитоплазмы от общей материнской формы (♀) – сорт Невский, для которого тип цитоплазмы был определен ранее (Gavrilenko et al., 2018) (рис. 3.4 б, в, г). В свою очередь, сорту Невский D-тип цитоплазмы был передан от сорта Веселовский 2-4, который по материнской линии происходит от межвидового гибрида *S. demissum* Lindl. × *S. tuberosum*, сорт Перо (Костина, Косарева, 2017). Эта информация согласуется с данными литературных источников, указывающими на то, что дикий мексиканский вид *S. demissum* является донором D-типа цитоплазмы в мировом селекционном генофонде картофеля (Sanetomo, Hosaka, 2011; Hosaka, Sanetomo, 2012). Источником T/β типа цитоплазмы омского сорта Хозяюшка является голландский сорт ♀ Sante (Sanetomo, Gebhardt, 2015) (рис. 3.4 д). По данным селекционера (А.И. Черемисин) материнской формой сорта Алена является гибрид (Седов × Камераз), для сорта Седов тип цитоплазмы не известен (рис. 3.4 а). В то же время, материнской формой сорта Седов является Early Rose, для которого T (T/β) тип был установлен рядом авторов (Hosaka, 1986; Гавриленко и др., 2007; Sanetomo, Gebhardt, 2015).

Сопоставление данных молекулярного скрининга с родословными сортами и данными литературы также позволило установить источники *R*-генов устойчивости омских сортов, которые обозначены на приведенной выше схеме родословных сортов (рис. 3.4).

### **3.3 Молекулярно-генетический анализ старых советских селекционных сортов, созданных в период 1920 – 1960-х годов**

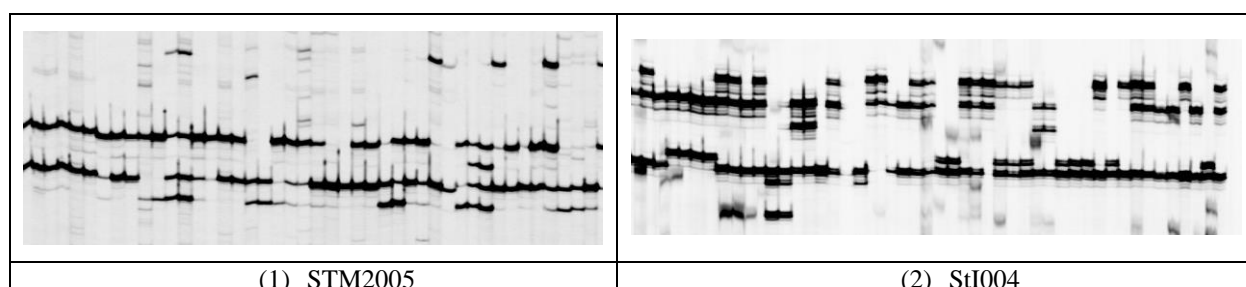
#### **3.3.1 Данные SSR-анализа старых отечественных селекционных сортов**

В таблице 3.8 и на рисунке 3.5 представлены результаты анализа полиморфизма тех же восьми SSR-локусов во второй выборке, включающей 49 старых советских селекционных сортов, созданных в 1920 – 1960-х годах, полученных из полевой коллекции ВИР. В совокупности в восьми проанализированных микросателлитных локусах было выявлено 57 фрагментов размером от 64 п.н. (StI004) до 304 (STM5114).

Таблица 3.8 – Характеристика полиморфизма восьми SSR-локусов в выборке старых отечественных сортов картофеля из коллекции ВИР

№ п/п	Локус	PIC	Размер аллельных фрагментов		Число ненулевых аллелей	Для изученной выборки число	
			Min	Max		редких аллелей (менее 5%)	уникальных аллелей
1	STG0016	0,779	117	153	8	2	1
2	StI004	0,746	64	103	8	1	2
3	StI032	0,784	109	127	6	1	0
4	StI033	0,743	113	134	6	1	0
5	StI046	0,803	179	206	10	4	1
6	STM0037	0,822	72	92	8	0	2
7	STM2005	0,646	148	190	5	2	0
8	STM5114	0,711	280	304	6	1	1
Итого:					<b>57</b>	<b>12</b>	<b>7</b>

Число аллелей в изученных локусах варьировало от пяти (STM2005) до десяти (StI046). Индекс полиморфизма (PIC) варьировал от 0,646 до 0,822 для локусов STM2005 и STM0037, соответственно (табл. 3.8).



