

Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

Учредители

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Сибирское отделение Российской академии наук

Главный редактор

В.К. Шумный – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)

Заместители главного редактора

Н.А. Колчанов – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)

Н.Б. Рубцов – д-р биол. наук, профессор (Россия)

Е.К. Хлесткина – д-р биол. наук, профессор (Россия)

Ответственный секретарь

Г.В. Орлова – канд. биол. наук (Россия)

Редакционный совет

В.С. Баранов – чл.-кор. РАН, д-р мед. наук (Россия)
Л.А. Беспалова – академик РАН, д-р с.-х. наук (Россия)
А. Бёрнер – д-р наук (Германия)
В.М. Говорун – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
И. Гроссе – д-р наук, проф. (Германия)
Г.Л. Дианов – д-р биол. наук, проф. (Великобритания)
Ю.Е. Дуброва – д-р биол. наук, проф. (Великобритания)
И.К. Захаров – д-р биол. наук, проф. (Россия)
И.А. Захаров-Гезехус – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
С.Г. Инге-Вечтомов – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
И.Е. Керкис – д-р наук (Бразилия)
А.В. Кильчевский – чл.-кор. НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)
С.В. Костров – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)
Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)
Б. Люгтенберг – д-р наук, проф. (Нидерланды)
В.И. Молодин – академик РАН, д-р ист. наук (Россия)
В.П. Пузырев – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
А.Ю. Ржецкий – канд. биол. наук, проф. (США)
И.Б. Рогозин – канд. биол. наук (США)
А.О. Рувинский – д-р биол. наук, проф. (Австралия)
К.Г. Скрябин – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
К.В. Славин – д-р наук, проф. (США)
И.А. Тихонович – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
Л.В. Хотылева – академик НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)
Э.К. Хуснутдинова – д-р биол. наук, проф. (Россия)
М.Ф. Чернов – д-р мед. наук (Япония)
С.В. Шестаков – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
Н.К. Янковский – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Редакционная коллегия

Т.Г. Амстиславская – д-р биол. наук, доцент (Россия)
Е.Е. Андронов – канд. биол. наук (Россия)
Ю.С. Аульченко – д-р биол. наук (Россия)
Д.А. Афонников – канд. биол. наук, доцент (Россия)
Л.И. Афтanas – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
Е.В. Березиков – канд. биол. наук, проф. (Россия, Нидерланды)
С.А. Боринская – д-р биол. наук (Россия)
П.М. Бородин – д-р биол. наук, проф. (Россия)
М.И. Воевода – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
Т.А. Гавриленко – д-р биол. наук, доцент (Россия)
В.Н. Даниленко – д-р биол. наук, проф. (Россия)
С.А. Демаков – д-р биол. наук (Россия)
Е.А. Долгих – канд. биол. наук (Россия)
Н.Н. Дыгало – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
С.Л. Киселев – д-р биол. наук, проф. (Россия)
В.А. Козлов – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
Ю.М. Константинов – д-р биол. наук, проф. (Россия)
А.В. Кочетов – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
О. Кребс – д-р биол. наук, проф. (Германия)
И.Н. Лаврик – канд. хим. наук (Германия)
Л.А. Лутова – д-р биол. наук, проф. (Россия)
В.Ю. Макеев – чл.-кор. РАН, д-р физ.-мат. наук (Россия)
М.П. Мошкин – д-р биол. наук, проф. (Россия)
Н.А. Проворов – д-р биол. наук (Россия)
Д.В. Пышный – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)
А.В. Ратушный – канд. биол. наук (США)
Е.А. Салина – д-р биол. наук, проф. (Россия)
М.Г. Самсонова – д-р биол. наук (Россия)
В.А. Степанов – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

Scientific Peer Reviewed Journal

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii

Founded in 1997

Published 8 times annually

Founders

Federal State Budget Scientific Institution "The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences"

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Editor-in-Chief

V.K. Shumny, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

Deputy Editor-in-Chief

N.A. Kolchanov, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

N.B. Rubtsov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

E.K. Khlestkina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

Executive Secretary

G.V. Orlova, Cand. Sci. (Biology), Russia

Editorial council

V.S. Baranov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

L.A. Bespalova, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Agricul.), Russia

A. Börner, Dr. Sci., Germany

M.F. Chernov, Dr. Sci. (Medicine), Japan

G.L. Dianov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain

Yu.E. Dubrova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain

V.M. Govorun, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

J. Le Gouis, Dr. Sci., France

I. Grosse, Professor, Dr. Sci., Germany

S.G. Inge-Vechtomov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

I.E. Kerkis, Dr. Sci., Brazil

L.V. Khotyleva, Full Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus

E.K. Khusnutdinova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

A.V. Kilchevsky, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus

S.V. Kostrov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia

B. Lugtenberg, Professor, Dr. Sci., Netherlands

V.I. Molodin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (History), Russia

V.P. Puzyrev, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

I.B. Rogozin, Cand. Sci. (Biology), United States

A.O. Ruvinsky, Professor, Dr. Sci. (Biology), Australia

A.Yu. Rzhetsky, Professor, Cand. Sci. (Biology), United States

S.V. Shestakov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

K.G. Skryabin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

K.V. Slavin, Professor, Dr. Sci., United States

I.A. Tikhonovich, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

N.K. Yankovsky, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

I.K. Zakharov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

I.A. Zakharov-Gezekhus, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

Editorial board

D.A. Afonnikov, Associate Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia

L.I. Aftanas, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

T.G. Amstislavskaya, Associate Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

E.E. Andronov, Cand. Sci. (Biology), Russia

Yu.S. Aulchenko, Dr. Sci. (Biology), Russia

E.V. Berezikov, Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia, Netherlands

S.A. Borinskaya, Dr. Sci. (Biology), Russia

P.M. Borodin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.N. Danilenko, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

S.A. Demakov, Dr. Sci. (Biology), Russia

E.A. Dolgikh, Cand. Sci. (Biology), Russia

N.N. Dygalo, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

T.A. Gavrilenko, Associate Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

S.L. Kiselev, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

A.V. Kochetov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

Yu.M. Konstantinov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.A. Kozlov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

O. Krebs, Professor, Dr. Sci. (Biology), Germany

I.N. Lavrik, Cand. Sci. (Chemistry), Germany

L.A. Lutova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.Yu. Makeev, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Physics and Mathem.), Russia

M.P. Moshkin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

N.A. Provorov, Dr. Sci. (Biology), Russia

D.V. Pyshnyi, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia

A.V. Ratushny, Cand. Sci. (Biology), United States

E.A. Salina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

M.G. Samsonova, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.A. Stepanov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

M.I. Voevoda, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

Генофонд и селекция

- 7 **ОБЗОР**
Мобилизация, сохранение и изучение генетических ресурсов культивируемого и дикорастущего картофеля
С.Д. Киру, Е.В. Рогозина
- 16 **ОБЗОР**
Межвидовая гибридизация картофеля: теоретические и прикладные аспекты
Т.А. Гавриленко, А.П. Ермашин
- 30 **ОБЗОР**
Межвидовые гибриды картофеля как доноры долговременной устойчивости к патогенам
Е.В. Рогозина, Э.Е. Хавкин
- 42 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
 S_VS_V -линии – эффективный инструмент для вовлечения в селекцию ценного генофонда 1 EVN диплоидных диких видов картофеля
А.П. Ермашин, Ю.В. Полюхович, Е.В. Воронкова, О.Н. Гукасян
- 51 **ОБЗОР**
Устойчивость картофеля к карантинным болезням
А.В. Хютти, О.Ю. Антонова, Н.В. Мироненко, Т.А. Гавриленко, О.С. Афанасенко
- 62 **ОБЗОР**
Устойчивость картофеля к вирусам: современное состояние и перспективы
С.С. Макарова, В.В. Макаров, М.Э. Тальянский, Н.О. Калинина
- 74 **ОБЗОР**
Устойчивость картофеля к тлям
Е.Е. Радченко

Перспективные направления

- 83 **ОБЗОР**
Цитоплазматическая мужская стерильность и перспективы ее использования в селекционно-генетических исследованиях и семеноводстве картофеля
И.Н. Анисимова, Т.А. Гавриленко

96

- ОБЗОР**
Достижения и перспективы использования методов высокопроизводительного секвенирования в генетике и селекции картофеля
И.В. Быкова, Н.А. Шмаков, Д.А. Афонников, А.В. Кочетов, Е.К. Хлесткина

104

- ОБЗОР**
Сделать сложное проще: современный инструментарий для редактирования генома растений
Н.Е. Злобин, В.В. Терновой, Н.А. Гребенкина, В.В. Таранов

112

- ОБЗОР**
Перспективы метаболомных исследований растений картофеля
Р.К. Пузанский, В.В. Емельянов, Т.А. Гавриленко, М.Ф. Шишова

Актуальные технологии

124

- МЕТОДЫ И ПРОТОКОЛЫ**
Генетическая паспортизация картофеля на основе мультиплексного анализа 10 микросателлитных маркеров
О.С. Колобова, О.П. Малюченко, Т.В. Шалаева, Е.П. Шанина, И.А. Шилов, Я.И. Алексеев, Н.С. Велишаева

128

- ОБЗОР**
Оценка разнообразия растений и изменчивости транскрипционной активности с использованием молекулярных маркеров на основе ретротранспозонов
Р.Н. Календарь, К.С. Айжаркын, О.Н. Хапилина, А.А. Аменов, Д.С. Тагиманова

135

- ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Изменчивость ISSR-маркеров и оценка наследования диагностических признаков у *StY*-геномных видов *Elymus pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* (Poaceae: Triticeae)
Е.В. Кобозева, С.В. Асбаганов, О.В. Дорогина, А.В. Агафонов

