

Молекулярный скрининг сортов и гибридов картофеля северо-западной зоны Российской Федерации

Т.А. Гавриленко^{1, 4}, Н.С. Клименко¹, О.Ю. Антонова¹, В.А. Лебедева^{2, 3}, З.З. Евдокимова², Н.М. Гаджиев^{2, 3}, О.В. Апаликова¹, Н.В. Алпатьева¹, Л.И. Костина¹, Н.М. Зотеева¹, Ф.Т. Мамадбокирова⁴, К.В. Егорова^{1, 4}

¹ Федеральное исследовательское учреждение Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

² Ленинградский научно-исследовательский институт сельского хозяйства «Белогорка», Ленинградская область, Гатчинский район, Россия

³ ООО Селекционная фирма «ЛиГа», Ленинградская область, Гатчинский район, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Задача повышения устойчивости сортов к болезням и вредителям является приоритетной для селекции картофеля. Многие сорта, созданные селекционерами северо-западной зоны Российской Федерации, являются многовидовыми гибридами, обладают комплексной устойчивостью к наиболее вредоносным патогенам в сочетании с высокой пластичностью, о чем свидетельствует их районирование в разных регионах нашей страны. В статье представлены результаты молекулярного скрининга сортов и гибридов, созданных в разные годы в ЛенНИИСХ «Белогорка» и в ООО Селекционная фирма «ЛиГа». Молекулярный скрининг проведен с использованием 22 маркеров 14 *R*-генов устойчивости к вирусам PVY и PVX, к цистообразующим нематодам – *Globodera pallida* (патотипы Pa2, Pa3) и *G. rostochiensis* (патотип Ro1) и к фитофторозу. Данные молекулярно-генетического анализа сопоставлялись с результатами Государственного испытания сортов на устойчивость к болезням и с другими опубликованными источниками. В работе использованы также маркеры стерильных и фертильных типов цитоплазм. По результатам молекулярного скрининга выделены сорта и гибриды с разными сочетаниями маркеров *R*-генов (*Ry_{sto}*, *Ry-f_{sto}*, *Rx1*, *Rx2*, *Gro1-4*, *H1*, *Gpa2*, *R1*, *R3a*, *Rpi-blb1*, *Rpi-sto1*), обладающие D-, T-, W/гамма стерильными типами цитоплазм. Анализ фертильности пыльцы, результатов скрещиваний и данных родословных показал, что селекционерам удалось получить фертильные формы с D- и T-типами цитоплазм, несущие генетический материал мексиканских полиплоидных видов *Solanum stoloniferum* и *S. demissum*. Информация о наличии у гибридов и сортов маркеров *R*-генов и о типах цитоплазм, полученная в настоящей работе, позволит повысить эффективность дальнейших селекционных программ, в том числе направленных на пирамидирование генов устойчивости к патогенам. Данные молекулярного скрининга позволили уточнить родословные ряда сортов и гибридов, которые создавались на протяжении нескольких десятилетий.

Ключевые слова: *Solanum*; картофель; селекция; MAS; устойчивость к болезням; *R*-гены; типы цитоплазм; мужская стерильность.

Molecular screening of potato varieties bred in the northwestern zone of the Russian Federation

T.A. Gavrilenko^{1, 4}, N.S. Klimenko¹, O.Yu. Antonova¹, V.A. Lebedeva^{2, 3}, Z.Z. Evdokimova², N.M. Gadjiyev^{2, 3}, O.V. Apalikova¹, N.V. Alpatyeva¹, L.I. Kostina¹, N.M. Zoteyeva¹, F.T. Mamadbokirova⁴, K.V. Egorova^{1, 4}

¹ Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

² Leningrad Scientific Research Institute "Belogorka", Gatchinsky district, Leningrad region, Russia

³ Ltd Breeding company "LiGa", Gatchinsky district, Leningrad region, Russia

⁴ St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

Increasing the resistance of varieties to diseases and pests is a priority in potato breeding. Many potato varieties created in the Leningrad Scientific Research Institute of Agriculture "Belogorka" are multi-species hybrids possessing complex resistance to the most spread pathogens in combination with a high plasticity, which determined their zoning in many regions of the Russian Federation. Potato varieties and hybrids created in different periods of time in this institute and in the Ltd Breeding company "LiGa" were included in marker-assisted selection with 22 markers of 14 *R* genes conferring extreme resistance to viruses PVY and PVX, resistance to cyst nematodes *Globodera pallida* (patotypes Pa2, Pa3) and *G. rostochiensis* (pathotype Ro1) and resistance to late blight. The data of molecular screening were compared with the results of the State Test of Varieties for Disease Resistance, as well as with other published sources. Markers of sterile and fertile cytoplasm types were also used in the study. Based on the results of molecular screening, varieties and hybrids with different combinations of markers of *R* genes conferring resistance to the most harmful pathogens (*Ry_{sto}*, *Ry-f_{sto}*, *Rx1*, *Rx2*, *Gro1-4*, *H1*, *Gpa2*, *R1*, *R3a*, *Rpi-blb1*, *Rpi-sto1*) were detected. Among them, genotypes with sterile D-, T-, W/gamma cytoplasmic types were selected. Analysis of their pollen fertility, crossability and pedigree data showed that breeders succeed in obtaining fertile forms with the D- and

T-types of cytoplasm carrying genetic material of Mexican polyploid species *Solanum stoloniferum* and *S. demissum*. The information about the presence of markers of *R* genes and about cytoplasm types of hybrids and varieties will allow an effective implementation of further breeding programs for resistance to a complex of pathogens, including pyramiding of *R* genes. The data of molecular screening made it possible to specify the pedigrees of several varieties and hybrids that have been created over several decades.

Key words: *Solanum*; potato breeding; MAS; diseases resistance; *R* genes; cytoplasmic types; male sterility.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Гавриленко Т.А., Клименко Н.С., Антонова О.Ю., Лебедева В.А., Евдокимова З.З., Гаджиев Н.М., Апаликова О.В., Алпатьева Н.В., Костина Л.И., Зотеева Н.М., Мамадобкирова Ф.Т., Егорова К.В. Молекулярный скрининг сортов и гибридов картофеля северо-западной зоны Российской Федерации. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(1):35-45. DOI 10.18699/VJ18.329

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Gavrilenko T.A., Klimenko N.S., Antonova O.Yu., Lebedeva V.A., Evdokimova Z.Z., Gadjiyev N.M., Apalikova O.V., Alpatyeva N.V., Kostina L.I., Zoteyeva N.M., Mamadbokirova F.T., Egorova K.V. Molecular screening of potato varieties bred in the northwestern zone of the Russian Federation. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(1):35-45. DOI 10.18699/VJ18.329 (in Russian)

Основными факторами, лимитирующими потенциальную урожайность картофеля в Северо-Западном регионе РФ, являются короткий вегетационный период, изменчивость погодных условий, повышенная влажность и связанные с этими факторами заболевания. Поэтому усилия селекционеров традиционно направлены на создание сортов картофеля ранней группы с высоким потенциалом продуктивности, с комплексной устойчивостью к неблагоприятным абиотическим факторам, заболеваниям и вредителям. Именно селекционеры северо-запада впервые в нашей стране создали сорта среднеранних сроков созревания, характеризующиеся горизонтальной устойчивостью к фитофторозу и экологической пластичностью, что стало большим успехом отечественной селекции.

Этот успех связан с именами двух выдающихся селекционеров – Е.А. Осиповой и Н.А. Лебедевой, которые не только создавали сорта, высокоадаптированные к условиям северо-запада и при этом востребованные во многих регионах нашей страны (Осипова, 1979, 1980, 1982), но и внесли большой вклад в развитие важных направлений в селекции картофеля – экспериментальную полиплоидию и многовидовую гибридизацию (Лебедева, 1961, 1963). Е.А. Осипова и Н.А. Лебедева были ученицами Сергея Михайловича Букасова, под руководством которого в ВИРе проводились приоритетные работы по изучению, систематизации и мобилизации генетических ресурсов картофеля. В свою очередь исследования Е.А. Осиповой и Н.А. Лебедевой были продолжены их учениками в Северо-Западном, а теперь Ленинградском НИИСХ «Белогорка». Усилиями селекционеров двух поколений созданы многовидовые гибриды с участием дикорастущих видов *Solanum acaule*, *S. berthaultii*, *S. chacoense*, *S. demissum*, *S. stoloniferum*, *S. vernei*, *S. verrucosum* и образцов культурных видов – *S. tuberosum* ssp. *andigenum*, *S. phureja* (Гаджиев, Лебедева, 2010; Лебедева, 2010; Лебедева, Гаджиев, 2011; Евдокимова, Калашник, 2013, 2015, 2016) (Приложение 1)¹. Целенаправленный отбор

в чередующихся поколениях насыщающих скрещиваний многовидовых гибридов и в потомствах, полученных от их самоопыления, привел к созданию сортов, обладающих комплексом хозяйственно ценных признаков: среднеранних, высокоурожайных, с хорошим качеством клубней, устойчивых к грибным болезням (в том числе с высокой полевой устойчивостью к фитофторозу), бактериальным гнилям и ряду других заболеваний (Евдокимова, 2010; Лебедева, 2010; Гаджиев, Лебедева, 2014; Лебедева, Гаджиев, 2014–2016). Селекционерами северо-запада получен и первый российский нематодоустойчивый сорт – Гибрид 390, который, к сожалению, не был районирован, но дал начало ряду других сортов.