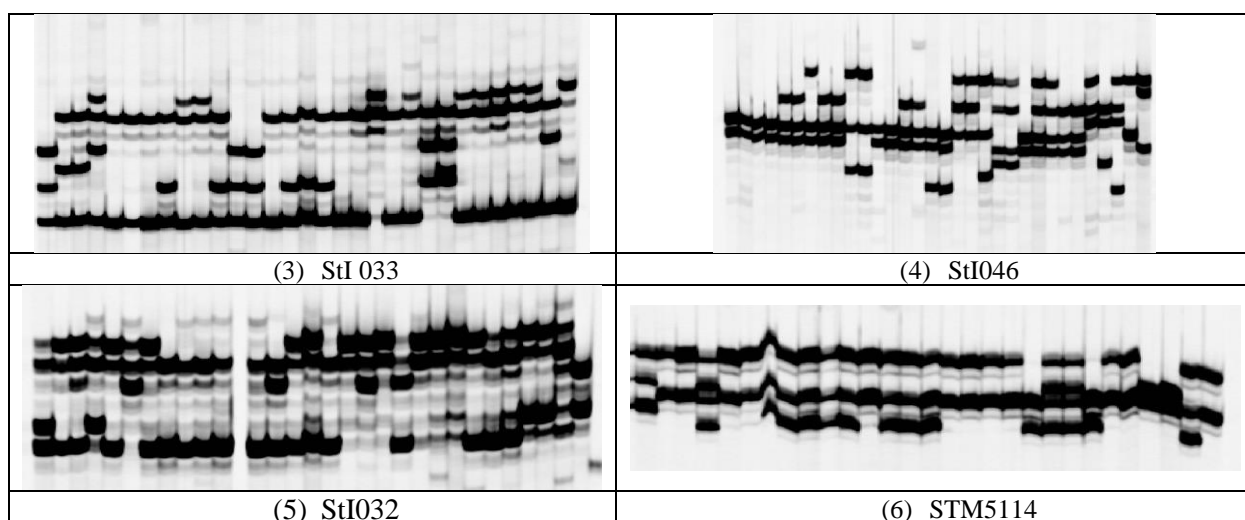


Рисунок 3.5 – Пример аллельного полиморфизма ядерных SSR-локусов

Анализируя полиморфизм микросателлитных локусов, мы отмечаем частоту редких аллелей (менее 5% для выборки) и уникальных аллелей (табл. 3.9).

Таблица 3.9 – Уникальные и редкие аллели, выявленные у 90 сортов и предсортос российской селекции

№ п/п	Локус	Аллель	Встречаемость в выборке	Сорта/предсорта
1	STG0016	STG0016_117	уникальный	Камераз
2		STG0016_126	редкий	Белоклубневый, Минусинский
3		STG0016_141	редкий	Имандра, Заполярный
4	StI004	StI004_64	уникальный	Хибинский морозостойкий
5		StI004_103	уникальный	Долинский
6		StI004_73	редкий	Камераз, Хибинский морозостойкий
7	StI032	StI032_112	редкий	Сибиряк (сеянец 36/15), Детскосельский, Зауральский
8	StI033	StI033_122	редкий	Хибинский двуурожайный, Хибины №3, Хибинский морозостойкий
9	StI046	StI046_179	уникальный	Хибинка
10		StI046_182	редкий	Злата, Хамелеон, Сахалинский №4, Лаймдота
11		StI046_188	редкий	Гуменючка, Долинский, Белоплет

№ п/п	Локус	Аллель	Встречаемость в выборке	Сорта/предсорта
12		StI046_197	редкий	Хибинка, Имандра, Заполярный, Хибинский морозостойкий
13		StI046_203	редкий	Сибиряк (сеянец 36/15), Марникве
14	STM0037	STM0037_76	уникальный	Имандра
15		STM0037_92	уникальный	Якутский
16	STM2005	STM2005_148	редкий	Эпрон, Хибинский морозостойкий
17		STM2005_160	редкий	Имандра, Заполярный, Хибинский морозостойкий
18	STM5114	STM5114_304	уникальный	Хибинка
19		STM5114_283	редкий	Белоплет, Хибинский морозостойкий
8 локусов		7 уникальных 12 редких аллелей		40 образцов

Число редких аллелей в выборке старых отечественных сортов варьировало от нуля (STM0037) до четырех (StI046); число уникальных аллелей - от нуля (StI032, StI033, STM2005) до двух (StI004, STM0037). Уникальные аллели для данной выборки обнаружены в пяти микросателлитных локусах (STG0016, StI004, StI046, STM037, STM5114). Выделим сорт Хибинский морозостойкий (вк-134), микросателлитный профиль которого включает один уникальный и 6 редких аллелей (табл. 3.9).

Для выборки советских селекционных сортов был проведен кластерный анализ (на сегодняшний день только для 25 сортов выборки установлен аллельный состав для каждого из 8 SSR локусов (рис. 3.7).

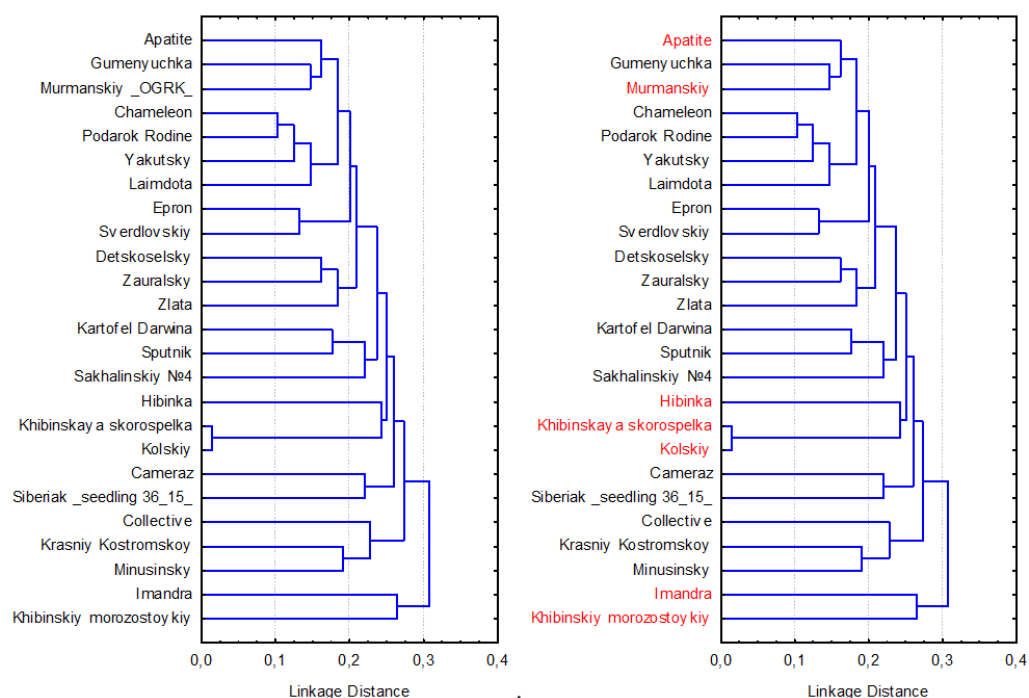


Рисунок 3.7. Кластеризация 25 старых образцов без пропусков по 8 SSR-локусам. Расстояние – процент несовпадений, метод кластеризации – UPGMA. Обозначения: красным выделены сорта селекции ПОСВИР

Важным результатом проведенных исследований является генотипирование старых селекционных сортов, каждый из которых имел свой индивидуальный SSR-профиль.