Gene pool and breeding

- 7 **REVIEW**
Mobilization, conservation and study of cultivated and wild potato genetic resources
S.D. Kiru, E.V. Rogozina
- 16 **REVIEW**
Interspecific hybridization of potato: theoretical and applied aspects
T.A. Gavrilenko, A.P. Yermishin
- 30 **REVIEW**
Interspecific potato hybrids as donors of durable resistance to pathogens
E.V. Rogozina, E.E. Khavkin
- 42 **ORIGINAL ARTICLE**
 $S_V S_V$ -lines is an effective tool for involvement of the valuable genepool of 1 EBN diploid potato species into breeding
A.P. Yermishin, Yu.V. Polyukhovich, E.V. Voronkova, O.N. Gukasyan
- 51 **REVIEW**
Potato resistance to quarantine diseases
A.V. Khiutti, O.Yu. Antonova, N.V. Mironenko, T.A. Gavrilenko, O.S. Afanasenko
- 62 **REVIEW**
Resistance to viruses of potato: current status and prospects
S.S. Makarova, V.V. Makarov, M.E. Taliansky, N.O. Kalinina
- 74 **REVIEW**
Aphid resistance in potato
E.E. Radchenko

Promising trends

- 83 **REVIEW**
Cytoplasmic male sterility and prospects for its utilization in breeding, genetic studies and seed production of potato
I.N. Anisimova, T.A. Gavrilenko

- 96 **REVIEW**
Achievements and prospects of applying high-throughput sequencing techniques to potato genetics and breeding
I.V. Bykova, N.A. Shmakov, D.A. Afonnikov, A.V. Kochetov, E.K. Khlestkina

- 104 **REVIEW**
Making complex things simpler: modern tools to edit the plant genome
N.E. Zlobin, V.V. Ternovoy, N.A. Grebenkina, V.V. Taranov

- 112 **REVIEW**
The perspectives of metabolomics studies of potato plants
R.K. Puzanskiy, V.V. Yemelyanov, T.A. Gavrilenko, M.F. Shishova

Mainstream technologies

- 124 **METHODS AND PROTOCOLS**
Multiplexed set of 10 microsatellite markers for identification of potato varieties
O.S. Kolobova, O.P. Maluchenko, T.V. Shalaeva, E.P. Shanina, I.A. Shilov, Ya.I. Alekseev, N.S. Velishaeva
- 128 **REVIEW**
Plant diversity and transcriptional variability assessed by retrotransposon-based molecular markers
R.N. Kalendar, K.S. Aizharkyn, O.N. Khapilina, A.A. Amenov, D.S. Tagimanova
- 135 **ORIGINAL ARTICLE**
Variability of ISSR markers and estimation of inheritance of diagnostic characters among StY-genome species of *Elymus pendulinus*, *E. brachypodioides* and *E. vernicosus* (Poaceae: Triticeae)
E.V. Kobozeva, S.V. Asbaganov, O.V. Dorogina, A.V. Agafonov

Уважаемые читатели!
Текущий номер Вавиловского журнала генетики и селекции посвящен обзору современных направлений исследований в области картофелеводства. В последние десятилетия происходит стремительное внедрение инновационных наукоемких технологий в селекцию и семеноводство сельскохозяйственных растений, в том числе картофеля, который возделывается в большинстве регионов нашей страны и является одной из важнейших продовольственных культур Российской Федерации.

По инициативе Федерального агентства научных организаций России совместно с редколлегиями отечественных научных журналов была организована серия специальных выпусков, в которых представлена актуальная информация об исследованиях, связанных с различными аспектами генетики, селекции, физиологии и агротехнологии выращивания и производства картофеля (Достижения науки и техники АПК. 2016. № 10; Сельскохозяйственная биология. 2017. № 1; Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. № 1). Важное место в ряду обеспечения производственного цикла выращивания картофеля занимает создание новых сортов с заданными свойствами путем применения методов маркер-ориентированной и геномной селекции. Эти подходы базируются на результатах изучения молекулярно-генетических механизмов формирования хозяйственно ценных признаков. Особая роль в генетико-селекционных исследованиях картофеля отводится дикорастущим видам как источнику генетического разнообразия. В настоящем выпуске журнала рассматриваются исследования по оценке и использованию генофонда видов, сортов и гибридов картофеля, а также перспективные подходы в создании новых сортов картофеля с заданными свойствами.

Открывает номер обзорная статья, в которой анализируется состояние дел в области сохранения, изучения и использования генетических ресурсов картофеля и его диких родичей в отечественной и зарубежной селекции. Работа подготовлена специалистами Федерального исследовательского центра Всероссийский

институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР, Санкт-Петербург, Россия).

В ВИР хранится одна из крупнейших в мире коллекций генетических ресурсов растений, включающая и коллекцию культурных и дикорастущих видов картофеля, относящихся к секции *Petota* рода *Solanum*. В настоящее время не существует общепринятой классификации этой секции. Авторы статей обращаются к разным таксономическим системам секции *Petota* (Букасов, 1978; Hawkes, 1990; Горбатенко, 2006; Spooner et al., 2014), что необходимо учитывать при чтении этого выпуска журнала, поскольку существуют противоречия в представлениях о ее структуре и составе, а также во взглядах на объем многих видов картофеля.

Основной метод расширения генетического разнообразия культурного картофеля – это межвидовая гибридизация с дикорастущими видами, которые служат источником генов устойчивости картофеля к патогенам и вредителям. Развитие этого направления рассматривается в обзорах «Межвидовая гибридизация картофеля: теоретические и прикладные аспекты» и «Межвидовые гибриды картофеля как доноры долговременной устойчивости к патогенам», подготовленных специалистами из ВИР совместно с коллегами из Института генетики и цитологии НАН Беларуси (ИГЦ НАНБ, Минск) и Всероссийского НИИ биотехнологии (ВНИИСБ, Москва) соответственно. Отмечается, что наибольшие успехи интрогрессивной гибридизации связаны с созданием сортов, устойчивых к фитофторе, золотистой картофельной нематодой и Y-вирусу картофеля, и подчеркивается, что ускорение создания сортов, содержащих гены устойчивости дикорастущих сороричей, достигается путем использования ДНК-маркеров для контролируемого отбора селекционного материала.

Среди заболеваний картофеля особое место занимают карантинные болезни, такие как рак картофеля и поражение золотистой картофельной нематодой. Этой проблеме, а также генетическим аспектам устойчивости к данным заболеваниям посвящена обзорная статья специалистов из Всероссийского НИИ защиты растений (ВИЗР, Санкт-Петербург) совместно с ВИР и ИЦиГ СО РАН. В двух обзорных статьях, подготовленных исследователями из МГУ и ВИР, комплексно рассмотрены подходы и проблемы, связанные с получением сортов картофеля, устойчивых к вирусным инфекциям и к тле.

В следующем блоке работ представлены статьи специалистов из ИЦиГ СО РАН, ВНИИСБ, ВИР и СПбГУ, посвященные возможностям использования методов геномики, транскриптомики и метаболомики в генетико-селекционных исследованиях картофеля и применению методов геномного редактирования для ускоренного получения сортов с заданными свойствами.

Секвенирование генома картофеля открыло новые перспективы использования методов высокопроизводительного секвенирования в генетике и селекции данной культуры. Важным следствием секвенирования генома

стала идентификация более 8 тыс. SNP, что служит основой для геномной селекции картофеля, а также для выявления новых генов, определяющих хозяйственно ценные признаки картофеля, методом полногеномного анализа ассоциаций. Подчеркивается важность оптимизации имеющихся биоинформатических методов анализа для осуществления работ в этом направлении с учетом особенностей организации генома картофеля.

Значимая роль отводится системным исследованиям, сочетающим изучение генома и транскриптома с оценкой метаболома. Метаболомный анализ уже активно применяется для изучения растений картофеля с целью выяснить, как влияют те или иные гены на качественный и количественный состав совокупности метаболитов. Анализ метаболома потенциально может быть использован как сопутствующий метод при отборе доноров ценных признаков и селекционных форм в процессе маркер-ориентированной и геномной селекции.

Еще одна перспективная технология для создания новых улучшенных форм картофеля – направленный мутагенез с использованием системы CRISPR/Cas9. С помощью этой технологии возможно в короткие сроки получать модифицированные нетрансгенные растения с заданными изменениями генов. В отдельном обзоре рассматривается современный инструментарий для редактирования генома растений с акцентом на особенностях применения этого подхода на картофеле.

Среди перспективных направлений обсуждается и недавно предложенная зарубежными учеными новая стратегия селекции и семеноводства картофеля, основанная

на получении гетерозисных диплоидных гибридов путем скрещивания инбредных линий. Один из ключевых элементов реализации данной стратегии – использование генетических систем ЦМС-*Rf*, которые давно и успешно применяются в семеноводстве овощных культур, кукурузы, сахарной свеклы и только начинают исследоваться у картофеля.

Цикл статей по картофелеводству завершает совместная работа специалистов из ВНИИСБ и Уральского НИИСХ, предложивших эффективный и экономичный способ генетической паспортизации картофеля на основе мультиплексного анализа десяти микросателлитных маркеров. Эта разработка станет ценным инструментом для усовершенствования системы регистрации и сертификации, защиты прав селекционеров и контроля генетической однородности сортов картофеля. Автоматизированная и высокопроизводительная паспортизация предполагает, что особенно важно, использование отечественных приборов и реагентной базы. В этой связи необходимо подчеркнуть, что критическое значение для успешного развития современного картофелеводства в Российской Федерации имеет формирование в научных организациях, ведущих работы по селекции и семеноводству, базовых молекулярно-генетических лабораторий, которые были бы обеспечены стандартными комплектами отечественного научного импортозамещающего оборудования. Успехи в разработке и выпуске такого оборудования для молекулярно-генетических работ уже достигнуты благодаря кооперации ряда институтов ФАНО России с отечественными производителями.