Многие гибриды и сорта, полученные Н.А. Лебедевой и Е.А. Осиповой, показали хорошую комбинационную способность и были использованы при создании современных поколений сортов, позволяющих решать новые селекционные задачи, связанные с распространением в северо-западной зоне РФ вирусных болезней и расширением площадей, зараженных золотистой картофельной нематодой (ЗКН) – *Globodera rostochiensis* (Груздева, Матвеева, 2010). На территории РФ встречается только один патотип *G. rostochiensis* – Ro1 (Хютти и др., 2017). Другой вид цистообразующих нематод – бледная картофельная нематода (*G. pallida*) в РФ не выявлен, однако существует потенциальная опасность проникновения этого вида на территорию нашей страны, поскольку *G. pallida* встречается во многих странах Европейского союза, включая и страны, граничащие с Северо-Западным регионом РФ (САВИ/ЕРРО, 2015). В связи с этим актуальны исследования по молекулярному скринингу селекционного материала с маркерами *R*-генов, вовлеченных в контроль устойчивости к разным видам цистообразующих нематод.

На современном этапе селекционеры должны располагать базами данных, включающими не только результаты фенотипизации селекционного материала, но и информацию о наличии ДНК-маркеров, ассоциированных с генами и QTL, детерминирующими хозяйственно ценные признаки. За последние два десятилетия для картофеля разработаны многочисленные ДНК-маркеры, позволя-

¹ Приложения 1–3 см. по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2018-22/appx1.pdf>

ющие проводить маркер-опосредованный отбор (MAS) перспективных генотипов (см. обзоры (Simko et al., 2007; Tiwari et al., 2012, 2013; Gebhardt, 2013; Ramakrishnan et al., 2015)) и широко применяющиеся в молекулярном скрининге исследователями разных стран (Flis et al., 2005; Gebhardt et al., 2006; Milczarek et al., 2011; Mori et al., 2011, 2012; Asano et al., 2012; Schultz et al., 2012; Бирюкова и др., 2015; Антонова и др., 2016; Asano, Tamiya, 2016; Зотеева и др., 2017; Клименко и др., 2017).

Информация о наличии в селекционном материале диагностических маркеров *R*-генов необходима в том числе для интенсификации работ по пирамидированию генов, контролирующей устойчивость к патогенам и другие ценные признаки. Наряду с этой информацией в последнее время большое значение придается и данным о типах цитоплазм у отбираемых для скрещиваний родительских форм (Mori et al., 2011, 2012; Sanetomo, Gebhardt, 2015; Зотеева и др., 2017). Hosaka, Sanetomo (2012) разработали набор ДНК-маркеров, с помощью которых идентифицировали шесть основных типов цитоплазм картофеля: А, D (W/alpha), М, Р, Т, W. Типы D, Т и W/gamma относят к стерильным, при этом каждый из них отличается по фенотипическому проявлению признака мужской стерильности (Hosaka, Sanetomo, 2012). Случаи выявления фертильных форм при наличии стерильных типов цитоплазм связывают с наличием доминантных аллелей генов восстановления фертильности, например *Rt* (male fertility Restorer gene), и/или рецессивных аллелей ядерного гена *Ms* (Male sterility gene) (Анисимова, Гавриленко, 2017). Молекулярный скрининг зарубежных селекционных сортов картофеля показал, что практически все они обладают стерильными типами цитоплазм (Hosaka, Sanetomo, 2012; Sanetomo, Gebhardt, 2015). Так, подавляющее большинство старых европейских сортов, созданных в XIX – начале XX века, имеют тип Т от чилийских аборигенных сортов, тогда как среди современного сортимента преобладают сорта с W/gamma и D-типами, полученными ими от образцов диких мексиканских видов картофеля – *S. stoloniferum* и *S. demissum* соответственно. Образцы этих диких видов вовлекают в селекцию в качестве источников устойчивости к Y вирусу картофеля (PVY) и к фитофторозу (Ross, 1986) и в скрещиваниях с *S. tuberosum* используют как материнские формы (реципрокные скрещивания не успешны) (Dionne, 1961; Janssen et al., 1997).

В данном исследовании представлены результаты молекулярного скрининга сортов и гибридов, созданных селекционерами ЛенНИИСХ «Белогорка» и ООО Селекционная фирма «ЛиГа», выполненного с использованием маркеров *R*-генов, контролирующей устойчивость к важнейшим патогенам, а также маркеров фертильных и стерильных типов цитоплазм картофеля. Полученная информация позволила также уточнить родословные сортов и гибридов, многие из которых создавались на протяжении нескольких десятилетий.

Материал и методы исследования

Материалом для исследований послужили 33 сорта, созданных селекционерами ЛенНИИСХ «Белогорка» и ООО Селекционная фирма «ЛиГа» начиная с 1960-х гг. по настоящее время: Алый парус, Арина, Балтийский, Бело-

горский ранний, Вдохновение, Весна белая, Гатчинский, Гусар, Даная, Евразия, Елизавета, Жемчужина, Загадка Питера, Лига, Ломоносовский, Майский цветок, Наяда, Невский, Очарование, Оредежский, Памяти Осиповой, Петербургский, Рождественский, Русская красавица, Си-реневый туман, Сказка, Снегирь, Столовый 19, Сударыня, Суйдинский ранний, Холмогорский, Чародей, Чароит. Некоторые сорта не были включены в производство, однако активно использовались в скрещиваниях для получения нового селекционного материала. Помимо сортов в выборку вошли шесть гибридов, в разное время созданных селекционерами ЛенНИИСХ «Белогорка» (см. Приложение 1).

Выделение ДНК. Материал для выделения ДНК был получен из двух источников: полевой коллекции ВИР и из учреждений-оригинаторов – Ленинградского НИИСХ «Белогорка» и ООО Селекционная фирма «ЛиГа». ДНК выделяли из листьев растений с использованием модифицированного нами метода СТАВ-экстракции (Gavrilenko et al., 2013). В случае необходимости очистки препаратов от полифенольных соединений проводили с помощью поливинилпирролидона.

Маркер-опосредованный отбор (MAS) проводился с использованием CAPS-, SCAR- и STS-маркеров, ассоциированных с *R*-генами, детерминирующими устойчивость к вирусам PVY и PVX, к цистообразующим нематодам *G. pallida* (патотипы Pa2 и Pa3) и *G. rostochiensis* (патотип Ro1), а также к фитофторозу (табл. 1). Для работы были отобраны как аллель-специфичные, так и тесно сцепленные с *R*-генами маркеры, наиболее часто применяемые в селекционных программах.

Типы цитоплазм сортов картофеля (А, М, D, Р, Т, W) определяли с помощью набора праймеров, предложенного Hosaka, Sanetomo (2012) (табл. 2).

ПЦР проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10 нг тотальной ДНК, 1× реакционный буфер («Диалат», Москва), 2.5 mM MgCl₂, по 0.6 mM каждого из dNTPs, по 0.2 мкМ прямого и обратного праймера и 1 ед. Taq-полимеразы («Диалат», Москва). Протоколы и температуры отжига соответствовали указанным разработчиками праймеров (см. табл. 1 и 2). В ряде случаев программы молекулярного скрининга были оптимизированы нами путем введения функции TouchDown. Все реакции при работе со SCAR-маркерами осуществляли не менее чем в трех повторностях.

Для CAPS-маркеров использовали ферменты фирмы «СибЭнзим»; рестрикцию проводили в течение ночи согласно протоколам фирмы-изготовителя. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 2 % агарозных гелях в буфере TBE с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в УФ-свете.