### 3.3.2 Молекулярный скрининг старых советских селекционных сортов

Для 49 старых отечественных сортов был проведен молекулярный скрининг с маркерами типов цитоплазм и маркерами гена *H1* устойчивости к ЗКН Ro1. Подавляющее число сортов 46 (94%) имели чилийский T (T/β) тип цитоплазмы. Единичные сорта имели D (W/α) тип цитоплазмы (Марникве (к-711), Октябренок (к-1273) и один образец к-6924 с W/γ типом цитоплазмы.

Подавляющее число сортов не имело маркеров гена *H1* (96%), контролирующего устойчивость к патотипу Ro1 ЗКН. Маркеры гена *H1* были

детектированы только у образцов - вк-120 сорт Кольский и к-812 сорт Сибиряк (сеянец 36/15).

По предварительным данным большинство старых сортов не имели маркеров генов *R1* и *R3a* расоспецифичной устойчивости к фитофторозу.

### **3.4 SSR-анализ отечественного генофонда сортов картофеля (объединенной выборки советских сортов, созданных в первой половине XX века, и современных российских сортов)**

Сравнение индексов полиморфизма SSR-локусов (значений PIC) в выборках современных и старых отечественных сортов картофеля при помощи критерия Вилкоксона (Wilcoxon Matched Pairs Test) выявило статистически значимые ( $p=0,036$ ) различия между этими выборками, для современных сортов значения PIC были выше. Число ненулевых аллелей современных сортов превышает таковое у старых на уровне значимости 5,2% ( $p=0,052$ ).

Анализ взаимосвязей сортов объединенной выборки не выявил группирования сортов в соответствии с принадлежностью к селекционным центрам или в соответствии с данными их родословных (рис. 3.8).

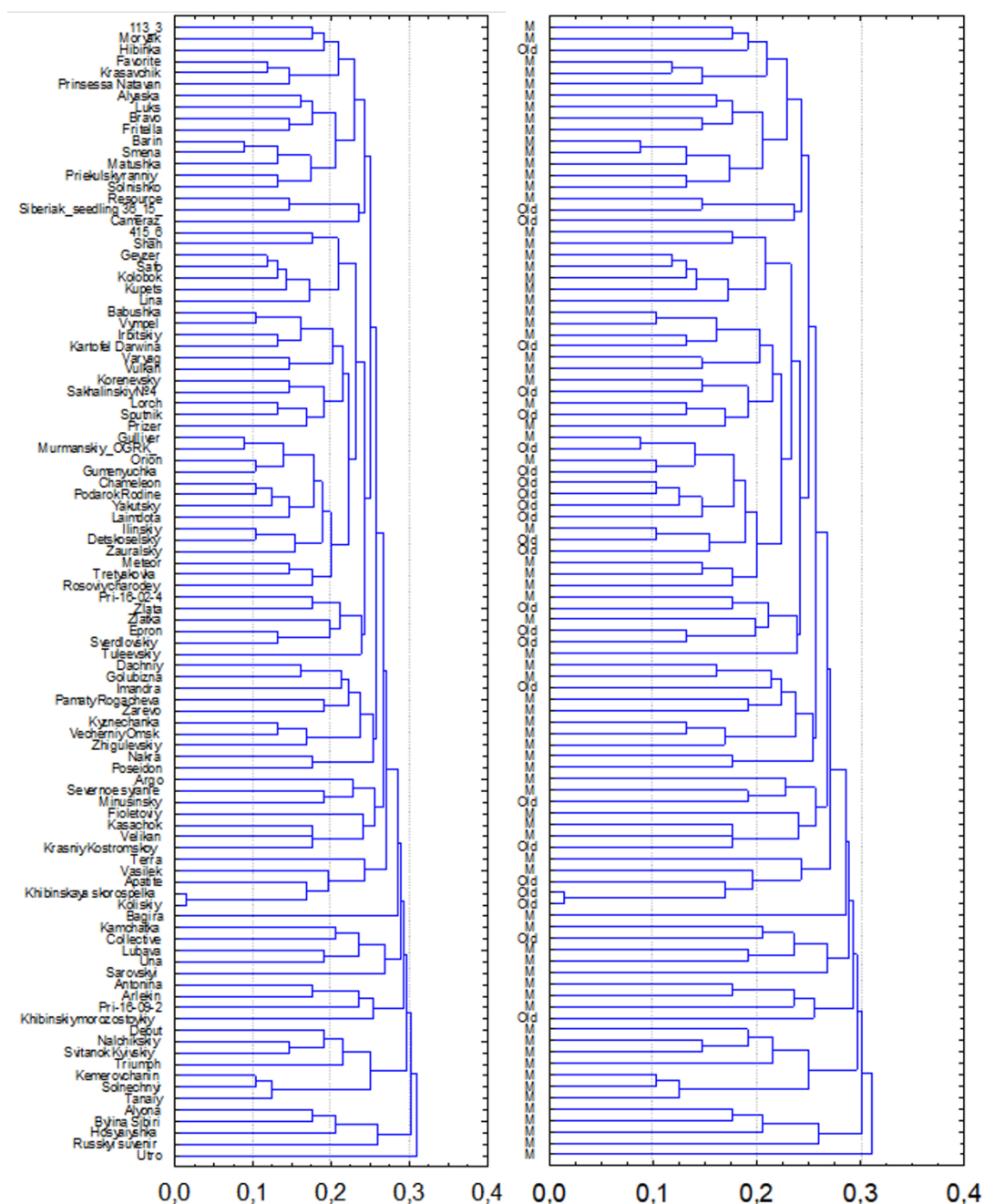


Рисунок 3.8 - Кластеризация 100 образцов без пропусков по 8 SSR-локусам. Расстояние – процент несовпадений, метод кластеризации – UPGMA. Обозначения: M – современный сорт, Old – старый сорт

Результаты проведенного SSR-анализа объединенной выборки сортов подтвердили эффективность использованного набора маркеров для генотипирования – каждый образец объединенной выборки имел индивидуальный микросателлитный профиль.