Научные редакторы спецвыпуска:

*академик РАН Н.А. Колчанов (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск),
член-корреспондент РАН А.В. Кочетов (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск),
профессор РАН Е.В. Журавлева (ФАНО, Москва),
профессор РАН Е.К. Хлесткина (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск)*

Мобилизация, сохранение и изучение генетических ресурсов культивируемого и дикорастущего картофеля

С.Д. Киру , Е.В. Рогозина

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова» (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

Сегодня в крупнейших картофельных генбанках мира, включая мировую коллекцию картофеля ВИР, хранится около 98 тыс. образцов картофеля и его диких родичей. Этот генофонд, накапливавшийся на протяжении почти столетия, представляет собой огромное генетическое разнообразие клубнеобразующих видов рода *Solanum* L., имеющего огромное значение для фундаментальных и прикладных научных исследований и для продовольственной безопасности человечества. Генные банки картофеля и других сельскохозяйственных растений выполняют три весьма важные задачи: постоянное пополнение коллекционного материала; обеспечение его сохранности при помощи разных способов хранения (семенное размножение и хранение в вегетативном состоянии); его всестороннее использование в фундаментальных и прикладных исследованиях для решения вопросов повышения эффективности сельскохозяйственного производства. Выполнение вышеперечисленных задач в генбанках и научных организациях большинства стран, занимающихся хранением, изучением и использованием гермоплазмы картофеля, позволяет получать довольно высокие результаты как в области биологии картофеля, так и в области улучшения продовольственных качеств культуры. Вместе с тем пути выполнения обозначенных трех задач нуждаются в усовершенствовании в связи с произошедшим за многие десятилетия прогрессом, в частности в области фундаментальных и прикладных наук. В настоящей работе дан краткий анализ состояния дел в области сохранения, изучения и использования генетических ресурсов картофеля и его диких родичей в отечественной и зарубежной селекции, а также рассмотрены пути решения проблем в этих направлениях. Большим прорывом сегодня является использование молекулярно-генетических методов в генотипировании коллекционного материала для целей идентификации и инвентаризации коллекционных образцов в генных банках, а также для использования материала в фундаментальных и прикладных исследованиях, в том числе в селекционных программах. Координация усилий по сбору диких видов картофеля, которые отсутствуют в коллекциях или представлены малым числом образцов, а также обмен материалом и информацией о нем будут способствовать расширению как генетического разнообразия в генбанках, так и знаний о биологических особенностях картофеля.

Ключевые слова: картофель; коллекция; генетические ресурсы; изучение; методы; признаки; вид; селекция; сорт.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Киру С.Д., Рогозина Е.В. Мобилизация, сохранение и изучение генетических ресурсов культивируемого и дикорастущего картофеля. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(1):7-15. DOI 10.18699/VJ17.219

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kiru S.D., Rogozina E.V. Mobilization, conservation and study of cultivated and wild potato genetic resources. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):7-15. DOI 10.18699/VJ17.219

Mobilization, conservation and study of cultivated and wild potato genetic resources

S.D. Kiru , E.V. Rogozina

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

Nowadays, the world's largest Potato Genebanks, including VIR Potato Genebank, hold about 98 thousand accessions of potato and its wild relatives. This gene pool, which has been accumulated for almost a century, represents a huge genetic diversity of tuber bearing species of the genus *Solanum* L., which has a great importance for basic and applied research in general, and for human food security. The genebanks of potato and other crops have three highly important tasks such as permanent replenishment of collection material, ensuring its preservation by various storage and maintaining methods, including seed and vegetative propagation, its all-round use in basic and applied research, as well as the improvement of the efficiency of agricultural production. Analysis of performance of the above tasks in genebanks and research institutes in most countries concerned with storage, study and use of potato germplasm, shows great results and achievements, both in terms of its biology and its improvement as a food crop. However, the above three ways to perform tasks still need to be improved in connection with progress made over past decades, in particular in the field of basic and applied sciences. In this paper, a brief analysis of the status of conservation, study and use of potato genetic resources and its wild relatives in the domestic and foreign breeding, as well as solutions of problems in these areas are provided. A great leap forward today is the use of molecular genetic methods for genotyping collection material in gene banks to identify and itemize collection samples, as well as for using this material in basic and applied research, including breeding programs. Coordination of efforts for the collection of wild species that are not in the collections or are represented by a small number of samples, as well as the exchange of material and information about it, will help expand genetic diversity in genebanks and knowledge of the biological features of the potato.

Key words: potato; collection; genetic resources; evaluation; characters; methods; species; breeding; variety.

Картофель по своей значимости как продовольственная культура занимает четвертое место в мире после пшеницы, риса и кукурузы. Он возделывается более чем в 180 странах, и его потребление растет с каждым годом (FAO, 2015). В 2015 г. Китай произвел более 41 млн т картофеля, Российская Федерация, по валовому производству занимающая второе место, – более 30 млн т, Польша – 23.5 млн т, Соединенные Штаты – 22.5 млн т, Индия – более 17 млн т, Украина – 15.4 млн т. Вместе с тем урожайность этой культуры в нашей стране (17–19 т/га) значительно меньше, чем в ведущих картофелепроизводящих странах – Нидерландах (40–45), США (38–40), Германии (35–38), Великобритании (30–33 т/га) и др., что объясняется низким уровнем семеноводства и агротехники возделывания. К чести отечественных селекционеров, следует отметить, что они достигли значительных успехов в создании высокопродуктивных сортов, обладающих комплексом признаков, в том числе устойчивостью к болезням, вредителям и климатическим стрессам.

Сегодня биологическая продуктивность лучших российских сортов достигает 50–60 т/га при испытании на опытных делянках и сортоучастках. Однако в производственных условиях их урожайность резко снижается из-за влияния различных факторов, в том числе поражений вирусными, грибными болезнями, и слабой устойчивости к меняющимся условиям среды. Расширение направлений использования клубней картофеля требует создания не только высокопродуктивных сортов, устойчивых к биотическим и абиотическим факторам среды, но и непременно пригодных для высокотехнологических приемов возделывания, длительного хранения, с высокой лежкостью, для переработки на обладающие высокими питательными достоинствами различные виды продуктов.

Достижения последнего десятилетия в области биологических и сельскохозяйственных наук (генетики, ботаники, физиологии, молекулярной биологии) способствуют значительному усовершенствованию методов селекции. Залогом успешной селекции новых сортов являются наличие широкого генетического разнообразия исходного материала, его генетическая изученность, методы гибридизации и отбора перспективных гибридов (Будин, 1986). Сегодня селекционерам доступна уникальная, одна из крупнейших в мире коллекция картофеля, хранящаяся в Федеральном исследовательском центре Всероссийский институт генетических ресурсов растений (ВИР) им. Н.И. Вавилова.

История создания и пополнения мировой коллекции картофеля ВИР

Теоретические основы расширения генофонда картофеля для целей селекции заложены гениальным ученым-генетиком Н.И. Вавиловым, по инициативе которого в 1925–1932 гг. были организованы экспедиции по сбору генетических ресурсов возделываемых растений в Центральную и Южную Америку. В 2016 г. исполнилось 90 лет со времени первой экспедиции по сбору диких и культурных форм картофеля в Центральной и Южной Америке. Благодаря этой экспедиции и на основе собранных образцов началась новая эра в селекции картофеля.

Создание мировой коллекции картофеля ВИР началось в 1919–1920 гг., когда по заданию Н.И. Вавилова С.М. Букасов приступил к изучению сортов картофеля в Бюро прикладной ботаники сельскохозяйственного ученого комитета, в дальнейшем преобразованном в Институт прикладной ботаники и новых культур. На первом этапе была поставлена задача собрать и размножить все лучшее, что создала к тому времени мировая селекция. С.М. Букасов организовал сбор сортов, возделываемых в стране и интродуцированных различными путями из зарубежных стран, в основном из Германии, а также пополнял коллекцию путем выписки сортов из других стран. Накопленные в коллекции образцы представляли собой многочисленные клоны от иностранных сортов, которые выращивались на полях сельских хозяйств. К 1925 г. это была самая полная коллекция сортов в стране, однако ее изучение показало, что, несмотря на все разнообразие, в ней нет сортов, обладающих устойчивостью к наиболее вредоносным заболеваниям – раку, фитофторозу, вирусам, нематоде и др.

Н.И. Вавилов понимал, что в коллекции не хватает диких родичей картофеля с его родины – Южной Америки, несколько видов которых были открыты к тому времени зарубежными ботаниками, изучавшими флору этого континента. В 1925–1929 гг. он направил в Центральную и Южную Америку С.М. Букасова и С.В. Юзепчука, которые собрали обширный материал диких видов и местных культурных образцов картофеля Мексики, Гватемалы, Колумбии, Перу, Чили. В 1932 г. Н.И. Вавилов и сам посетил эти страны, продолжив сбор образцов дикорастущих и культурных форм. Привезенные новые образцы картофеля оказались весьма ценными как исходный материал для селекции, поскольку обладали устойчивостью к раку, фитофторозу, вирусным болезням, нематодам и другим патогенам (Камераз, 1941; Букасов, Камераз, 1972).

Следует также отметить, что благодаря разнообразию коллекции сортов, собранных в 1920–1930-х гг., были выделены сорта, устойчивые к раку картофеля. Как отмечает А.Я. Камераз (1940), эта работа имела большое значение для предохранения картофелеводства страны от распространения опасного заболевания из-за рубежа. Значение своевременного изучения и выделения ракоустойчивых форм подтвердилось после Великой Отечественной войны, когда это заболевание появилось в некоторых областях европейской части страны. К тому времени картофелеводы обладали большим количеством ракоустойчивых сортов. Из коллекции ВИР были выделены, размножены и районированы в разных областях страны такие ракоустойчивые сорта, как Барановский (клоновый отбор от сорта Форан), Берлихинген, Гренцмарк, Зазерский (клоновый отбор от сорта Фрюнудель), Карнеа, Мажестик, Миттельфроне, Остботе, Парнассия, Пауль Вагнер, Фрам, Крахмалингосес, Император, Кобблер и др. К 1965 г. эти сорта уже занимали общую площадь почти 700 тыс. га.

Экспедиции в страны Южной Америки были продолжены после войны: П.М. Жуковским – в Аргентине, Чили, Перу и Мексике; А.Г. Зыкиным – в Чили, Бразилии, Боливии (Зыкин, 1973); К.З. Будиным – в Мексике и Перу; Л.Е. Горбатенко – в Аргентине, Уругвае, Колумбии, Перу, Венесуэле (Горбатенко, 2007), а также многими другими

учеными ВИР. Образцы поступали в коллекцию ВИР также путем обмена с крупнейшими научными учреждениями зарубежных стран – США (опытные станции Белтсвил и Стьюрджен Бэй), Англии (Институт Джона Инса и от проф. Дж. Хокса из Университета Бирмингема), Перу (от проф. К. Очоа), Боливии (от проф. Карденаса), Аргентины (от проф. Брюхера) и др. (Киру, 2007). Много образцов поступило и от других ботаников Латинской Америки. В дальнейшем мировая коллекция картофеля ВИР постоянно пополнялась новыми сортами и гибридами из отечественных и зарубежных селекционных центров, научных учреждений. С.М. Букасов отмечал, что ни в одной стране нет такой полной и богатой коллекции, какую собрал ВИР (Букасов, Камераз, 1972).