При молекулярном скрининге в выборку были включены дополнительные образцы, для которых наличие определенных маркеров описано в литературе. Для генов нематодоустойчивости *H1* и *Gro1-4* положительными контролями служили соответственно сорт Sante и клон i-144844 образца k-12403 *S. gourlayi* (Limantseva et al., 2014). Для генов, контролирующей устойчивость к вирусам, использовали сорта: Amado и Ania – для *Ry_{sto}* (Song, Schwarzfischer, 2008; Valkonen et al., 2008), Saikai 35 – для

Table 1. DNA markers used in molecular screening

Gene	Chromosome	Source of the alien gene in the breeding material according to literature	Marker	T ^o m	Diagnostic fragment (bp)	Reference
Potato virus Y						
<i>Ry_{sto}</i>	XII	sto	YES3-3A	55	341	Song, Schwarzfischer, 2008
<i>Ry-f_{sto}</i>	XII	sto	GP122-406/EcoRV	52	406	Flis et al., 2005; Valkonen et al., 2008
<i>Ry_{adg}</i>	XI	adg	RYSC3	60	321	Kasai et al., 2000
<i>Ry_{chc}</i>	IX	chc	Ry364	55	298	Mori et al., 2012
Potato virus X						
<i>Rx1</i>	XII	adg	PVX	58	1230	Ohbayashi et al., 2010; Mori et al., 2011
			CP60/Ddel	58	350	Bendahmane et al., 1997; Gebhardt et al., 2006
			5Rx1	62	186	Ahmadvand et al., 2013
<i>Rx2</i>	V	acl	106Rx2	66	543	»
<i>G. pallida</i> (pathotypes Pa2, Pa3)						
<i>Gpa2</i>	XII	adg	Gpa2-1	60	1120	Asano et al., 2012
			Gpa2-2	60	452	»
<i>G. pallida</i> (pathotypes Pa2, Pa3) и <i>G. rostochiensis</i> (pathotype Ro5)						
<i>Grp1</i>	V	Неизвестен	TG432/Rsal	66	1900	Asano et al., 2012
<i>G. rostochiensis</i> (pathotypes Ro1 and Ro4)						
<i>H1</i>	V	adg	57R	60	450	Schultz et al., 2012
			TG 689	55	141	Milczarek et al., 2011
			N146	55	506	Takeuchi et al., 2008; Mori et al., 2011
			N195	55	337	
			239E4left/Alul	51	120 + 230	Bakker et al., 2004
<i>Gro1-4</i>	VII	spg	Gro1-4	58	602	Gebhardt et al., 2006
<i>Phytophthora infestans</i>						
<i>QTL R1</i>	V	dms	R1	65	1400	Ballvora et al., 2002; Mori et al., 2011
<i>R3a</i>	XI	dms	RT-R3a	56	982	Huang et al., 2005
<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
			1/1'	50	213	Colton et al., 2006

T_m, annealing temperature. Three-letter species notation: adg, *S. tuberosum* ssp. *andigenum*; acl, *S. acaule*; blb, *S. bulbocastanum*; chc, *S. chacoense*; dms, *S. demissum*; spg, *S. spegazzinii*; sto, *S. stoloniferum*; tbr, *S. tuberosum*; ver, *S. verrucosum*.

Table 2. Varieties and hybrids with genetic material of *S. stoloniferum* detected in molecular screening

Locus	Organelle	Marker	Primer	T ^o m	Restrictase	Reference
<i>ndhC/trnV</i>	хл	T	H1	55	–	Hosaka, 2003; Hosaka, Sanetomo, 2012
<i>rps16/trnQ</i>	хл	S	NTCP6	58	–	Bryan et al., 1999; Hosaka, Sanetomo, 2012
<i>cemA</i>	хл	SAC	SAC	60	BamHI	Hosaka, Sanetomo, 2012
<i>rpl32/ccsA</i>	хл	A	A	60	BamHI	»
<i>rps 10</i>	мт	ALM4/5	ALM4/5	55	–	Lössl et al., 2000; Hosaka, Sanetomo, 2012
<i>Band1</i>	мт	D	Band1-F11/R6	60	–	Hosaka, Sanetomo, 2012

Ry_{chc} (Mori et al., 2011), Эффект – для Ry_{adg} (Бирюкова и др., 2015), Cara и Sante – для $Rx1$, сорт White Lady – для $Rx2$ (Ahmadvand et al., 2013).

Данные молекулярного скрининга сопоставлялись с результатами Государственного испытания сортов на устойчивость к *G. rostochiensis* (патотип Ro1) (<http://reestr.gossort.com/>) и с данными каталогов сортов разных лет об устойчивости сортов к вирусным болезням, а также с другими опубликованными источниками.

Секвенирование ДНК. Продукты амплификации выделяли из ПЦР-смеси с помощью наборов фирмы «Евроген» и секвенировали по методу Сенгера в ЦКП «Геномные технологии и клеточная биология» (ВНИИСХМ). В качестве референсных использовали последовательность AY426259.1 гена *Rpi-blb1* дикого вида *S. bulbocastanum* (van der Vossen et al., 2003) и гомологичную последовательность EU884422.1 гена *Rpi-sto1* *S. stoloniferum* (Vleeshouwers et al., 2008). Выравнивание полученных последовательностей и их анализ проводили с помощью программы MEGA Version 7.0.

Изучение полевой устойчивости листьев к фитофторозу. Многолетние данные по устойчивости к фитофторозу, полученные авторами сортов, были дополнены результатами изучения, проведенного в 2016 и 2017 гг. на экспериментальном поле ВИР (г. Пушкин, Ленинградская область). Оценка проводилась методом, описанным в Siezka (2001). Полевые наблюдения осуществляли каждые пять дней с начала появления инфекции на контрольных неустойчивых сортах по 9-балльной шкале, где 9 – отсутствие симптомов болезни, 1 – целиком пораженное растение. В качестве стандартов использовали растения межвидового гибрида NZ-2010-N6-17 (высокоустойчивый), а также сортов Аврора (умеренно устойчивый) и Dorisa (чувствительный). Полевые сезоны 2016 и 2017 гг. характеризовались сильным распространением инфекции *Phytophthora infestans*, близким к эпифитотии, чему способствовало обильное выпадение осадков, значительно превышавшее многолетние нормы. Появление симптомов фитофтороза на растениях в оба года отмечали в начале июля. Распространение инфекции происходило интенсивно, и уже к концу июля было поражено более половины сортов коллекции ВИР. В этой связи данные проведенной оценки фитофтороустойчивости растений в 2016 и 2017 гг. можно рассматривать как высокодостоверные.

Оценка фертильности сортов и гибридов. Фертильность пыльцы оценивали ацетокарминовым методом (Паушева, 1988), подсчитывая не менее 300 пыльцевых зерен на образец. Препараты окрашенных пыльцевых зерен анализировали под световым микроскопом Axio Scope A1 (ZEISS, Германия) при увеличении $\times 200$. Кроме того, проводили оценку скрещиваемости образцов, используя в качестве опылителей сорта с разными типами цитоплазм.

Результаты и обсуждение

MAS с маркерами R-генов, детерминирующих устойчивость к Y и X вирусам картофеля

PVY и PVX – наиболее распространенные и вредоносные вирусы, поражающие картофель. Одним из эффективных

и экологически безопасных методов защиты возделываемого картофеля от разных штаммов этих вирусов является интрогрессия в селекционный материал R-генов сверхустойчивости (extreme resistance – ER), доминантные аллели которых ингибируют развитие патогенов в инфицированных тканях растений (Solomon-Blackburn, Barker, 2001). В результате межвидовой гибридизации в селекционный материал от диких и культурных видов картофеля были перенесены следующие гены ER-устойчивости к PVY и PVX: Ry_{chc} (IX) – от *S. chacoense*, Ry_{sto} и $Ry_{f_{sto}}$ (картированные в одном и том же районе хромосомы XII) – от *S. stoloniferum*, Ry_{adg} (XI) и $Rx1$ (XII) – от *S. tuberosum* ssp. *andigenum*, $Rx2$ (V) – от *S. acaule* (см. обзоры (Simko et al., 2007; Tiwari et al., 2012; Gebhardt, 2013; Ramakrishnan et al., 2015)). В настоящем исследовании использовано восемь маркеров, ассоциированных с этими генами.