### **3.5 Использование молекулярно-генетических паспортов номенклатурных стандартов в качестве контролей для проверки идентичности одноименных образцов в различных коллекциях и для выявления дублетов**

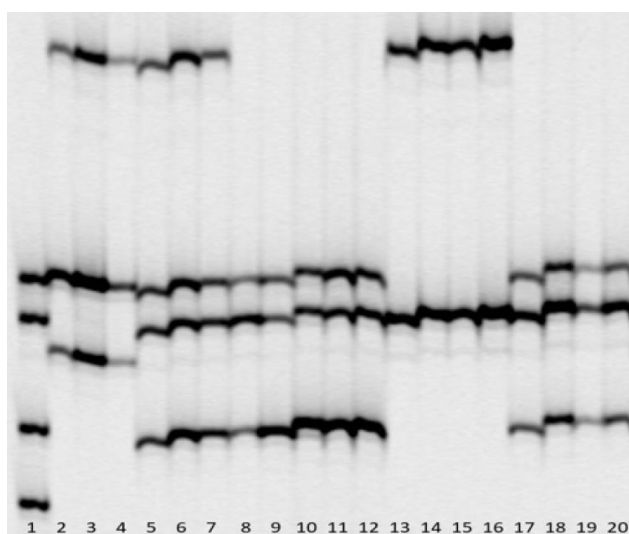
Для повышения эффективности менеджмента коллекций селекционных сортов мы предлагаем использовать данные молекулярно-генетических паспортов номенклатурных стандартов (данные об аллельном составе SSR-локусов, наличии/отсутствии маркеров R-генов устойчивости и данные о типах цитоплазм сортов). Эти данные могут быть использованы в качестве контрольных вариантов при выявлении дублетов, проверки идентичности одноименных образцов в различных коллекциях и решении спорных вопросов о принадлежности образца.

В нашей работе данные молекулярно-генетических паспортов номенклатурных стандартов были сопоставлены с результатами SSR-анализа одноименных образцов, полученных их различных источников: из *in vitro* коллекций разных институтов, полевой коллекции картофеля ВИР и из разных выборок программы КПНИ\_ЭГИ (Приложение 2).

#### **3.5.1 Использование данных молекулярно-генетического паспортов номенклатурных стандартов для верификации образцов в *in vitro* коллекции ВИР**

Одной из задач комплексного подхода сохранения и изучения современных отечественных сортов картофеля является поддержание генотипированных образцов в контролируемых условиях *in vitro* и дальнейшее их сохранение в криоколлекции ВИР (Гавриленко, Чухина, 2020). В связи с этим одна из задач нашей работы состояла в верификации образцов отечественных сортов из *in vitro* коллекции ВИР на основе сопоставления их SSR-спектров с соответствующими спектрами номенклатурных стандартов.

Поэтому в SSR-анализе были использованы наряду с препаратами ДНК, выделенными из растительной ткани номенклатурных стандартов, дополнительные препараты ДНК, выделенные из одноименных образцов сортов, сохраняемых в *in vitro* коллекции ВИР. На рисунке 3.7 приведен пример такой проверки, проведенной для образцов омских сортов из *in vitro* коллекции ВИР (Алена к-12145р, Былина Сибири и-638066, Вечерний Омск и-638067, Триумф и-638068, Хозяюшка к-24755р); всего в этом исследовании участвовали 19 препаратов ДНК пяти омских сортов.



**Рисунок 3.7.** Сопоставление результатов SSR-генотипирования образцов пяти омских сортов картофеля, сохраняемых в *in vitro* коллекции ВИР, с SSR-спектрами номенклатурных стандартов соответствующих сортов. В качестве примера приведен микросателлитный локус StI033. Примечание: контрольный образец, используемый нами в SSR-анализе сортов картофеля (1). Образцы сортов: Алена (2, 3, 4); Былина Сибири (5, 6, 7); Вечерний Омск (8, 9, 10, 11, 12); Хозяюшка (13, 14, 15, 16); Триумф (8, 17, 18, 19). Образцы из *in vitro* коллекции ВИР отмечены в скобках полужирным шрифтом.

Во всех случаях микросателлитные профили у образцов одного и того же сорта не различались между собой и соответствовали данным генетических паспортов номенклатурных стандартов (рис. 3.7).

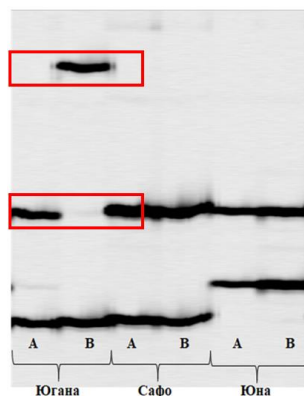
Аналогичные исследования были проведены для образцов сортов, полученных из *in vitro* коллекций различных селекционных центров (см. Приложение 2). Генотипированные и верифицированные *in vitro* образцы селекционных сортов получали интродукционные номера, а затем номера постоянного

каталога ВИР. В настоящее время эти образцы сохраняются в *in vitro* коллекции ВИР; составлена база данных, включающая информацию (№ интродукции, № каталога ВИР, дата получения или год введения и др.). Такие образцы были включены в программу по криоконсервации с целью долгосрочного сохранения идентифицированного генофонда российских сортов картофеля в криоколлекции ВИР (Ефремова и др., в печати).