Сегодня образцы мировой коллекции картофеля ВИР широко используются селекционерами в качестве исходного материала для создания новых сортов. Всего же за 90-летний период мобилизации ресурсов картофеля из стран Нового и Старого Света коллекция этой культуры в ВИР пополнилась более чем 8500 образцами, в том числе более 2200 селекционных сортов, 2100 образцов 140 диких видов, 3200 образцов 6 южноамериканских культурных видов и др.

Изучение и использование в отечественной селекции мировой коллекции картофеля ВИР внесло большой вклад в развитие не только картофелеводства нашей страны, но и фундаментальных и прикладных исследований по картофелю и его диким родичам.

Систематика картофеля

Комплексные исследования коллекции картофеля, которым придавал большое значение Н.И. Вавилов, позволили в сравнительно короткий срок получить значительные результаты. Основопологающей идеей созданной С.М. Букасовым и получившей мировую известность и признание системы видов картофеля было учение Н.И. Вавилова о центрах происхождения видов растений. Изучив большое разнообразие видов, С.М. Букасов систематизировал клубненосные растения секции *Tuberarium* рода *Solanum* в подсекции, в которые входят 32 серии, включающие более 170 диких и культурных видов (Букасов, 1971). Он построил стройную систему видов картофеля и их филогении. Все изученные в живом состоянии виды были распределены в несколько серий секции *Tuberarium* (Dun). Были вновь описаны серии *Acaulia* Juz., *Demissa* Buk., *Longipedicellata* Buk., *Cardiophylla* Buk., *Transaequatorialia* Buk., *Glabrescentia* Buk., *Commersoniana* Bitt. Серия *Oxycarpa* Rydb. выделена как самостоятельная из серии *Conibaccata* Bitt., а серия *Pinnatisecta* Rydb. сужена за счет исключения из ее объема видов серий *Commersoniana* и *Glabrescentia*.

Согласно правилу приоритета, прежнее название секции картофеля *Tuberarium* Dun. в настоящее время заменено на *Petota* Dumort. В пределах секции *Petota* Dumort. подсекция *Potatoe* G. Don. объединяет все дикие и культурные виды картофеля. Теперь в соответствии с кодексом ботанической номенклатуры клубнеобразующие виды – родичи возделываемого картофеля – относятся к семейству пасленовых (*Solanaceae* L.) роду паслен (*Solanum* L.) секции *Petota* Dumort. (= *Tuberarium* Dun.) подсекции *Potatoe*

G. Don (= *Hyperbasarthrum* Bitt.). Результаты анализа хлоропластной ДНК более чем 100 видов рода *Solanum* стали основанием для предложения о пересмотре системы рода паслен и выделения в ее составе 13 групп (клад), одна из которых – *Potato* – включает картофель и томат (Bohs, 2005). Систематика секции *Petota* на протяжении XX в. подвергалась неоднократной ревизии, что объясняется различиями в принципах классификации, понимании объемов видов и серий, а также необходимостью включения новых, ранее не известных видов картофеля. Системы видов картофеля разработаны Д. Корреллом (Correll, 1962), С.М. Букасовым (1978), Дж. Хоксом (Hawkes, 1990), Л.Е. Горбатенко (2006), Д. Спунером с коллегами (Spooner et al., 2014). Разные системы видов секции *Petota* различаются как числом и составом надвидовых таксонов (серий, по классификации Коррелла, Букасова, Хокса, Горбатенко, и групп, по классификации Спунера), так и числом и группировкой видов.

Новые сведения о происхождении и филогении клубненосных видов *Solanum* L. получены в результате изучения биогеографии андийской флоры (Luebert, Weigend, 2014). Установлено, что диверсификация растительности Анд связана с генезисом территории, и флора средних высот, в том числе клубненосные виды картофеля, имеет более древнее происхождение, чем высокогорная растительность. В соответствии с разным временем образования северной, южной и центральной части Анд, среди высокогорных видов картофеля более древние произрастают на территории южной части горной цепи, тогда как имеющие более недавнее происхождение виды – в северной части. Дивергенция предковой линии секции *Petota* рода *Solanum* L. произошла 6.5–7 млн лет назад. Дивергенция предковой линии томата – секции *Lycopersicon* – произошла примерно 2–2.5 млн лет назад (Luebert, Weigend, 2014).

Вопросам классификации клубненосных видов *Solanum* L., решаемым с помощью молекулярного и геномного анализа, посвящены работы (Jacobs et al., 2008, 2011; Bradeen, Haynes, 2011; Spooner et al., 2014; Machida-Hirano, 2015). Родственные взаимоотношения и таксономия видов картофеля продолжают оставаться дискуссионными. Классификация видов неоднократно пересматривалась с учетом дополнения морфологических характеристик данными молекулярного анализа. Для выяснения генетических отношений между видами картофеля использовались разные типы ядерных и пластидных маркеров, но полученные результаты не позволили прийти к однозначному выводу (Machida-Hirano, 2015). Последняя версия таксономической классификации клубненосных видов секции *Petota* рода *Solanum* L. представлена на сайте <http://solanaceaesource.org/>. Однако большинство исследователей (Bradshaw, 2009; Jansky et al., 2013; и др.), работающих в области предселекции и селекции картофеля, используют классификации Дж. Хокса (Hawkes, 1990) или Д. Спунера (Spooner, Salas, 2006).

Вопросы поддержания и сохранения генофонда

Генетические ресурсы культурных растений и их диких родичей являются одним из важнейших компонентов рас-

тительного биологического разнообразия (биоразнообразия), так как имеют фактическую или потенциальную ценность для производства продуктов питания, устойчивого развития экологически безопасного сельского хозяйства, создания сырья для промышленности. Именно поэтому проблемы сбора, сохранения, изучения и рационального использования генетических ресурсов культурных растений и их диких родичей относятся к государственным, стратегически важным и непосредственно связаны с обеспечением как национальной, так и глобальной продовольственной, биоресурсной и экологической безопасности.

Вопросы сохранения разнообразия клубненосных видов *Solanum* L. в условиях *in situ* и *ex situ* продолжают оставаться актуальными и привлекают внимание многих ученых. Итоги недавних обследований и изучения современных растительных сообществ на территории Боливии представлены в трудах (Cadima, 2014; Cota-Morante, Cota-Salazar, 2014), результаты экспедиций в Колумбию изложены в статье (Vélez et al., 2016). Исследователями проведен сбор гербария, оценено состояние диких видов в условиях *in situ*, экология их местообитаний и сохранность растительных сообществ. Выявлено исчезновение в некоторых районах Колумбии популяций *S. colombianum* из-за вырубki леса и интенсивного развития сельского хозяйства, прежде всего скотоводства (Vélez et al., 2016). Подтверждена локализация центра разнообразия диких видов картофеля в Андах в районе, относящемся к территории Боливии и Перу, и определены приоритетные области для сохранения эндемичных видов в условиях *in situ* (Cadima, 2014).

По данным FAO, в настоящее время 30 стран поддерживают обширные *ex situ* коллекции картофеля, в которых хранятся около 98 тыс. образцов (Machida-Hirano, 2015). Коллекция ВИР на втором месте по числу образцов – более 8 500 (9 %). Разнообразие генофонда картофеля, представленного в ВИР, так же как и в крупнейших мировых коллекциях – Международном центре по картофелю CIP (Перу, 6300 обр.), Национальном генбанке картофеля США (Стьюржен Бэй, 6000 обр.), Центре генетических ресурсов растений Германии (Гросс-Люзевиц, 3050 обр.), Центре генетических ресурсов растений Нидерландов (Вагенинген, 2700 обр.), Объединенной Британской коллекции картофеля (CPC, Данди, 1500 обр.) (<http://www.pgrportal.nl/en/Potato-genetic-resources>), изучается с применением современных методов молекулярно-генетического анализа (Gavrilenko et al., 2010; Cadima, 2014; Bamberg, del Rio, 2016). Анализ данных о сохранении *ex situ* диких родичей картофеля с целью определения видов, приоритетных для сбора, и выработки стратегии их изучения и использования для улучшения культурного картофеля проведен Н. Кастанеда-Альварес с соавт. (Castañeda-Álvarez et al., 2015). Из 74 видов только 3 вида имеются в достаточном количестве в коллекциях генных банков, а 32 (43.8 %) оценены как высокоприоритетные для дальнейших сборов. В генных банках картофельной гермоплазмы не представлены виды *S. ayacuchense*, *S. neovavilovii*, *S. olmosense*, *S. salasianum*. Приоритетными для сбора и сохранения являются еще 28 видов, из которых 21 вид эндемичный, и большинство произрастают на территории Перу (Castañeda-Álvarez et al., 2015).

Различия в технологии воспроизводства семенных репродукций в разных генных банках могут повлиять на генотипическую структуру депонированных образцов, которая у образцов диких видов картофеля, депонированных в *ex situ* коллекциях, может быть более разнообразной, чем у популяций соответствующего вида в естественных условиях, где существует давление естественного отбора (Bamberg, del Rio, 2016). Координированные исследования фенотипического и генотипического разнообразия дикорастущих видов *Solanum* L. в коллекциях картофеля должны быть продолжены с целью их рациональной организации и эффективного использования. Хотя, по мнению Д. Спунера (Spooner et al., 2009), генетическое и фенотипическое разнообразия кажутся не связанными в отношении устойчивости к вредным организмам, некоторые авторы полагают, что такая связь существует (Bamberg, del Rio, 2016).