MAS с маркерами генов Ry_{sto} , $Ry_{f_{sto}}$, Ry_{chc} , Ry_{adg} . Маркеры YES3-3A₃₄₁ и GP122-406/EcoRV₄₀₆, тесно сцепленные с генами Ry_{sto} и $Ry_{f_{sto}}$, были детектированы только у двух сортов – Гусар и Сударыня (см. Приложение 1) и у контрольного сорта Amado. Маркеры двух других генов – Ry_{adg} и Ry_{chc} , контролирующих ER-устойчивость к PVY, в анализируемой выборке выявлены не были, за исключением контрольных сортов Эффект и Saikai 35 соответственно.

MAS с маркерами гена $Rx2$, интрогрессированного в сорта от *S. acaule*. Диагностический фрагмент маркера 106Rx2 (543 п. о.) был обнаружен у контрольного сорта White Lady и у образцов анализируемой выборки: Гусар, Евразия, Русская красавица, 1101/10, Майский цветок, Наяда, Очарование, Сказка, Чародей, Чароит, гибрид vtn \times гибрид 390 (см. Приложение 1). Согласно информации о родословных, *S. acaule* участвовал в создании многих сортов и гибридов, однако корреляции между детекцией маркера 106Rx2₅₄₃ и наличием *S. acaule* в родословных не выявлено.

MAS с маркерами гена $Rx1$. У обоих контрольных сортов Cara и Sante, имеющих доминантный аллель гена $Rx1$, были выявлены диагностический фрагмент аллель-специфичного маркера 5Rx1 (186 п. о.) и CAPS-маркер CP60/DdeI₃₅₀, который находится на расстоянии 0.02 cM от гена $Rx1$ (XII) (Rouppé van der Voort et al., 1999). Маркер PVX амплифицировался только у сорта Sante (в двух из трех проведенных повторностей). Кроме нестабильной амплификации, маркер PVX проявлял недостаточную специфичность, поскольку был выявлен и у сорта White Lady, несущего доминантный аллель гена $Rx2$.

В пределах изучаемой выборки результаты молекулярного скрининга с маркерами 5Rx1 и PVX полностью совпали (см. Приложение 1). Эти маркеры были детектированы у пяти сортов: Алый парус, Даная, Оредежский, Сириновый туман, Чароит. Отметим, что у каждого из них в родословных участвовали зарубежные сорта – либо иммунные (Saco – у сорта Чароит, Saphir – у сорта Оредежский), либо высокоустойчивые к вирусу X (Latona – у сорта Сириновый туман, Omega – у сорта Даная, Latona и Omega – у сорта Алый парус).

Диагностический фрагмент CP60/DdeI₃₅₀ был обнаружен у 10 образцов: сортов Белогорский ранний, Даная, Евразия, Гусар, Лига, Наяда, Чароит и гибридов 1101/10,

2103/7 и 211/9 (см. Приложение 1). Только у двух сортов – Даная и Чароит – одновременно детектированы все три маркера гена *Rx1* (CP60/DdeI, PVX, 5Rx1). Результаты MAS с CAPS-маркером CP60/DdeI представляются менее надежными, следует учитывать, что эффективность использования данного маркера может быть снижена из-за рекомбинационных событий.

У сорта Чароит одновременно выявлены доминантные аллели обоих генов – *Rx1* и *Rx2*, детерминирующих сверхустойчивость к PVX.

MAS с маркерами генов устойчивости к цистообразующим нематодам

Информация о наличии в селекционном материале маркеров генов устойчивости к цистообразующим нематодам – объектам внутреннего и внешнего карантина, имеет особое значение, поскольку возможности проведения отбора устойчивых к этим патогенам генотипов с использованием фитопатологических методов ограничены.

MAS с маркерами гена *Gpa2*. Аллельный состав гена *Gpa2*, контролирующего устойчивость к бледной картофельной нематоды (патотипы Pa2, Pa3), проанализирован с использованием двух аллельспецифичных маркеров – *Gpa2-1* и *Gpa2-2*, разработанных Asano et al. (2012). Результаты скрининга для обоих маркеров в целом совпали: доминантный аллель гена *Gpa2* имели только пять из 33 сортов. Оба маркера – *Gpa2-1* и *Gpa2-2* обнаружены у сортов Даная, Оредежский, Сиреневый туман, Чароит. У сорта Алый парус выявлен только маркер *Gpa2-2* (см. Приложение 1).

MAS с маркерами генов *Gro1-4* и *H1*. Маркеры генов *Gro1-4* и *H1*, детерминирующих устойчивость растений к *G. rostochiensis* (патотипы Ro1 и Ro4), были использованы нами ранее (Антонова и др., 2016; Клименко и др., 2017) в молекулярном скрининге более чем 200 отечественных сортов, созданных в различных селекционных центрах нашей страны; в эту выборку входили и некоторые сорта селекции ЛенНИИСХ «Белогорка». Результаты настоящей работы в целом подтверждают опубликованные нами данные. Однако для двух сортов – Ломоносовский и Рождественский – результаты молекулярного скрининга с маркерами гена *H1* (см. Приложение 1) отличались от полученных ранее (Антонова и др., 2016), что связано с повторным привлечением в MAS материала, прошедшего в 2017 г. дополнительную верификацию по морфологическим признакам.

Суммарно из 39 образцов выборки 15 обладают доминантным аллелем гена *H1*, два (сорт Сударыня и гибрид 1604/16) имеют доминантные аллели обоих генов *H1* и *Gro1-4*, у оставшихся 22 генотипов не выявлено ни одного маркера этих генов (см. Приложение 1).

Сопоставление результатов MAS с данными Государственного испытания сортов на устойчивость к *G. rostochiensis* (патотип Ro1) показало, что все изученные образцы с маркерами гена *H1* относятся к нематодоустойчивым, а у сортов, поражаемых *G. rostochiensis*, эти маркеры отсутствовали.

Два сорта – Алый парус и Даная – одновременно несут доминантные аллели генов *H1* и *Gpa2*, детерминирующих устойчивость к двум видам цистообразующих нематод –

G. rostochiensis (патотипы Ro1, Ro4) и *G. pallida* (патотипы Pa2, Pa3) соответственно.

Дополнительно изучали наличие у образцов выборки маркера TG432/RsaI₁₉₀₀ гена *Grp1*, детерминирующего устойчивость к обоим видам цистообразующих нематод – *G. pallida* (патотипы Pa2, Pa3) и *G. rostochiensis* (патотип Ro5) (Finkers-Tomczak et al., 2009). Диагностический фрагмент маркера TG432/RsaI – 1900 п. о. – был выявлен у сортов Оредежский и Сиреневый туман, имеющих и маркеры гена *Gpa2*, однако отсутствовал у других сортов с маркерами этого гена (Алый парус, Даная, Чароит). В то же время маркер TG432/RsaI₁₉₀₀ был детектирован у сортов Лига, Загадка Питера и Чародей, у которых маркеры *Gpa2-1* и *Gpa2-2* отсутствовали.

MAS с маркерами генов устойчивости к фитофторозу

Известно большое число генетических факторов, вовлеченных в контроль устойчивости растений картофеля к фитофторозу (Simko et al., 2007; Tiwari et al., 2013; Ramakrishnan et al., 2015; Haverkort et al., 2016). В нашей работе использованы маркеры лишь нескольких генов (см. табл. 1), которые, согласно литературным данным, могли быть интрогрессированы в селекционный материал от мексиканских полиплоидных видов *S. stoloniferum* и *S. demissum*, принимавших участие в создании большинства изученных сортов (см. Приложение 1).

MAS с маркерами генов *R1* и *R3a* расоспецифичной устойчивости к *P. infestans*. Маркеры генов *R1* и/или *R3a* были выявлены у 28 образцов изученной выборки, за исключением сортов Алый парус, Весна белая, Гатчинский, Евразия, Жемчужина, Майский цветок, Русская красавица, Столовый 19, Холмогорский и гибрида 2103/7 (см. Приложение 1).