### 3.5.2 Сопоставление микросателлитных профилей номенклатурных стандартов и образцов сортов, полученных в рамках программы КПНИ\_ЭГИ

SSR-профили большинства проанализированных образцов из биоресурсных полевых коллекций различных селекционных институтов, образцов полевой коллекции ВИР и образцов из программ КПНИ\_ЭГИ-2018\_ВНИИКХ и КПНИ\_ЭГИ-2019\_ВНИИКХ не отличались от соответствующих профилей номенклатурных стандартов (приложение 4)

В то же время, в ряде случаев были выявлены несоответствия (рис. 3.9).



**Рисунок 3.9** - Результаты несовпадения SSR-профилей, генерированных на препаратах ДНК трех сортов, выделенных из шести источников

SSR-профили образцов 15 сортов из выборки КПНИ\_ЭГИ-2017\_ВИР отличались от профилей соответствующих номенклатурных стандартов (см. Приложение 4).

### **3.5.3 Использование микросателлитных профилей номенклатурных стандартов для выявления дублетных образцов в коллекциях**

При изучении старых отечественных сортов, полученных с Полярной ОС ВИР, было выявлено несколько пар образцов сортов с идентичными SSR профилями. Мы столкнулись с недостаточным количеством литературных источников, описывающих их морфологические признаки. Кроме того, в полевых коллекциях растения старых сортов часто поражены множественными вирусными инфекциями, из-за чего они потеряли способность к цветению. Следовательно, получение данных SSR-генотипирования таких сортов актуально, поскольку поможет кураторам коллекций выявлять дубликаты и/или детектировать технические ошибки в поддержании образцов.

Так, в ходе SSR анализа микросателлитные профили у двух образцов из полевой коллекции ВИР совпали по всем восьми SSR-локусам (Смысловский (к-814) и Драгоценность Агнелии (к-740)). Для дополнительной проверки мы изучили еще четыре микросателлитных локуса – StI001, StI014, StI030, STM1106, их аллельный состав также совпал. Для сорта 'Смысловский мы нашли описание морфологических признаков в литературе (цвет клубня, светового ростка и соцветия совпадают), которые совпадали с анализируемым образцом. Образец старого сорта Драгоценность Агнелии (этот сорт упоминается в публикации 1930 г.) имеет пораженные заболеваниями клубни и световые ростки, оценить морфологические признаки этих органов затруднительно. Поэтому образец к-740 сорта Драгоценность Агнелии был исключен из дальнейшего кластерного анализа. Вторым случаем был выявлен для образца сорта Кинельский богатырь (к-2256), два образца данного сорта с индексами «А» и «Б» мы получили с ПОС ВИР.

В случае других старых отечественных сортов мы столкнулись с недостатком литературных источников, описывающих их морфологические признаки. Кроме того, в полевых коллекциях, растения старых сортов часто

поражены множественными вирусными инфекциями, из-за чего они потеряли способность к цветению и некоторые морфологические признаки недоступны для оценки. Поэтому отдельные пары старых сортов с совпадающими SSR-профилями были удалены из экспериментальной выборки. Можно заключить, что использование данных SSR-генотипирования старых сортов поможет кураторам коллекций выявлять дубликаты и/или детектировать технические ошибки в поддержании образцов.

### **3.6 Отбор старых гербарных образцов отечественных селекционных сортов картофеля, сохраняемые в Гербарии WIR**

Выборка старых отечественных сортов картофеля в настоящее время расширяется. Для анализа генетического разнообразия отечественных сортов селекции первой половины XX века) нами был проведен анализ литературных данных и изучение старых гербарных образцов, сохраняемых в коллекции WIR. Совместно с сотрудниками отдела агроботаники и *in situ* сохранения генетических ресурсов растений в.н.с. Чухиной И.Г. и м.н.с. Лебедевой Н.В., и н.с. отдела биотехнологии к.б.н. Н.С. Клименко, был отобран растительный материал у 105 гербарных образцов из основного фонда WIR. Планируется выделение ДНК из этих образцов и проведение молекулярного скрининга.

### **3.7 Использование данных ДНК-маркирования сортов для повышения результативности отбора перспективных селекционных клонов (межсортовых гибридов) с комплексом маркеров, ассоциированных с генами устойчивости к вредным организмам**

Основываясь на ранее опубликованных данных генотипирования сортов селекции ЛенНИИСХ «Белогорка» и их генетических паспортов (Гавриленко и др., 2018; Клименко и др., 2020), в сотрудничестве с селекционерами этого института, был проведен молекулярный скрининг расщепляющихся популяций с маркерами 6 R-генов устойчивости к различным патогенам (Таблица 3.10, рис. 3.10,). В анализе участвовали 112 селекционных клонов

(предварительно охарактеризованных селекционерами по комплексу селекционно-ценных признаков) из трех межсортовых комбинаций: 1) Гусар × Чароит, комбинация 5.18 (27 генотипов); 2) Гусар × Алый парус, комбинация 6.18 (30 генотипов); 3) Гусар × Сиреневый туман, комбинация 7.18 (55 генотипов).

В Таблице 3.10 представлены результаты изучения характера наследования ДНК маркеров в каждой комбинации, на основании которых был выявлен аллельный состав *R*-генов у родительских форм и, соответственно, определен уровень гетерозиготности маркированных локусов исходных сортов. У межсортовых гибридов всех трех комбинаций отмечено расщепление по признаку «наличие/отсутствие ДНК маркеров изучаемых шести *R*-локусов» (Таблица 3.10); т.е. среди исходных сортов квадриплексов по маркированным *R*-генам не выявлено.