Полевые коллекции картофеля, поддерживаемые традиционным способом, несут значительные потери из-за воздействия экстремальных факторов внешней среды, накопления в растениях вирусных, бактериальных и грибных заболеваний. *In vitro* коллекции оздоровленных растений являются обязательной и неотъемлемой частью современных генбанков растительных ресурсов. При хранении больших коллекций возникает проблема контроля и идентификации сохраняемого генофонда, которая особенно актуальна для *in vitro* коллекций, поскольку у пробирочных растений невозможно определить весь комплекс свойственных каждому сорту морфологических и хозяйственно ценных признаков. В последнее десятилетие для генотипирования сортов картофеля все шире применяются молекулярные методы, основанные на использовании ДНК-маркеров. Несомненное преимущество *in vitro* коллекций – возможность компактного хранения многих сотен и тысяч коллекционных образцов в контролируемых условиях среды, а также возможность обмена свободными от патогенов образцами между различными генбанками и селекционными центрами (Киру и др., 2007).

В ВИР коллекции *in vitro* картофеля формируются с целью решения следующих задач: сохранение генетического разнообразия культурных растений; поддержание дублетной, наиболее важной части полевой коллекции; хранение образцов, свободных от патогенов, в контролируемых условиях среды. В коллекции *in vitro* хранится более 300 образцов диких, культурных видов картофеля и селекционных сортов; кроме того, в условиях *in vitro* сохраняются образцы три- и пентаплоидных культурных видов (*S. juzepczukii*, *S. chaucha*, *S. curtilobum*), которые не могут быть воспроизведены семенами. Создание, поддержание и длительное хранение коллекций *in vitro* включают три основные задачи: 1) оздоровление растений от болезней и вредителей на основе общепринятых методов культуры меристем и хемотерапии; 2) длительное сохранение *in vitro* коллекций в условиях минимального роста (коллекции картофеля сохраняются в микроклубнях в темноте при температуре +2 °C; в зависимости от генотипа образцы растений хранятся в культуре *in vitro* один-три года без переноса на свежие питательные среды); 3) генотипирование образцов *in vitro* растений на основе использования современных молекулярно-генетических методов.

Методика и основные результаты изучения генофонда картофеля

Еще в 1920-е гг. Н.И. Вавилов обращал внимание на устойчивость растений отдельных сортов, видов и разновидностей к болезням и вредителям. Он отмечал явление восприимчивости к заболеваниям на примере разных культур, в том числе картофеля. Рассматривая природу устойчивости растений, Н.И. Вавилов пришел к выводу, что для создания устойчивых сортов необходимо сначала изучить специализацию паразита и генетическую дифференциацию сортов или видов (Вавилов, 1935). Большое внимание он уделял возможности наследования при гибридизации и указывал на трудность скрещивания устойчивых и неустойчивых форм с целью получения гибридов, обладающих устойчивостью к нескольким патогенам.

Дикие и культурные виды картофеля, впервые открытые учеными ВИР как источники ценных признаков для селекции, и сейчас составляют основной генофонд для селекции этой культуры на устойчивость к болезням и вредителям, климатическим стрессам, на высокое содержание в клубнях крахмала, белка, витаминов и других веществ.

Исследования, проведенные в ВИР в 1980–1990-х гг., позволили выявить ряд закономерностей в вопросах устойчивости видов рода *Solanum* L. к фитофторозу. Впервые была установлена полигенная основа устойчивости южноамериканских видов картофеля к этому заболеванию. Это теоретическое положение нашло свое экспериментальное подтверждение в создании межвидовых гибридов с высокой полевой устойчивостью к фитофторозу академиком К.З. Будиним, а позднее – профессором В.А. Колобаевым (2001).

В целях более эффективного использования источников ценных признаков для селекции, необходимо знать характер наследования в половом потомстве, а следовательно, и донорские способности генотипов, обладающих этими признаками. В отделе клубнеплодов ВИР под руководством К.З. Будина была разработана и применена технология выявления источников среди генотипов видов картофеля и введения их в селекцию путем вовлечения в сложную межвидовую гибридизацию. Это так называемый пребридинг. На первом этапе проводится исследование внутривидового полиморфизма генотипов в пределах вида, в результате чего выделяются формы, устойчивые к различным патогенам, т.е. отбираются лучшие компоненты для гибридизации с сортами. В дальнейшем, после первого скрещивания, оценки потомства и отбора клонов, наследовавших положительные признаки родительских компонентов, такой клон скрещивают с генотипом другого вида, обладающим устойчивостью к другим патогенам, которой не было в первой паре компонентов. В потомстве второго скрещивания отбирают форму или формы, которые обладают устойчивостью к ряду патогенов и высокими агрономическими свойствами, т.е. выделяют сложные межвидовые гибриды – доноры устойчивости к наиболее вредоносным патогенам и не имеющие отрицательных признаков (длинные столоны, мелкоклубневость, горький вкус и др.), свойственных многим диким видам (Будин, 1986).

Генотип дикого картофеля, обладающий устойчивостью к одному патогену или вредителю, как правило, чувстви-

телен к другим и может иметь нежелательные признаки клубня, например высокое содержание гликоалкалоидов. Традиционный метод селекции все еще требует от 12 до 15 лет для создания нового сорта, с генами желательных признаков и без генов нежелательных признаков. Применение же таких нетрадиционных методов, как слияние протопластов, отбор из соматоклональной вариации и генетической инженерии с помощью *Agrobacterium tumefaciens*, а также картирование генов, контролирующих важные признаки, позволяет расширить масштабы селекции и ускорить темпы улучшения сортового разнообразия (Gebhardt et al., 2004, 2006; Pajerowska et al., 2005; Sattarzadeh et al., 2006; Achenbach et al., 2009).

К сожалению, еще многие современные сорта создаются путем внутривидовых скрещиваний, без привлечения аборигенных форм или дикорастущих родичей. Перспектива вовлекать в селекционный процесс дикорастущий вид, который по всем параметрам урожайности в несколько раз уступает возделываемым сортам, не выглядит привлекательной для селекционера, даже если в будущем аллели, интрогрессированные от дикорастущего предка, способны спасти культурный вид от эпифитотий (Estrada Ramos, 2000).

Использование генетического разнообразия картофеля в современной селекции

Выбор гермоплазмы для селекции продолжает оставаться одной из главных трудностей для исследователей (Bradshaw, 2009). По мнению Ш. Янски (Jansky et al., 2013), не выработана общая стратегия для характеристики и использования диких родичей картофеля в селекции. Приоритетными направлениями сегодня становятся координированная инвентаризация коллекций генных банков, сборы диких видов, отсутствующих в коллекциях или представленных малым числом образцов, усиление работы по характеристике и использованию дикорастущих родичей для улучшения культурного картофеля.

Развитие новых технологий необходимо для повышения эффективности использования гермоплазмы картофеля в предселекционной и селекционной работе, для быстрого ответа на современные и будущие вызовы сельскохозяйственного производства (Cardi, 2015). Существующая стратегия использования диких родичей возделываемых растений в селекции – это фенотипический анализ, дополненный геномным анализом (Brozynska et al., 2015). Необходимость фенотипирования больших популяций является ключевым моментом в решении поставленной задачи, так как современные технологии высокопроизводительного генотипирования и секвенирования намного опережают возможности лабораторного и полевого изучения. Интересное направление – омиксные технологии для выявления новых генов или аллельных вариантов известных генов устойчивости, например генов устойчивости к фитофторозу (Van Weymers et al., 2016).

Новый подход в стратегии использования гермоплазмы базируется на достижениях в изучении генома культурного картофеля и его диких родичей. Секвенирование генома *S. commersonii* и сопоставление полученных данных с характеристикой генома удвоенного моноплоида культурного *S. phureja* (Aversano et al., 2015) выявили

серьезные различия в генетической структуре культурного картофеля и дикого родича. Геномы *S. commersonii* и *S. phureja* имеют примерно одинаковый размер, но различаются по величине межгенных участков, количеству ДНК-повторов, числу транскриптов. Гетерозиготность (частота SNP) у *S. commersonii* значительно меньше, чем у культурного картофеля, – 1.5 и 53–59 % соответственно. Сделан вывод, что у видов *Solanum* после дивергенции линий от общего предка возникает разная организация локусов *R*-генов устойчивости к стрессовым факторам среды. Состав генов-рецепторов, обеспечивающих взаимодействие с патогенами разных видов *Solanum*, может быть индикатором биологических и внешних факторов, которые влияли на адаптацию вида. Организация *R*-генов может иметь значительное влияние на разнообразие фенотипических реакций устойчивости (Aversano et al., 2015).

Сделанные учеными ВИР в 1930–1960-х гг. открытия в области генетического разнообразия картофеля позволили в дальнейшем выделить многочисленные источники ценных признаков для селекции, которые были использованы отечественными селекционерами в качестве исходного материала. А.Я. Камераз (1981, 1983) отмечает, что эти открытия позволили совершенно по-новому поставить селекцию картофеля. Почти все вновь создаваемые селекционные сорта были результатом межвидовой гибридизации. В 1960-х и 1970-х гг. абсолютное большинство районированных сортов в нашей стране было или выделено из мировой коллекции ВИР, или создано на ее основе. В дальнейшем организация целой сети селекционных центров на базе региональных НИИ сельского хозяйства способствовала развитию селекции сельскохозяйственных культур, включая картофель. Благодаря распространению методов межвидовой гибридизации, в том числе преодоления нескрещиваемости диких видов, значительно расширился генофонд картофеля и генетическое разнообразие селекционного материала. Большинство новых сортов в 1980-х и 1990-х гг. было получено уже с вовлечением не менее 2–3 видов *Solanum* L. В родословных многих сортов, созданных в начале нового столетия, присутствуют 4 и даже 6 видов, вовлечение генов которых способствует значительному повышению потребительских качеств сорта (Лебедева, 2010; Антонова и др., 2016).