MAS с маркерами генов *Rpi-sto1* и *Rpi-blb1* устойчивости к широкому спектру рас возбудителя фитофтороза. Маркер *Rpi-sto1* (ген *Rpi-sto1*) обнаружен у трех сортов (Балтийский, Евразия, Сударыня) и двух гибридов – 1604/16 и 1101/10. Одновременно у этих образцов был выявлен и маркер *blb1F/R* (см. Приложение 1). У всех пяти образцов с маркерами *Rpi-sto1* и *blb1F/R* в родословных присутствует гибрид 8889/3 (или его потомки – 943/6 и 943/9), созданный с участием *S. stoloniferum* (табл. 3, Приложение 2). Анализ нуклеотидных последовательностей ампликонов, полученных с праймерами *blb1F/R* у сортов Евразия, Сударыня и гибридов 1101/10, 1604/16, показал их 100 % идентичность соответствующему участку референсных последовательностей AY426259.1 и EU884422.1. Результаты дополнительной ПЦП с праймерами 1/1' показали наличие у всех пяти образцов последовательности 18 п. о., характерной для активной копии гена *Rpi-blb1* (*RB*) (Colton et al., 2006). У сортов, полученных на основе других межвидовых гибридов с *S. stoloniferum*, маркеры *Rpi-sto1* и *blb1F/R* не выявлены.

Как известно, гены *Rpi-blb1* и *Rpi-sto1* являются ортологами, их последовательность высоко гомологичны (van der Vossen et al., 2003; Wang et al., 2008). Поэтому представляется вероятным, что маркер, разработанный для гена *Rpi-blb1* у мексиканского вида *S. bulbocastanum*, одновременно детектирует и ген *Rpi-sto1*.

Оценка полевой устойчивости сортов к фитофторозу

Среди сортов, находившихся в двухлетнем изучении (2016–2017) в условиях сильного распространения инфекции *P. infestans*, к концу периода вегетации фактически не имели симптомов поражения фитофторозом Балтийский, Очарование и Сударыня. Слабые симптомы болезни в эти сроки отмечены на растениях сортов Арина, Гусар, Русская красавица и Сказка (устойчивость от 7.0 до 6.0 баллов). Умеренно устойчивыми были растения сортов Елизавета, Жемчужина, Наяда, Памяти Осиповой, Рождественский, Чародей, Евразия, Белогорский ранний, Гатчинский с оценкой от 5.9 до 5.0 баллов.

Практически все эти сорта (за исключением Гатчинского и Русской красавицы) имели маркеры генов *R1*, *R3a* и/или *Rpi-sto1*, *Rpi-blb1*, однако их устойчивость может быть обусловлена и другими генами, которые не были включены в MAS.

Остальные сорта оценивали как восприимчивые (от 1 до 4 баллов). Среди восприимчивых сильное поражение ботвы, оцениваемое от 1 до 3 баллов, отмечено у сортов Весна белая, Даная, Лига и Холмогорский.

MAS с маркерами разных типов цитоплазм.

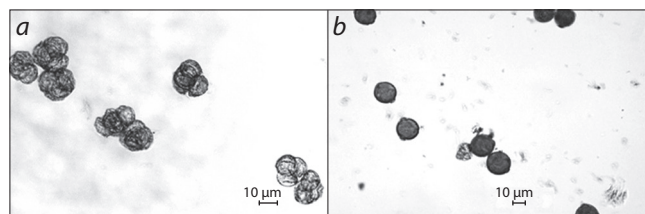
Определение фертильности пыльцы у сортов и гибридов

Согласно результатам молекулярного скрининга с маркерами из набора (Hosaka, Sanetomo, 2012), в анализируемой выборке не обнаружены образцы с фертильными Р- и А-типами цитоплазм. У 39 образцов были выявлены разные типы стерильных цитоплазм: у 9 образцов – Т, у 26 – D и у 4 образцов – W/gamma-тип (см. Приложение 1). Однако среди сортов с D- и T-типами цитоплазм были выделены генотипы с высоким уровнем фертильности пыльцы (см. Приложение 1). Часть из них можно отнести к эффективным опылителям – высокий показатель завязываемости ягод с большим числом семян отмечен в контролируемых скрещиваниях при использовании в качестве опылителей сортов с D- (Алый Парус, Наяда, Русская красавица, Сириновый туман, Чародей, Чароит) и T- (Балтийский и Вдохновение) типами цитоплазм. Можно предполагать наличие у этих сортов доминантных аллелей генов восстановления фертильности (Анисимова, Гавриленко, 2017).

Все генотипы с W/gamma-типом цитоплазмы (Гусар, Евразия, Сударыня, гибрид 1604/16) проявляли мужскую стерильность. Только у них обнаружена «тетрадная стерильность», когда распада тетрад не наблюдается и микроспоры не освобождаются из тетрад (см. рисунок, а). В результате принудительного самоопыления ягодообразование на растениях этих образцов не наблюдалось, и в дальнейших скрещиваниях они используются только как материнские формы.

Анализ родословных сортов

Многие сорта и гибриды анализируемой выборки создавались на протяжении нескольких десятилетий (до 40 лет), поэтому в ряде случаев информация о родословных требовала уточнений. Совместное использование маркеров разных типов цитоплазм и маркеров R-генов позволяет



Pollen pubescence in (a) sterile and (b) fertile plants:

(a) Tetrad sterility in hybrid 1604/16 (W/gamma cytoplasm); (b) Stained pollen in hybrid 1101/10 (D cytoplasm).

прояснить родословные сортов, а также определить доноров R-генов и доноров разных типов цитоплазм.

Как отмечалось выше, образцов с фертильным Р-типом цитоплазмы в анализируемой выборке не обнаружено. Такой результат был неожиданным, поскольку, согласно данным авторов сортов Алым парус, Вдохновение, Загадка Питера, Лига, Русская красавица, Сириновый туман, Снегирь, Чародей, по материнской линии эти сорта ведут свое начало от тетраплоидного образца 175-13 *S. phureja* – диплоидного культурного вида, для которого характерен фертильный Р-тип цитоплазмы (Р-тип пластид и beta-тип митохондрий (Hosaka, Sanetomo, 2012, 2014)). Соответственно, у потомков *S. phureja* по материнской линии также предполагалось наличие цитоплазмы Р-типа (см. Приложение 2, сорт Вдохновение). Однако перечисленные выше восемь сортов имели либо D-, либо T-тип цитоплазмы (см. Приложение 1).

Анализ ДНК образца 175-13 *S. phureja*, выделенной из семян, хранившихся более 50 лет, показал отсутствие у него Р-типа цитоплазмы. Пластиды относились к W-типу, мтДНК амплифицировать не удалось.

Сорта с генетическим материалом *S. stoloniferum*.

Согласно литературным данным, W/gamma-тип и ассоциированная с ним тетрадная стерильность встречаются у европейских сортов, созданных на основе лишь нескольких образцов мексиканского вида *S. stoloniferum*, образцы которого являлись источником сверхустойчивости к PVY и в начальных скрещиваниях выступали в роли материнских форм. В свою очередь, использование в дальнейшем селекционном процессе иммунных к PVY сортов и гибридов с геном *Ry_{sto}* привело к широкому распространению среди европейских сортов стерильной цитоплазмы W/gamma-типа (Lössl et al., 2000; Song, Schwarzfischer, 2008; Sanetomo, Gebhardt, 2015). В то же время W/gamma-тип цитоплазмы среди коллекционных образцов *S. stoloniferum* встречается не часто, более распространен у них D-тип (Sanetomo, Hosaka, 2013). Среди образцов *S. stoloniferum* с D-типом цитоплазмы удалось выделить фертильные генотипы, которые в межвидовых скрещиваниях проявляли себя как эффективные опылители (Зотеева и др., 2017).

В родословных большинства (27 из 39) образцов анализируемой выборки также участвовал *S. stoloniferum* (см. Приложение 1), однако W/gamma-тип обнаружен лишь у сортов Гусар, Евразия, Сударыня и у гибрида 1604/16. Ядерные маркеры генов *S. stoloniferum* – *Ry_{sto}* и *Ry_{f_{sto}}* – детектированы у сортов Гусар и Сударыня, маркеры

Table 3. Varieties and hybrids with genetic material from *S. stoloniferum* detected by molecular screening

Variety or hybrid	Cytoplasm type	Markers of <i>R</i> genes detected in molecular screening in the analyzed accessions				Parental forms (cytoplasm type)	
		YES3-3A/ <i>Ry_{sto}</i>	GP122-406/ <i>Ry-f_{sto}</i>	<i>Rpi-sto1/Rpi-sto1</i>	<i>blb1/Rpi-blb1</i>	♀	♂
Gusar	W/gamma	+	+	-	-	Arosa (W/gamma)	Vdokhnovenie (T)
Sudarynya	W/gamma	+	+	+	+	89181/6	8889/3
Evraziya	W/gamma	-	-	+	+	95100/27	943/9 (T)
1604/16	W/gamma	-	-	+	+	95100/27	943/6 (T)
1101/10	D	-	-	+	+	Чародей (D)	943/6 (T)
Baltiyskiy (=943/9)	T	-	-	+	+	Ласунак	8889/3

Hybrid 8889/3 was derived from species *adg*, *dms*, and *sto* (Evdokimova, Kalashnik, 2013). It is parental to hybrids 943/6 and 943/9. Hybrid 95100/27 was derived from species *adg*, *dms*, and *sto*. Hybrid 68(65)-8 was derived from species *dms*, *sto*, and *tbr*.