Таблица 3.10 – Результаты молекулярного скрининга межсортовых гибридов ЛениНИИСХ Белогорка.

Сорт или комбинация скрещивания	YES3-3A/ YES3-3B	5Rx1	57R/ N195	Gpa 2-2	R1	RT-R3a
	ген <i>Ry<sub>sto</sub></i>	ген <i>Rx1</i>	ген <i>HI</i>	ген <i>Gpa2</i>	ген <i>R1</i>	ген <i>R3a</i>
Гусар × Чароит	16:11 (1:1)	22:5 (5:1)	23:4 (5:1)	22:5 (5:1)	11:16 (1:1)	10:17 (1:1)
Гусар × Алый парус	15:15 (1:1)	22:8 (5:1)	27:3 (11:1)	21:9 (5:1)	15:15 (1:1)	14:16 (1:1)
Гусар × Сиреневый туман	33:22 (1:1)	28:27 (1:1)	46:9 (5:1)	26:29 (1:1)	18:37	22:33 (1:1)
Алый парус *	– rrrr	+ <b>RRrr</b>	+ Rrrr	+ <b>RRrr</b>	– rrrr	+ Rrrr
Гусар *	+ Rrrr	– rrrr	+ <b>RRrr</b>	– rrrr	+ Rrrr	– rrrr
Сиреневый туман *	– rrrr	+ Rrrr	– rrrr	+ Rrrr	– rrrr	+ Rrrr
Чароит *	– rrrr	+ <b>RRrr</b>	– rrrr	+ <b>RRrr</b>	– rrrr	+ Rrrr

Выявленный характер расщеплений можно было отнести к двум случаям скрещиваний с разным уровнем гетерозиготности носителей доминантных аллелей: (1) симплекс  $Rrrr$  x нуллиплекс  $rrrr$  – теоретически ожидаемое расщепление - 1  $R-$  : 1  $rrrr$ ; (2) дуплекс  $RRrr$  x нуллиплекс  $rrrr$  – теоретически ожидаемое расщепление - 5  $R-$  : 1  $rrrr$ .

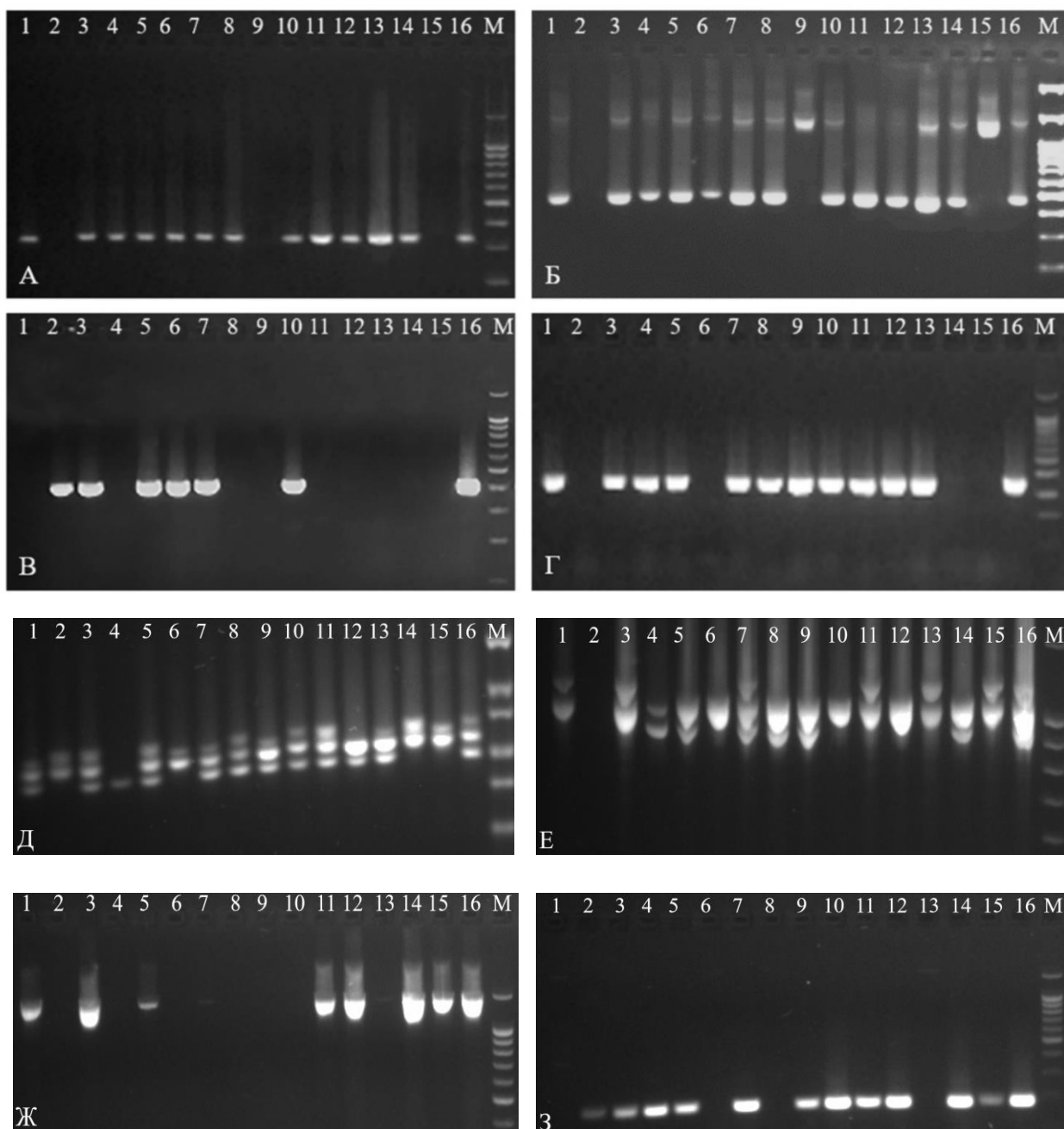


Рисунок 3.10 – Скрининг межсортовых гибридов картофеля с ДНК маркерами генов устойчивости.