Проблема скрещиваемости – одно из главных препятствий в использовании широкого разнообразия диких видов картофеля. Успех межвидовой гибридизации картофеля намного возрастает, если преодолеть этот барьер с помощью искусственной полиплоидизации. Вовлечение в межвидовую гибридизацию видов с различным уровнем пloidности и разработка методов улучшения скрещиваемости были начаты сотрудниками ВИР еще в довоенные годы. Именно тогда были получены полиплоидные формы тетраплоидного вида *S. acaule* ($2n = 96$) и диплоидного вида *S. rybinii* ($2n = 48$). Позднее в лаборатории отдаленной гибридизации ВИР получены полиплоидные растения 30 видов картофеля, относящихся к 18 сериям (Букасов, Камераз, 1972). Впервые полиплоидные формы дикого картофеля для целей практической селекции использовала Н.А. Лебедева (1961). Всего на основе полиплоидных форм видов, несущих гены устойчивости к самым вредо-

носным патогенам, синтезировано более 300 гибридных комбинаций. Гибриды с участием полиплоидных форм видов, относящихся к сериям *Transaequatorialia* Buk., *Cuneolata* Hawk., *Megistacroloba* Card. et Hawk., *Longipedicellata* Buk., *Verrucosa* Buk., синтезировала Н.А. Житлова (1969). Некоторые из них впоследствии послужили в качестве исходного материала при выведении сортов картофеля в России, Беларуси, Казахстане. Так, на основе сложных межвидовых гибридов, полученных в ВИР с использованием полиплоидов, белорусскими селекционерами были созданы сорта Орбита, Талисман и Нарочь.

М.А. Вавиловой были получены и оценены по селекционно важным признакам гибриды от скрещиваний весьма далеких от культурного картофеля видов *S. commersonii* (серия *Commersoniana* Buk.) и *S. chomatophilum* (серия *Chomatophila* Gorbat.). К.З. Будин и Т.И. Соболева (1970) для вовлечения в селекцию диплоидных диких видов картофеля осуществляли их гибридизацию с дигаметами селекционных сортов и форм *S. andigenum* Juz. et Buk. В результате многолетней целенаправленной работы по вовлечению в селекцию разнообразия видов рода *Solanum* было создано и оценено множество межвидовых гибридов. Формы, у которых ценные признаки дикого вида сочетаются с положительными хозяйственными качествами культурного картофеля, широко рассылались в селекционные учреждения.

За последние два десятилетия в ВИР значительно расширилась работа по выделению из коллекции и созданию исходного материала для селекции картофеля различных направлений. Ежегодно изучаются сотни гибридных комбинаций межвидовой гибридизации с вовлечением в них новых источников ценных признаков, необходимых для использования в селекционных программах. Прошедшие комплексное изучение и отбор сложные межвидовые гибриды, обладающие донорскими свойствами, передаются селекционерам (Kiru et al., 2007).

Как отмечено выше, интродукция полезных признаков диких родичей в культурный картофель требует 10–15 лет работы методами традиционной селекции. Почти столетний период изучения диких клубненосных *Solanum* sp. оказался плодотворным для выявления источников селекционно-ценных признаков среди родичей культурного картофеля. Выявлены источники устойчивости к широкому кругу вредных организмов (грибам и оомицетам, бактериям, вирусам, нематодам) и к неблагоприятным факторам среды (заморозкам, повышенным температурам, засухе) (Bradshaw, 2009; Spomer et al., 2009; Machido-Hirano, 2015). Наиболее интенсивно проводился поиск источников устойчивости к фитофторозу, возбудитель которого отличается высокой степенью изменчивости и адаптивности. Актуальные характеристики видов картофеля представлены в обзорах (Castañeda-Álvarez et al., 2015; Machido-Hirano, 2015). Но в родословных возделываемых сортов картофеля представлено крайне мало видов (не более 15–17) секции *Petota* рода *Solanum* (Bradshaw, 2009; Slater et al., 2014; Castañeda-Álvarez et al., 2015).

Сведения о филогении и условиях естественных местобитаний диких видов картофеля не являются, по мнению Д. Спунера, достаточными для характеристики диких родичей картофеля как потенциальных источников устой-

чивости к вредным организмам. Анализ опубликованных данных об устойчивости образцов коллекций картофеля из разных генных банков более чем к 30 патогенным организмам (бактериям, грибам, насекомым, нематодам и вирусам) показал, что на основе биогеографических сведений можно прогнозировать устойчивость только к колорадскому жуку и М-вирусу картофеля (Spooner et al., 2009). Изучение особенностей генеративного размножения, новые способы преодоления межвидовой несовместимости (на основе технологий), совершенствование методов фенотипирования и генотипирования способствуют более рациональному и эффективному использованию разнообразия диких видов картофеля в селекции. По мнению Ш. Янски с коллегами, создание диплоидных инбредных линий картофеля позволит достигнуть прогресса в генетическом анализе и селекции картофеля (Jansky et al., 2014).

Накопленные за десятилетия знания о культурном картофеле и его дикорастущих сородичах свидетельствуют о том, что гермоплазма картофеля – огромный источник генетического разнообразия, и на основе данных оценки одного или нескольких клонов невозможно предвидеть селекционную ценность семенной популяции. Только используя современные методы молекулярно-генетических исследований, можно наиболее эффективно и за более короткое время определить эту ценность. Применение методов молекулярного анализа для исследования генетического полиморфизма позволяет получать индивидуальную характеристику (ДНК-профиль) отдельного генотипа. Новые возможности для эффективного решения одной из главных задач в процессе поддержания коллекций в генбанках – различения и идентификации видов, подвидов, сортов и т. д. – открывает микросателлитный анализ. В последнее время во многих ведущих странах Европы и США, а также в нашей стране широко используются методы микросателлитного анализа для исследования генетического разнообразия представителей рода *Solanum* на внутри- и межвидовом уровне (Van den Berg et al., 2002; Ghislain et al., 2004; Spooner et al., 2005, 2014; Велишаева и др., 2006; Sukhotu, Hosaka, 2006; Gavrilenko et al., 2010, 2013; и др.).

Весьма актуальны и эффективны молекулярно-генетические методы при изучении филогении картофеля (Hosaka, Sanetomo, 2014). Анализ материалов интенсивных экспедиционных сборов диких и культурных видов картофеля за последние три десятилетия, а также результаты морфологических и молекулярных исследований привели к удвоению числа открытых видов *Solanum* и выяснению новых отношений между и внутри таксономических серий (Spooner et al., 2014). Недавнее секвенирование генома картофеля (Visser et al., 2009) позволит уже в ближайшем будущем значительно ускорить уточнение всех аспектов биологии картофеля и решать новые задачи в области фундаментальных и прикладных исследований, в том числе спорные вопросы систематики и разнообразия *Solanum* секции *Petota*, генетики, эволюции и их значимости для дальнейшего улучшения культивируемого картофеля (Spooner et al., 2014).

Важное значение для повышения эффективности селекции имеют также генотипирование сортов (Feingold

et al., 2005; Moisan-Thiery et al., 2005) и реконструкция родословных селекционных сортов (Braun, Wenzel, 2004). Для генотипирования сортов картофеля сейчас широко применяются ДНК-маркеры, основанные на полимеразной цепной реакции: RAPD, ISSR, AFLP, SSR (Hosaka, Ogawa, 1994; Braun, Wenzel, 2004; Moisan-Thiery et al., 2005; Бирюкова и др., 2006), из которых наиболее эффективны микросателлитные или SSR-маркеры.

Исследование генетического разнообразия созданных в 1931–2015 гг. российских сортов картофеля и сортов селекции стран ближнего зарубежья из коллекции ВИР на основе изучения анализа полиморфизма SSR-локусов и маркеров *R*-генов устойчивости позволило установить связь между родословными сортов, временем их создания, составом гаплотипов и устойчивостью селекционных сортов к золотистой картофельной нематоде и возбудителю рака картофеля (Антонова и др., 2016).

Методы маркер-опосредованной селекции (Gebhardt et al., 2004) сегодня широко применяются в таких селекционных процессах, как идентификация маркеров генов, контролирующих ценные признаки при создании исходного материала, подбор родительских пар для скрещивания, анализ однородности исходного генетического материала для селекции, контроль генетической подлинности сортов и др. (Бирюкова и др., 2003; Чалая и др., 2012; Limantseva et al., 2014).

Геном культурного картофеля отличается высоким полиморфизмом, который проявляется в высокой частоте SNP, вставок, дупликаций и перестроек. Маркеры SNP потенциально пригодны для изучения семенных коллекций в генных банках, а также используются в предселекции и селекции, позволяя различать аллельные варианты и новые гены, контролирующие ценные для селекции признаки (Spooner et al., 2014; Bamberg et al., 2015).

Мировой генофонд картофеля и его диких родичей, хранящийся более чем в 30 генбанках мира, представляет огромное генетическое разнообразие, значение которого для человечества трудно переоценить. На его основе были созданы тысячи сортов картофеля, которые способствовали получению высоких урожаев этой культуры. Для обеспечения надлежащего уровня мобилизации генетических ресурсов картофеля, их сохранения и эффективного использования на благо человека необходимо шире использовать самые современные достижения в области биологических и сельскохозяйственных наук – генетики, ботаники, физиологии, молекулярной биологии.