Rpi-sto1 и *blb1F/R* – у Сударыня, Евразия, Балтийский и у гибридов 1604/16 и 1101/10 (см. табл. 3, Приложения 1 и 2). Анализ родословных показал, что перечисленные выше образцы являются потомками разных (с мужской стерильностью и фертильностью) межвидовых гибридов и сортов, созданных на основе *S. stoloniferum*, которые использовались в скрещиваниях или как материнские, или как отцовские формы (см. табл. 3, Приложения 2 и 3). Информация родословных подтверждает передачу по материнской линии стерильного типа цитоплазмы W/gamma от *S. stoloniferum* сортам Гусар, Евразия и гибриду 1604/16 (см. табл. 3). Так, материнской формой сорта Гусар был немецкий сорт Arosa, который послужил донором признака мужской стерильности W/gamma-типа. В свою очередь сорту Arosa W/gamma-тип был передан от материнской формы – клона MPI 54.4129/288(208), происходящего от гибрида *S. stoloniferum* × Erika (см. Приложение 3). Наличие у сорта Arosa маркера YES3-3A, сцепленного с геном *Ry_{sto}*, было показано ранее (Song, Schwarzfischer, 2008), и, согласно нашим данным, этот маркер был унаследован сортом Гусар. От своей отцовской формы – сорта Вдохновение – Гусар получил доминантные аллели генов *H1* и *R1*.

Гибрид 1604/16 и сорт Евразия были отобраны в комбинациях скрещиваний, в которых материнской формой был иммунный к PVY немецкий сорт Barbara (W/gamma-тип), донором стерильной W/gamma-цитоплазмы которого, в свою очередь, послужил клон MPI 64.956/68, происходящий от гибрида *S. stoloniferum* × Frühmolle (см. Приложение 2). У сорта Barbara были выявлены маркеры YES3-3A и YES3-3B гена *Ry_{sto}* (Song, Schwarzfischer, 2008) и CAPS-маркер GP122/EcoRV гена *Ry-f_{sto}* (Flis et al., 2005). Однако гены сверхустойчивости к PVY не были переданы от сорта Barbara ни гибриду 1604/16, ни сорту Евразия. В то же время оба эти образца имели маркер *Rpi-sto1* (см. табл. 3, Приложение 3).

Нам не удалось включить в MAS сорт Barbara, однако мы проанализировали ряд немецких сортов (Forelle, Kuba, Kuras, Maxi), имеющих общее происхождение с Barbara (Song, Schwarzfischer, 2008). Ни у одного из них маркер *Rpi-sto1* (как и маркер *blb1F/R*) не обнаружен. Поэтому мы полагаем, что маркеры *Rpi-sto1* и *blb1F/R* в анализируемом материале получены от гибридов 8889/3 и 943/9,

созданных с участием *S. stoloniferum* и использованных в скрещиваниях в качестве опылителей. Именно поэтому сорта и гибриды, выведенные с их участием, несут разные типы цитоплазм (W/gamma, D, T), которые соответствуют цитоплазме различных материнских форм (см. табл. 3, Приложение 2).

Сорта с генетическим материалом *S. demissum*. У 26 из 39 образцов был выявлен D-тип цитоплазмы, характерный для вида *S. demissum*. Как известно, этот тип был интрогрессирован в селекционные сорта от *S. demissum* вместе с *R*-генами расоспецифической устойчивости к фитофторозу *R1-R11* (Ross, 1986; Sanetomo, Hosaka, 2013; Tiwari et al., 2013; Haverkort et al., 2016).

В анализируемой выборке фактически все сорта и гибриды с D-типом цитоплазмы также являются производными от *S. demissum* или от сортов, выведенных на основе этого вида (см. Приложение 1). Подавляющее большинство из них (18 из 26) имеют маркеры генов расоспецифической устойчивости к фитофторозу – *R1*, *R3a*. У сортов Весна белая, Русская красавица, Холмогорский генов *R1*, *R3a* не выявлено, однако участие в их создании *S. demissum* подтверждается наличием у них D-типа цитоплазмы.

Присутствие маркеров генов *R1* и/или *R3a* у семи сортов с T-типом цитоплазмы (см. Приложение 1) можно объяснить тем, что донорами данных генов в их родословных выступили фертильные формы с цитоплазмой D-типа, использованные в качестве опылителей, например гибриды 68(65) и 1101/10 (см. рисунок, б). Это является дополнительным доказательством встречаемости растений с мужской фертильностью среди образцов с D-типом цитоплазмы.

Заключение

В Государственный реестр селекционных достижений 2017 г. входят 26 сортов, возделываемых на северо-западе РФ и в других регионах нашей страны, которые были выведены в разные годы селекционерами ЛенНИИСХ «Белогорка» и ООО Селекционная фирма «ЛиГа». Наряду с устойчивостью к важнейшим патогенам, эти сорта обладают хорошей формой клубней, поверхностными глазками и отличными вкусовыми качествами (Государственный реестр..., 2017).

Генетически разнообразные сорта и гибриды, созданные на основе многовидовой гибридизации, обладают доминантными аллелями генов устойчивости к важнейшим патогенам. Важно отметить, что селекционерам удалось получить фертильные гибриды и сорта, несущие генетический материал мексиканских полиплоидных видов – *S. stoloniferum* и *S. demissum* (например, гибриды 8889/3, 68(65)-8, 943/6, 943/9). Использование в скрещиваниях гибридов с мексиканскими полиплоидными видами не только в качестве материнских форм, но и одновременно в качестве опылителей, увеличило вероятность интрогрессии в селекционный материал генетического материала *S. stoloniferum* и *S. demissum*. Отметим, что в большинстве зарубежных селекционных программ эти дикие виды и их гибриды применялись в качестве материнских форм (Dionne, 1961; Janssen et al., 1997).

Информация о наличии у гибридов и сортов маркеров генов устойчивости к разным патогенам и о типах цитоплазм позволит эффективно реализовывать дальнейшие селекционные программы, в том числе направленные на пирамидирование *R*-генов. Наиболее перспективны для дальнейшего селекционного процесса следующие сорта и гибриды:

- сорта Алюй парус и Даная обладают доминантными аллелями генов *H1* и *Gpa2*, детерминирующих устойчивость к обоим видам цистообразующих нематод – *G. rostochiensis* (патотип Ro1) и *G. pallida* (патотипы Pa2, Pa3) соответственно, а также доминантным аллелем гена *Rx1* (сверхустойчивость к PVX). Гены *Gpa2* и *Rx1* картированы на хромосоме XII в одном и том же локусе (van der Vossen et al., 2000), что увеличивает вероятность их совместной передачи потомству;
 - сорта Гусар и Сударыня несут маркеры генов устойчивости к вирусам PVY (*Ry_{sto}*, *Ry-f_{sto}*) и PVX (Гусар), а также обладают доминантными аллелями генов устойчивости к *G. rostochiensis* (патотип Ro1);
 - выделены генотипы с маркерами генов *Rpi-sto1*, *Rpi-blb1*; планируются дальнейшие комплексные исследования, в том числе анализ расщепляющихся популяций, полученных на основе выделенного материала.
- Сорта Гусар, Сударыня, гибрид 1604/16 в дальнейших скрещиваниях могут использоваться только в качестве материнских форм, тогда как сорт Алюй парус и гибрид 1101/10 – также в качестве опылителей.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Science Foundation, project 16-16-04125.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Ahmadvand R., Wolf I., Gorji A.M., Polgár Z., Taller J. Development of molecular tools for distinguishing between the highly similar *Rx1* and *Rx2* PVX extreme resistance genes in tetraploid potato. *Potato Res.* 2013;56(4):277-291. DOI 10.1007/s11540-013-9244-y.

Anisimova I.N., Gavrilenko T.A. Cytoplasmic male sterility and prospects for its utilization in breeding, genetic studies and seed production of potato. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):83-95. DOI 10.18699/VJ17.226.