(А-Е): 1 – Гусар, 2 – Сиреневый туман, 3 – гибрид 7.18-1, 4 – гибрид 7.18-8, 5 – гибрид 7.18-2, 6 – гибрид 7.18-9, 7 – гибрид 7.18-3, 8 – гибрид 7.18-10, 9 – гибрид 7.18-4, 10 – гибрид 7.18-11, 11 – гибрид 7.18-5, 12 – гибрид

7.18-12, 13 – гибрид 7.18-6, 14 – гибрид 7.18-13, 15 – гибрид 7.18-7, 16 – гибрид 7.18-14, М – маркер молекулярного веса 100 п.н.+1500 п.н. + 3000 п.н. (СибЭнзим, Россия).

(Ж, З): 1 – Гусар, 2 – Чароит, 3 – гибрид 5.18-1, 4 – гибрид 5.18-11, 5 – гибрид 5.18-2, 6 – гибрид 5.18-12, 7 – гибрид 5.18-3, 8 – гибрид 5.18-13, 9 – гибрид 5.18-5, 10 – гибрид 5.18-14, 11 – гибрид 5.18-6, 12 – гибрид 5.18-15, 13 – гибрид 5.18-8, 14 – гибрид 5.18-16, 15 – гибрид 5.18-9, 16 – гибрид 5.18-17, М – маркер молекулярного веса 100 п.н.+1500 п.н. + 3000 п.н. (СибЭнзим, Россия).

Из 112 изученных селекционных клонов потенциальную ценность для селекции имеют четыре гибридных генотипа (5.18-9, 5.18-17, 6.18-12 и 6.18-37), имеющие все 6 маркеров.



## ВЫВОДЫ

1. В соответствии с положениями Международного кодекса номенклатуры культурных растений оформлены и обнародованы номенклатурные стандарты 46 современных российских сортов картофеля селекции ФИЦ картофеля им. А.Г. Лорха, Омского АНЦ, Сибирского НИИРС, которые переданы на хранение в типовой фонд Гербария ВИР. Для 18 современных сортов и 14 предсортов селекции ФНЦ Агробиотехнологии Дальнего Востока им. А.К. Чайки, Камчатского НИИСХ, Ленинградского НИИСХ «Белогорка» и ФГБНУ УрФАНИЦ УРО РАН продолжается оформление номенклатурных стандартов и гербарных ваучеров.
2. С использованием ДНК препаратов, выделенных из растительной ткани номенклатурных стандартов, разработаны молекулярно-генетические паспорта 46 современных российских сортов картофеля, которые могут быть использованы в качестве контрольных образцов для решения спорных вопросов по определению идентичности и однородности образцов одного сорта и для повышения эффективности менеджмента коллекций. В генетические паспорта включена информация об аллельном составе 8 хромосомспецифичных микросателлитных локусах, о наличии/отсутствии 15 маркеров R-генов устойчивости к вредным организмам и о типах цитоплазм сортов. Генотипирование и паспортизация еще 18 современных сортов и 14 предсортов в настоящее время еще продолжаются.
3. На основании данных молекулярно-генетической паспортизации и генотипирования составлены базы данных для выборок отечественных сортов картофеля, сохраняемых в контролируемых условиях – в *in vitro* и крио коллекциях ВИР; SSR-профили этих образцов верифицированы при сопоставлении с данными генетических паспортов номенклатурных стандартов.
4. На основании данных SSR-анализа и молекулярного скрининга охарактеризовано генетическое разнообразие двух выборок отечественных сортов картофеля. Показано, что в выборке современных российских

сортов уровень полиморфизма микросателлитных локусов достоверно выше, чем у старых сортов селекции 1920–1960 годов; также существенно выше частота встречаемости маркеров гена *H1* устойчивости к золотистой цитообразующей картофельной нематоды и маркеров *R*-генов расоспецифичной устойчивости к фитофторозу, а также достоверно выше частоты *D* и *W/gamma* типов цитоплазм, характерных для диких мексиканских видов, что связано с активным использованием межвидовой гибридизации в современной селекции.

5. Использование данных генотипирования сортов в анализе расщепляющихся межсортовых популяций позволило определить степень гетерозиготности локусов, контролирующих селекционно-ценные признаки, отобрать генотипы с разным уровнем гетерозиготности носителей доминантных аллелей (симплекс, дуплекс) и генотипы с комплексом маркеров *R*-генов