Acknowledgments

This work was supported by the Integrated Targeted Program of the Russian Federation “Scientific support of the development of the homeland seed fund and crop protecting agents for the production of competitive agricultural products and of the development of technologies for the production and storage of such products in 2016–2025”, line “Potato industry”.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Achenbach U., Paulo J., Ilarionova E., Lübeck J., Strahwald J., Tacke E., Hofferbert H.R., Gebhardt C. Using SNP markers to dissect linkage disequilibrium at a major quantitative trait locus for resistance to the potato cyst nematode *Globodera pallida* on potato chromosome V. *Theor. Appl. Genet.* 2009;118:619-629.
- 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 FSU countries based on the polymorphism for SSR loci and markers associated with resistance *R*-genes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2016;20(5):596-606. DOI 10.18699/VJ16.181. (in Russian)
- Aversano R., Contaldi F., Ercolano M.R., Grosso V., Iorizzo M., Tatino F., Xumerle L., Dal Molin A., Avanzato C., Ferrarini A., Delle Donne M., Sanseverino W., Cigliano R.A., Capella-Gutierrez S., Gabaldón T., Frusciante L., Bradeen J.M., Carputo D. The *Solanum commersonii* genome sequence provides insights into adaptation to stress conditions and genome evolution of wild potato relatives. *Plant Cell.* 2015;27(4):954-968. DOI 10.1105/tpc.114.135954.
- Bamberg J., del Rio A. Accumulation of genetic diversity in the US Potato Genebank. *Am. J. Potato Res.* 2016;93(5):430-435. DOI 10.1007/s12230-016-9519-3.
- Bamberg J.B., del Rio A., Douches D., Coombs J. Assessing SNPs for predicting heterogeneity and screening efficiency in wild potato species. *Am. J. Potato Res.* 2015;92:276-283. DOI 10.1007/s12230-014-9428-2.
- Biryukova V.A., Zaitsev V.S., Khavkin E.E., Khromov L.M. Genotyping of potato varieties by analysis of moderate repeats. *Voprosy kartofelevodstva = Issues of Potato Industry.* Moscow, VNIKKh Publ., 2006;54-62. (in Russian)
- Biryukova V.A., Zaitsev B.C., Khavkin E.E., Khromova L.M., Shilov I.A. DNA markers in potato breeding. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC.* 2003;10:38-41. (in Russian)
- Bohs L. Major clades in *Solanum* based in *ndhF* sequences. A Festschrift for William G. D'Arcy: The Legacy of a Taxonomist. Eds. R.C. Keating, V.C. Hollowell, T.B. Croat. *Monographs in Syst. Botany.* Missouri Bot. Garden. 2005;104:27-49.
- Bradeen J.M., Haynes K.G. Introduction to potato. *Genetics, Genomics and Breeding of Potatoes.* Eds. J.J. Bradeen, K.G. Haynes. Enfield NH: Sci. Publ., 2011;1-19.
- Bradshaw J. Potato breeding at the Scottish Plant Breeding Station and the Scottish Crop Research Institute: 1920–2008. *Potato Res.* 2009; 52:141-172. DOI 10.1007/s11540-009-9126-5.
- Braun A., Wenzel G. Molecular analysis of genetic variation in potato (*Solanum tuberosum* L.). I. German cultivars and advanced clones. *Potato Res.* 2004;47(5):81-92. DOI 10.1007/BF02731971.
- Brozynska M., Furtado A., Henry R. Genomics of crop wild relatives: expanding the gene pool for crop improvement. *Plant Biotechnol. J.* 2015;14:1070-1085. DOI 10.1111/pbi.12454.
- Budin K.Z. *Geneticheskoe osnovy selektsii kartofelya* [Genetic fundamentals of potato breeding]. Leningrad: Agropromizdat Publ., 1986. (in Russian)
- Budin K.Z., Soboleva T.I. Hybrids of *Solanum andigena* Juz. et Buk. dihaploids with *Solanum* diploid species. *Genetika = Genetics* (Moscow). 1970;6(8):5-11. (in Russian)
- Bukasov S.M. The taxonomy of potato species, section *Tuberosum* (Dun.) Buk. genus *Solanum* L. *Trudy po prikladnoi botanike, genetike i selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding.* 1971;1:46. (in Russian)
- Bukasov S.M. Principles of potato taxonomy. *Trudy po prikladnoi botanike, genetike i selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding.* 1978;62(1):3-35. (in Russian)
- Bukasov S.M., Kameraz A.Y. *Selektziya i semenovodstvo kartofelya* [Potato breeding and seed production]. Moscow–Leningrad, Kolos Publ., 1972. (in Russian)
- Cadima F.X. Conserving the genetic diversity of Bolivian wild potatoes. Wageningen, NL: Wageningen Univ., 2014.
- Cardi T. Cisgenesis and genome editing: Combining concepts and efforts for a smarter use of genetic resources in crop breeding. *Plant Breeding.* 2015;135(2):139-147. DOI 10.1111/pbr.12345.
- Castañeda-Álvarez N.P., de Haan S., Juárez H., Khoury C.K., Achicanoy H.A., Sosa C.C., Bernau V.V., Salas A., Heider B., Simon R., Maxted N., Spooner D. *Ex situ* conservation priorities for the wild relatives of potato (*Solanum* L. section *Petota*). *PLoS ONE.* 2015;10(4):e0122599. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0122599>.
- Chalaya N.A., Biryukova V.A., Kiru S.D. New sources of resistance to the golden potato cyst nematode *G. rostochiensis* (Woll.) from the VIR collection of wild potato species. *Izvestiya SPbGAU = Proceedings of the St.-Petersburg State Agrarian Univ.* 2012;26:45. (in Russian)
- Coca Morante M., Coca-Salazar A. Wild potato species (*Solanum* section *Petota Solanaceae*) in the Tunari National Park, Andean Region of Cochabamba, Bolivia. *Open J. Ecology.* 2014;4(2):28-32. DOI 10.4236/oje.2014.42004.
- Correll D.S. The potato and its wild relatives. Texas Res. Foundation, 1962.
- Estrada Ramos N. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. Eds. B. Hardy, E. Martinez. La Paz, Bolivia: PROINPA/CID/CIP, 2000.
- Feingold S., Lloyd J., Norero N., Bonierbale M., Lorenzen J. Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2005;111:456-466.
- Gavrilenko T., Antonova O., Ovchinnikova A., Novikova L., Krylova E., Mironenko N., Pendinen G., Islamshina A., Shvachko N., Kiru S., Kostina L., Afanasenko O., Spooner D. A microsatellite and morphological assessment of the Russian National cultivated potato collection. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 2010;57:1151-1164. DOI 10.1007/s10722-010-9554-8.
- Gavrilenko T., Antonova O., Shuvalova A., Krylova E., Alpatyeva N., Spooner D.M., Novikova L. Genetic diversity and origin of cultivated potatoes based on plastid microsatellite polymorphism. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 2013;60:1997-2015.
- Gebhardt C., Ballvora A., Walkemeier B., Oberhagemann P., Schüller K. Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: a case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. *Mol. Breeding.* 2004;13:93-102.
- Gebhardt C., Bellin D., Henselewski H., Lehmann W., Schwarzfischer J., Valkonen J.P.T. Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. *Theor. Appl. Genet.* 2006; 112:1458-1464.
- Ghislain M., Spooner D.M., Rodríguez F., Villamón F., Núñez J., Vásquez C., Waugh R., Bonierbale M. Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. *Theor. Appl. Genet.* 2004;108:881-890.
- Gorbatenko L.Y. *Vidy kartofelya Yuzhnoy Ameriki (ekologiya, geografiya, introduktsiya, sistematika, selektsionnaya znachimost')* [Potato species of South America: Ecology, geography, introduction, taxonomy, and role in breeding]. St. Petersburg, 2006. (in Russian)
- Gorbatenko L.Y., Kiru S.D. History of creation of VIR potato germplasm. *Trudy po prikladnoi botanike, genetike i selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding.* 2007;163:22-38. (in Russian)
- Hawkes J. The Potato, Evolution, Biodiversity and Genetic Resources. London: Belhaven Press, 1990. *Solanaceae Source.* Available at <http://solanaceasource.org/>
- Hosaka K., Ogawa K. Genetic diversity in Japanese and North American potato cultivars evaluated by RAPD analysis. *Sci. Rep. Faculty of Agriculture, Kobe Univ.* 1994;21:39-42.
- Hosaka K., Sanetomo R. Comparative differentiation in mitochondrial and chloroplast DNA among cultivated potatoes and closely related wild species. *Genes Genetic Systems.* 2009;84:371-378.
- Hosaka K., Sanetomo R. Application of a PCR-based cytoplasm genotyping method for phylogenetic analysis in potato. *Am. J. Potato Res.* 2014;91(3):246-253. DOI 10.1007/s12230-013-9344-x.
- Jacobs M.M.J., Smulders M.J.M., van den Berg R.G., Vosman B. What's in a name: genetic structure in *Solanum* section *Petota* studied using population-genetic tools. *BMC Evol. Biol.* 2011;11:42. DOI 10.1186/1471-2148-11-42.