Antonova O.Y., Shvachko N.A., Novikova L.Y., Shuvalov O.Y., Kostina L.I., Klimenko N.S., Shuvalova A.R., Gavrilenko T.A. Genetic diversity of potato varieties bred in Russia and near-abroad countries based on polymorphism of SSR-loci and markers associated with resistance *R*-genes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):596-606. DOI 10.18699/VJ16.181 (in Russian)

Asano K., Kobayashi A., Tsuda S., Nishinaka M., Tamiya S. DNA marker-assisted evaluation of potato genotypes for potential resistance to potato cyst nematode pathotypes not yet invading into Japan. *Breed. Sci.* 2012;62(2):142-150. DOI 10.1270/jsbbs.62.142.

Asano K., Tamiya S. Breeding of pest and disease resistant potato cultivars in Japan by using classical and molecular approaches. *JARQ.* 2016;50(1):1-6.

Bakker E., Achenbach U., Bakker J., Vliet J., Peleman J., Segers B., Heijden S., Linde P., Graveland R., Hutten R., Eck H., Coppoolse E., Vossen E., Bakker J., Govers A. A high-resolution map of the *H1* locus harbouring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Theor. Appl. Genet.* 2004;109:146-152. DOI 10.1007/s00122-004-1606-z.

Ballvora A., Ercolano M.R., Weiss J., Meksem K., Bormann C.A., Oberhagemann P., Salamini F., Gebhardt C. The *R1* gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. *Plant J.* 2002;30:361-371. DOI 10.1046/j.1365-3113X.2001.01292.x.

Bendahmane A., Kanyuka K., Baulcombe D.C. High-resolution genetical and physical mapping of the *Rx* gene for extreme resistance to potato virus X in tetraploid potato. *Theor. Appl. Genet.* 1997;95:153-162. DOI 10.1007/s001220050543.

Biryukova V., Shmyglya I., Abrosimova S., Zapekina T., Meleshin A., Mityushkin A., Manankov V. Molecular marker-based search for sources of genes for resistance to pathogens among accessions of breeding-genetic collections of the All-Russia Research Institute of Potato Farming. *Zashhita kartofelya* = Potato Protection. 2015;1:3-7. (in Russian)

Bryan G.J., McNicoll J., Ramsay G., Meyer R.C., DeJong W.S. Polymorphic simple sequence repeat markers in chloroplast genomes of Solanaceous plants. *Theor. Appl. Genet.* 1999;99:859-867. DOI 10.1007/s001220051306.

CABI/EPPPO. *Synchytrium endobioticum*. Distribution maps of plant diseases. 2015. Available at <http://www.cabi.org>.

Colton L.M., Groza H.I., Wielgus S.M., Jiang J. Marker-assisted selection for the broad-spectrum potato late blight resistance conferred by gene *RB* derived from a wild potato species. *Crop Sci.* 2006;46:589-594. DOI 10.2135/cropsci2005.0112.

Dionne L.A. Cytoplasmic sterility in derivatives of *Solanum demissum*. *Am. Potato J.* 1961;38:117-120.

Evdokimova Z.Z. Creation of high-performance early-ripening potato varieties of a new generation, resistant to late blight and environmental stress factors. *Materialy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Aktual'nye problemy sovremennoy industrii proizvodstva kartofelya»* [Proceedings of the Research and Practical Conference “Urgent Problems of Present-Day Potato Industry”]. Cheboksary, 2010;49-53. (in Russian)

Evdokimova Z.Z., Kalashnik M.V. Use of the genetic resources of complex interspecies hybrids in potato breeding. *Kartofelevodstvo. Sbornik nauchnykh trudov* [Potato Farming: Collection of Research Papers]. Minsk, 2013;21:161-168. (in Russian)

Evdokimova Z.Z., Kalashnik M.V. Search for sources of late blight resistance and other economically valuable traits among complex interspecific potato hybrids. *Materialy Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii «Sovremennye problemy i strategiya razvitiya agrarnoy nauki Evropeyskogo Severa Rossii»* [Proceedings of the International Research Conference “Current Issues and Strategy of Development of the Agrarian Science in northern European Russia”]. Petrozavodsk, 2015;75-80. (in Russian)

Evdokimova Z.Z., Kalashnik M.V. Potential of complex interspecific potato hybrids in resistance to diseases and other economically