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Рыбаков Д.А.**, Антонова О.Ю., Чухина И.Г., Фомина Н.А., Клименко Н.С., Желтова В.В., Мелешин А.А., Кочиева Е.З., Овэс Е.В., Апшев Х.Х., Симаков Е.А., Гавриленко Т.А. Номенклатурные стандарты и генетические паспорта сортов картофеля селекции Всероссийского научно-исследовательского института картофеля им. А.Г. Лорха // Биотехнология и селекция растений. 2020;3(4):5-52. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-4-01
2. Фомина Н.А., Антонова О.Ю., Чухина И.Г., **Рыбаков Д.А.**, Сафонова А.Д., Мелешин А.А., Гавриленко Т.А. Номенклатурные стандарты, ваучерные образцы и генетические паспорта сортов картофеля, выведенных в селекционных центрах Сибири и Урала // Биотехнология и селекция растений. 2020;3(4):53-76. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-4-03
3. Антонова О.Ю., Клименко Н.С., **Рыбаков Д.А.**, Фомина Н.А., Желтова В.В., Новикова Л.Ю., Гавриленко Т.А. SSR-анализ современных Российских сортов картофеля с использованием ДНК номенклатурных стандартов // Биотехнология и селекция растений. 2020;3(4):77-96. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-4-02
4. Хютти А.В., **Рыбаков Д.А.**, Гавриленко Т.А., Афанасенко О.С. Устойчивость к возбудителям фитофтороза и глободероза современного сортимента семенного картофеля и его фитосанитарное состояние в различных агроклиматических зонах европейской части России // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(4):363-375 DOI 10.18699/VJ20.629
5. Гаджиев Н.М., Лебедева В.А., **Рыбаков Д.А.**, Иванов А.В., Желтова В.В., Фомина Н.А., Антонова О.Ю., Гавриленко Т.А. Использование в практической селекции картофеля результатов ДНК-маркирования исходных родительских форм и межсортных гибридов // Сельскохозяйственная биология. 2020;55(5):981-994. DOI: 10.15389/agrobiology.2020.5.981rus
6. **Рыбаков Д.А.**, Черемисин А.И., Антонова О.Ю., Чухина И.Г., Гавриленко Т.А. Номенклатурные стандарты и генетические паспорта сортов картофеля селекции Омского Аграрного научного центра // Биотехнология и селекция растений. 2022;5(4). DOI: 10.30901/2658-6266-2022-4-04
7. Karetnikov D.I., Vasiliev G.V., Toshchakov S.V., Shmakov N.A., Genaev M.A., Nesterov M.A., Ibragimova S.M., **Rybakov D.A.**, Gavrilenko T.A., Salina E.A., Patrushev M.V., Kochetov A.V., Afonnikov D.A. Analysis of Genome Structure and Its Variations in Potato Cultivars Grown in Russia. Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 5713. DOI: 10.3390/ijms24065713
8. Ефремова О.С., Волкова Н.Н., **Рыбаков Д.А.**, Лисицына О.В., Озерский П.В., Гавриленко Т.А. Расширение криоколлекции образцов картофеля, сохраняемой в криобанке ВИР // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2023 (принято к печати)

## АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ - СПИСОК НАУЧНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ, НА КОТОРЫХ ДОКЛАДЫВАЛИСЬ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

1. **Рыбаков Д.А.**, Антонова О.Ю., Симаков Е.А., Митюшкин А.В., Мелешин А.А., Апшев Х.Х., Клименко Н.С., Чухина И.Г., Кочиева Е.З., Ефремова О.С., Желтова В.В., Фомина Н.А., Гавриленко Т.А. Номенклатурные стандарты сортов картофеля селекции ВНИИКС им. А.Г. Лорха // Международная конференция «125 лет прикладной ботаники в России» (25- 28 ноября 2019 г., Санкт-Петербург). – Санкт-Петербург. С. 53-54
2. **Рыбаков Д.А.**, Антонова О.Ю., Черемисин А.И., Гавриленко Т.А. Номенклатурные стандарты селекции Омского аграрного научного центра в коллекции ВИР // Всероссийская научно-практическая конференция

- «Генетические ресурсы растений для генетических технологий: к 100-летию Пушкинских лабораторий ВИР» (22-23 июня 2022 г., Санкт-Петербург). – Санкт-Петербург. – С. 130-132
3. **Рыбаков Д.А.** Номенклатурные стандарты и генетические паспорта сортов картофеля российской селекции / **Рыбаков Д.А.**, Гавриленко Т.А., Чухина И.Г., Антонова О.Ю., Фомина Н.А., Клименко Н.С., Кочиева Е.З., Мелешин А.А., Овэс Е.В., Апшев Х.Х., Симаков Е.А., Сафонова А.Д. // Всероссийская научно-практическая конференция «Генетические ресурсы растений для генетических технологий: к 100-летию Пушкинских лабораторий ВИР» (22-23 июня 2022 г., Санкт-Петербург). – Санкт-Петербург. Устный доклад.
  4. Гавриленко Т.А., Чухина И.Г., Антонова О.Ю., Оськина Н.А., **Рыбаков Д.А.**, Клименко Н. С., Ефремова О.С., Кочиева Е.З., Лебедева В.А., Евдокимова З.З., Гаджиев Н.М., Мелешин А.А., Симаков Е.А., Апшев Х.Х., Овэс Е.В., Сташевски З., Гимаева Е.А., Сафонова А.Д., Черемисин А.И., Шанина Е.П. Номенклатурные стандарты: новые подходы к регистрации сортового генофонда в генбанках // II Международная научно-практическая конференция "Ботанические коллекции Беларуси: сохранность, использование и перспективы развития гербариев" (20-23 сентября 2022г., Минск). – Минск, 2022. – С. 52-56
  5. Ефремова О.С., Волкова Н.Н., Лисицына О.В., **Рыбаков Д.А.**, Озерский П.В., Гавриленко Т.А. Сохранение образцов картофеля в криоколлекции ВИР // V Вавиловская международная конференция: к 135-летию со дня рождения Н.И. Вавилова (21-25 ноября 2022 г., Санкт-Петербург). – Санкт-Петербург. С. 129
  6. **Рыбаков Д.А.**, Антонова О.Ю., Гавриленко Т.А. Молекулярный скрининг сортов картофеля из коллекции ВИР на устойчивость к *Meloidogyne chitwoodi*. // V Вавиловская международная конференция: к 135-летию со дня рождения Н.И. Вавилова (21-25 ноября 2022 г., Санкт-Петербург). – Санкт-Петербург. С. 299-300