- valuable traits. Trudy Kubanskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo universiteta = Works of the Kuban State Agrarian University. 2016;3(60):73-76. (in Russian)
- Finkers-Tomczak A., Danan S., van Dijk T., Beyene A., Bouwman L., Overmars H., van Eck H., Govers A., Bakker J., Bakker E. A high-resolution map of the *Grp1* locus on chromosome V of potato harbouring broad-spectrum resistance to the cyst nematode species *Globodera pallida* and *Globodera rostochiensis*. Theor. Appl. Genet. 2009;119:165-173. DOI 10.1007/s00122-009-1026-1.
- Flis B., Hennig J., Strzelczyk-Żyta D., Gebhardt C., Marczewski W. The *Ry_{st0}* gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistant to *Potato virus Y* maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122718 in PVY resistant potato cultivars. Mol. Breed. 2005;15(1):95-101. DOI 10.1007/s11032-004-2736-3.
- Gadzhiev N.M., Lebedeva V.A. Origin of some Belogorsk potato cultivars. Kartoffel i ovoshchi = Potatoes and Vegetables. 2010;8:21. (in Russian)
- Gadzhiev N.M., Lebedeva V.A. High plasticity of varieties that are multi-species potato hybrids. Materialy VI mezhhregional'noy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Sovremennaya industriya kartofelya: sostoyaniye i perspektivy razvitiya» [Proceedings of the 6th Interregional Research and Practical Conference "Present-day Potato Industry: State and Prospects"]. Cheboksary, 2014:39-40. (in Russian)
- Gavrilenko T., Antonova O., Shuvalova A., Krylova E., Alpatyeva N., Spooner D., Novikova L. Genetic diversity and origin of cultivated potatoes based on plastid microsatellite polymorphism. Genet. Resour. Crop Evol. 2013;60:1997-2015. DOI 10.1007/s10722-013-9968-1.
- Gebhardt C. Bridging the gap between genome analysis and precision breeding in potato. Trends Genet. 2013;29(4):248-256. DOI 10.1016/j.tig.2012.11.006.
- Gebhardt C., Bellin A., Henselewski A., Lehmann W., Schwarzfischer A., Valkonen J. Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. Theor. Appl. Genet. 2006;112:1458-1464. DOI 10.1007/s00122-006-0248-8.
- Gosudarstvennyy reestr selektsionnykh dostizheniy, dopushchennykh k ispol'zovaniyu [State Register of Breeding Achievements Approved for Use]. Available at: http://reestr.gossort.com/docs/reestr_2017.pdf. (in Russian)
- Gruzdeva L.I., Matveeva E.M. Expansion of the area of potato cyst-forming nematodes in northwestern Russia. Trudy Tsentra parazitologii = Transactions of Center for Parasitology. 2010;XLVI:71-80. (in Russian)
- Haverkort A.J., Boonekamp P.M., Hutten R., Jacobsen E., Lotz L.A.P., Kessel G.J.T., Vossen J.H., Visser R.G.F. Durable late blight resistance in potato through dynamic varieties obtained by cisgenesis: scientific and societal advances in the DuRPh Project. Potato Res. 2016;59:35-66. DOI 10.1007/s11540-015-9312-6.
- Hosaka K. T-type chloroplast DNA in *Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum* was conferred from some populations of *S. tarijense* Hawkes. Am. J. Potato Res. 2003;80:21-32.
- Hosaka K., Sanetomo R. Development of a rapid identification method for potato cytoplasm and its use for evaluating Japanese collections. Theor. Appl. Genet. 2012;125(6):1237-1251. DOI 10.1007/s00122-012-1909-4.
- Hosaka K., Sanetomo R. Application of a PCR-based cytoplasm genotyping method for phylogenetic analysis in potato. Am. J. Potato Res. 2014;91:246-253. DOI 10.1007/s12230-013-9344-x.
- Huang S., van der Vossen E.A.G., Kuang H., Vleeshouwers V.G., Zhang N., Borm T.J.A., van Eck H.J., Baker B., Jacobsen E., Visser R.G.F. Comparative genomics enabled the isolation of the *R3a* late blight resistance gene in potato. Plant J. 2005;42(2):251-261. DOI 10.1111/j.1365-3113X.2005.02365.x.
- Janssen G.J.W., van Norel A., Verkerk-Bakker B., Janssen R., Hoogenboom J. Introgression of resistance to root-knot nematodes from wild Central American *Solanum* species into *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*. Theor. Appl. Genet. 1997;95(3):490-496.
- Kasai K., Morikawa Y., Sorri V.A., Valkonen J.P.T., Gebhardt C., Watanabe K.N. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene *Ry_{adg}* based on a common feature of plant disease resistance genes. Genome. 2000;43:1-8. DOI 10.1139/g99-092.
- Khiutti A.V., Antonova O.Yu., Mironenko N.V., Gavrilenko T.A., Afanasenko O.S. Potato resistance to quarantine diseases. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):51-61. DOI 10.18699/VJ17.223. (in Russian)
- Klimenko N.S., Antonova O.Y., Kostina L.I., Mamadbokirova F.T., Gavrilenko T.A. Marker-associated selection of Russian potato varieties with using markers of resistance genes to the golden potato cyst nematode (pathotype Ro1). Trudy po prikladnoy botanike, genetike i seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. 2017;178(4):70-79.
- Lebedeva V.A. Seleksiya kartofelya na osnove mezhhvidovoy gibrizatsii: obobshchenie 60-letnego opyta nauchnoy raboty [Potato breeding involving interspecific hybridization: summary of 60 years of research experience]. SPb: Renome Publ., 2010;139. (in Russian)
- Lebedeva V.A., Gadzhiev N.M. Creation of ultra-early potato hybrids using wild species. Kartoffel i ovoshchi = Potatoes and vegetables 2011;7:21. (in Russian)
- Lebedeva V.A., Gadzhiev N.M. Experimental polyploidy and inbreeding in potato breeding for high performance and tuber quality. Zashchita kartofelya = Potato Protection. 2014;1:16-17. (in Russian)
- Lebedeva V.A., Gadzhiev N.M. Breeding for resistance to diseases and pests is a basis of environmentalization in potato production. Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Metody i tekhnologii v seleksii rasteniy i rastenievodstve» [Proceedings of the Research and Practical Conference "Methods and Technologies in Plant Breeding and Farming"]. Kirov, 2015;137-139. (in Russian)
- Lebedeva V.A., Gadzhiev N.M. More intense use of the gene pool is the main pathway for potato breeding. Kartofelevodstvo. Materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Razvitiye novykh tekhnologiy seleksii i sozdanie otechestvennogo konkurentosposobnogo semennogo fonda kartofelya» [Potato Farming. Proceedings of the International Research and Practical Conference "Development of New Breeding Technologies and Raise of a Commercially Viable Domestic Potato Seed Stock"]. Moscow, 2016: 42-45. (in Russian)
- Lebedeva N.A. Polyploids of wild potato species and hybrids with polyploids in a multi-year planting. Botanicheskiy zhurnal = Botanical Journal. 1961;6:14-15. (in Russian)
- Lebedeva N.A. Raise and use of polyploids in potato breeding. Vtoroe soveshchanie po poliploidii, Leningrad, 14-18 yanvarya 1963 g.: Tezisy dokladov [Abstracts from the 2nd Conference on Polyploidy. Leningrad January 14-18, 1963]. Leningrad, 1963;28-29.
- Limantseva L., Mironenko N., Shuvalova O., Antonova O., Khiutti A., Novikova L., Afanasenko O., Spooner D., Gavrilenko T. Characterization of resistance to *Globodera rostochiensis* pathotype Ro1 in cultivated and wild potato species accessions. Plant Breed. 2014; 133(5):660-665. DOI 10.1111/pbr.12195.
- Lössl A., Götz M., Braun A., Wenzel G. Molecular markers for cytoplasm in potato: male sterility and contribution of different plastid-mitochondrial configurations to starch production. Euphytica. 2000; 116:221-230. DOI 10.1023/A:1004039320227.
- Milczarek D., Flis B., Przetakiewicz A. Suitability of molecular markers for selection of potatoes resistant to *Globodera* spp. Am. J. Potato Res. 2011;88:245-255. DOI 10.1007/s12230-011-9189-0.
- Mori K., Mukojima N., Nakao T., Tamiya S., Sakamoto Y., Sohbaru N., Hayashi K., Watanuki H., Nara K., Yamazaki K., Ishii T., Hosaka K. Germplasm release: Saikai 35, a male and female fertile breeding line carrying *Solanum phureja*-derived cytoplasm and potato cyst nematode resistance (*H1*) and *Potato virus Y* resistance (*Ry_{chc}*) genes. Am. J. Potato Res. 2012;89:63-72. DOI 10.1007/s12230-011-9221-4.
- Mori K., Sakamoto Y., Mukojima N., Tamiya S., Naka T., Ishii T., Hosaka K. Development of a multiplex PCR method for simultaneous detection of diagnostic DNA markers of five disease and pest resistance genes in potato. Euphytica. 2011;18(3):347-355. DOI 10.1007/s10681-011-0381-6.

- Ohbayashi K., Nakata N., Chaya M., Komura K. Development of a detection method of resistance to potato disease and pest using DNA markers. I. Detection methods of resistance to potato virus X, potato cyst nematode and late blight. *Bull. Nagasaki Agri. Fore. Tech. Dev. Cen.* 2010;1:1-26.
- Osipova E.A. Potato domestication and breeding achievements. *Sbornik nauchnykh trudov SZNIISKh «Uluchshenie kul'turnykh rasteniy metodami selektsii»* [Collection of Works of the Northwestern Research Institute for Agriculture "Crop Improvement by Breeding Methods"]. 1979;233-264. (in Russian)
- Osipova E.A. Breeding of high-yield late blight-resistant potato varieties for the Non-Black Earth Area. *Byulleten VIR = Bulletin of the Institute of Plant Industry (Leningrad)*. 1980;105:41-45. (in Russian)
- Osipova E.A. Using of interspecific hybridization in potato breeding. *Chetverty s'ezd Vsesoyuznogo obshchestva genetikov i selektsionerov im. N.I. Vavilova, Kishinev, 1–5 fevralya 1982 g.: Tezisy dokladov* [Abstracts from the 4th Congress of the Vavilov All-Union Society for Geneticists and Breeders, Kishinev, February 1–5, 1982]. Kishinev, 1982;3:131-139. (in Russian)
- Pausheva Z.P. *Praktikum po tsitologii rasteniy* [Practical Course on Plant Cytology]. Moscow: Agropromizdat Publ., 1988. (in Russian).
- Ramakrishnan A.P., Ritland C., Blas Sevillano R.H., Riseman A. Review of potato molecular markers to enhance trait selection. *Am. J. Potato Res.* 2015;92(4):455-472. DOI 10.1007/s12230-015-9455-7.
- Ross H. *Potato Breeding – Problems and Perspectives*. Berlin: V.P. Parey, 1986.
- Roupe van der Voort J., Kanyuka K., van der Vossen E., Bendahmane A., Mooijman P., Klein-Lankhorst R., Stiekema W., Baulcombe D., Bakker J. Tight physical linkage of the nematode resistance gene *Gpa2* and the virus resistance gene *Rx* on a single segment introgressed from the wild species *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* CPC 1673 into cultivated potato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1999;12(3):197-206. DOI 10.1094/MPMI.1999.12.3.197.
- Sanetomo R., Gebhardt C. Cytoplasmic genome types of European potatoes and their effects on complex agronomic traits. *BMC Plant Biol.* 2015;15:162. DOI 10.1186/s12870-015-0545-y.
- Sanetomo R., Hosaka K. A recombination-derived mitochondrial genome retained stoichiometrically only among *Solanum verrucosum* Schltdl. and Mexican polyploid wild potato species. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2013;60:2391-2404. DOI 10.1007/s10722-013-0007-z.
- Schultz L., Cogan N.O.I., McLean K., Dale M.F.B., Bryan G.J., Forster J.N.W., Slater A.T. Evaluation and implementation of a potential diagnostic molecular marker for *H1*-conferred potato cyst nematode resistance in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Breed.* 2012; 131:315-321. DOI 10.1111/j.1439-0523.2012.01949.x.
- Sieczka M. Ocena odpornosci na zaraze ziemniaka w warunkach naturalnej infekcji. *Monografie i rozprawy naukowe. IHAR, Radzikow.* 2001;10:74-76.
- Simko I., Jansky S., Stephenson S., Spooner D. Genetics of resistance to pests and disease. In: Vreugdenhil D. (Ed.). *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives*. Amsterdam: Elsevier, 2007;117-155.