- Jacobs M.M.J., van den Berg R.G., Vleeshouwers V.G.A.A., Visser M., Mank R., Sengers M., Hoekstra R., Vosman B. AFLP analysis reveals a lack of phylogenetic structure within *Solanum* section *Petota*. *BMC Evol. Biol.* 2008;8:145. DOI 10.1186/1471-2148-8-145.
- Jansky S.H., Chung Y.S., Kittipadukul P. M6: A diploid potato inbred line for use in breeding and genetic research. *J. Plant. Registr.* 2014;8(2):195-199. DOI 10.3198/jpr2013.05.0024crg.
- Jansky S.H., Dempewolf H., Camadro E.L., Simon R., Zimnoch-Guzowska E., Bisognin D.A., Bonierbale M. A case for crop wild relative preservation and use in potato. *Crop Sci.* 2013;53(3):746-754. DOI 10.2135/cropsci2012.11.0627.
- Kameraz A.Y. Use of *S. andigenum* forms in potato breeding. *Vestnik sotz. Rastenievodstva* = Herald of Socialist Plant Industry. 1940;5:12-25. (in Russian)
- Kameraz A.Y. Wild Chilean potatoes (*S. leptostigma* Juz., *S. molinae* Juz.) in potato breeding. *Vestnik sotz. rastenievodstva* = Herald of Socialist Plant Industry. 1941;1:10-15. (in Russian)
- Kameraz A.Y. Use of the global gene pool in potato breeding for resistance to major diseases and pests. *Tez. Dokl. Vsesyuznoi konferentsii po selektsii kartofelya* "Problemy i puti povysheniya ustoychivosti rasteni k bolezniam i ekstremalnym usloviyam sredy v svyazi s zadachami selektsii" [Abstracts from the All-Union conference on potato breeding "Problems and approaches to the increase of plant resistance to diseases and environmental factors in connection with breeding tasks"]. Leningrad, 1981;53-54. (in Russian)
- Kameraz A.Y. VIR world potato collection as the base of modern potato breeding. *Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki* = Herald of Agricultural Sciences. 1983;4:60-64. (in Russian)
- Kiru S.D. The VIR potato collection has 80 years. *Trudy po prikladnoi botanike, genetike i selektsii* = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. 2007;163:5-21. (in Russian)
- Kiru S.D., Gavrilenko T.A., Kostina L.I., Rogozina E.V., Antonova O.Y., Truskinov E.V., Shvachko N.A., Krylova E.A., Smirnova A.B. Conservation, evaluation and use in breeding of potato genetic diversity at N. Vavilov Institute of Plant Industry (VIR). *Potato Production and Innovative Technologies*. Eds. A. Haverkort, B. Anisimov. Netherlands: Wageningen Acad. Publ., 2007;353-362.
- Kiru S.D., Gavrilenko T.A., Kostina L.I., Rogozina E.V., Antonova O.Y., Truskinov E.V., Shvachko N.A., Krylova E.A., Smirnova A.B. Conservation, evaluation and use in breeding of potato genetic diversity at the Vavilov Institute of Plant Industry (VIR). *Dostizheniya nauki i tekhniki APK* = Achievements in Science and Technology, Agroindustrial complex. 2007;7:2-6. (in Russian)
- Kolobayev V.A. Printsipy i metody sozdaniya vysokoeffektivnykh donorov gorizontally noy ustoychivosti kartofelya k fitoflorozu. *Metodicheskie rekomendatsii* [Fundamentals and methods of the creation of highly efficient donors of horizontal resistance to late blight in potato. Methodological recommendations]. St.-Petersburg, VIZR Publ., 2001. (in Russian)
- Limantseva L., Mironenko N., Shuvalov 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 from the Vavilov Institute of Plant Industry. *Plant Breeding*. 2014;133(5):660-665. DOI 10.1111/pbr.12195.
- Lebedeva N.A. Polyploids of wild potato species and hybrids with polyploids in the long-term planting. *Botanicheskiy zhurnal* = Botanical Journal. 1961;6:14-15. (in Russian)
- Lebedeva V.A. Seleksiya kartofelya na osnove mezhvidovoy gibrizatsii (Obobshchenie 60-letnego opyta nauchnoy raboty) [Potato breeding based on interspecific hybridization (Overview of 60-year practice)]. St.-Petersburg, Renome Publ., 2010. (in Russian)
- Luebert F., Weigend M. Phylogenetic insights into Andean plant diversification. *Front. Ecol. Evol.* 2014;2:27. DOI 10.3389/fevo.2014.00027.
- Machida-Hirano R. Diversity of potato genetic resources. *Breed. Sci.* 2015;65(1):26-40.
- Moisan-Thierry M., Marhadour S., Kerlan M., Dessenne N., Perramant M., Gokelaere T., LeHingrat Y. Potato cultivar identification using simple sequence repeats markers (SSR). *Potato Res.* 2005;48:191-200. DOI 10.1007/BF02742376.
- Pajerowska K.M., Parker J.E., Gebhardt C. Potato homologs of *Arabidopsis thaliana* genes functional in defense signaling – identification, genetic mapping, and molecular cloning. *Mol. Plant-Microbe Interactions*. 2005;18(10):1107-1119.
- Sattarzadeh A., Achenbach U., Lübeck J., Strahwald J., Tacke E., Hofferbert H.R., Rothsteyn T., Gebhardt C. Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping as basis for developing a PCR-based marker highly diagnostic for potato varieties with high resistance to *Globodera pallida* pathotype Pa2/3. *Mol. Breeding*. 2006;18(4):301-312.
- Slater A., Cogan N., Benjamin J., Hayes B., Lee S., Finlay M., Dale B., Glenn J., Bryan J., Forster W. Improving breeding efficiency in potato using molecular and quantitative genetics. *Theor. Appl. Genet.* 2014;127(11):2279-2292. DOI 10.1007/s00122-014-2386-8.
- Spooner D., Nunez J., Rodriguez F., Naik P.S., Ghislain M. Nuclear and chloroplast DNA reassessment of the origin of Indian potato varieties and its implications for the origin of the early European potato. *Theor. Appl. Genet.* 2005;110(6):1020-1026.
- Spooner D.M., Ghislain M., Simon R., Jansky S., Gavrilenko T. Systematics, diversity, genetics, and evolution of wild and cultivated potatoes. *Bot. Rev.* 2014;80(4):283. DOI 10.1007/s12229-014-9146-y.
- Spooner D.M., Jansky S.H., Simon R. Tests of taxonomic and biogeographic predictivity: resistance to disease and insect pests in wild relatives of cultivated potato. *Crop Sci.* 2009;49(4):1367-1376.
- Spooner D.M., Salas A. Structure, biosystematics and genetic resources. *Handbook of Potato Production, Improvement and Postharvest Management*. Eds. J. Gopal, S.M.P. Khurana. N.Y.: Haworth Press, 2006;1-39.
- Sukhotu T., Hosaka K. Origin and evolution of Andigena potatoes revealed by chloroplast and nuclear DNA markers. *Genome*. 2006;49(6):636-647. URL: <http://www.pgrportal.nl/en/Potato-genetic-resources>.
- van den Berg R.G., Bryan G.J., del Rio A., Spooner D.M. Reduction of species in the wild potato *Solanum* section *Petota* series *Longipedicellata*: AFLP, RAPD and chloroplast SSR data. *Theor. Appl. Genet.* 2002;105:1109-1114.
- van Weymers P.S.M., Baker K., Chen X., Harrower B., Cooke D.E.L., Gilroy E.M., Birch P.R.J., Thilliez G.J.A., Lees A.K., Lynott J.S., Armstrong M.R., McKenzie G., Bryan G.J., Hein I. Utilizing "Omic" technologies to identify and prioritize novel sources of resistance to the oomycete pathogen *Phytophthora infestans* in Potato Germplasm Collections. *Front. Plant Sci.* 2016;7:672. DOI 10.3389/fpls.2016.00672.
- Vavilov N.I. Uchenie ob immunitete rasteniy k infektsionnym zabolevaniyam [The doctrine of the plant immunity to infectious diseases]. *Teoreticheskie osnovy selektsii*. Vol. 1 [The theoretical basis of breeding]. Moscow-Leningrad, Sel'khozgiz Publ., 1935;893-939. (in Russian)
- Vélez J.M., Pineda R., Galindo L., Arango R., Morales J.G. Current situation of wild *Solanum* spp. L. sect. *Petota* (*Solanum*, Solanaceae) in some Colombian regions. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 2016;63(1):47-54. DOI 10.1007/s10722-015-0234-6.
- Velishaeva N.S., Khavkin E.E., Shilov I.A. Genotipirovanie kartofelya i ego dikorastushchikh sorodichey metodom polimorfizma mikrosatelitov. [Genotyping of potato and its wild relatives by microsatellite analysis]. *Rossiyskaya selskokhozyaystvennaya nauka* = Russian Agricultural Sciences. 2006;5:3-5. (in Russian)
- Visser R.G.F., Bachem C.W.B., de Boer J.M., Bryan G.J., Chakrabarti S.K., Feingold S., Gromadka R., van Ham R.C.H.J., Huang S., Jacobs J.M.E., Kuznetsov B., de Melo P.E., Milbourne D., Orjeda G., Sagredo B., Tang X. Sequencing the potato genome: outline and first results to come from the elucidation of the sequence of the world's third most important food crop. *Am. J. Potato Res.* 2009;86:417-429.
- Zhitlova N.A. Metody polucheniya poliploidov razlichnykh vidov kartofelya. [Methods of obtaining polyploids of different potato species]. *Sb. trudov aspirantov i molodykh nauchnykh sotrudnikov VIR* [Collection of works of postgraduates and young scientists of VIR]. Leningrad, 1969;452-456. (in Russian)
- Zykin A.G. The potatoes of Bolivia. *Trudy po prikladnoi botanike, genetike i selektsii* = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. 1973;50(3):241-267. (in Russian)

Межвидовая гибридизация картофеля: теоретические и прикладные аспекты

Т.А. Гавриленко^{1, 2}✉, А.П. Ермишин³

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова» (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия

³ Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь

Возделываемый картофель *Solanum tuberosum* L. является четвертой по значимости продовольственной культурой в мире и, как многие другие культурные растения, характеризуется низким уровнем генетического разнообразия. Наиболее эффективный подход к расширению генетического разнообразия селекционных сортов основан на интродукции генетического материала диких и культурных видов картофеля, относящихся к секции *Petota* Dumort. рода *Solanum* L., которая, по оценкам разных систематиков, включает от 112 до 235 видов. В то же время из-за барьеров презиготической и постзиготической несовместимости в генофонд селекционных сортов был интродуцирован генетический материал лишь около 10 % дикорастущих видов картофеля. К настоящему времени в области молекулярной генетики, геномики и биотехнологии накоплен большой объем информации, позволяющий решать задачи кардинального расширения генетического разнообразия культурных растений. В статье приведен краткий обзор современных данных о генетических факторах, детерминирующих презиготическую и постзиготическую несовместимость, особенностях вовлечения в гибридизационный процесс самосовместимых и самонесовместимых видов секции *Petota*, видов с разными значениями балансового числа эндосперма (EBN), а также о возможных механизмах взаимодействия родительских геномов при формировании эндосперма гибридного семени. Показано значение теории EBN для дальнейшего развития прикладных исследований, направленных на расширение генетического разнообразия селекционного генофонда картофеля. Рассматриваются традиционные и современные подходы и методы преодоления межвидовой несовместимости и приведены примеры успешных исследований по интродуктивной гибридизации картофеля. Статья предваряется сведениями о генетическом разнообразии видов картофеля, относящихся к секции *Petota* рода *Solanum*, а также о концепции генных пулов этих видов.

Ключевые слова: *Solanum*; картофель; межвидовая несовместимость; интродуктивная гибридизация.

Interspecific hybridization of potato: theoretical and applied aspects

T.A. Gavrilenko^{1, 2}✉, A.P. Yermishin³

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

² St. Petersburg State University, Biological Faculty, St. Petersburg, Russia

³ Institute of Genetics and Cytology of NAS of Belarus, Minsk, Belarus

The common potato *Solanum tuberosum* is the fourth most important crop in the world and like many other cultivated plants is characterized by low level of genetic diversity. The most effective approach to broaden genetic diversity of breeding varieties is based on the introgression of genetic material of wild and cultivated species belonging to section *Petota* Dumort. of the genus *Solanum* L. This section, according to estimates by different taxonomists, includes from 112 to 235 species. At the same time, because of the barriers of prezygotic and postzygotic incompatibility, only about 10 % of wild potato species have been actively involved into the breeding process and their genetic material has been introgressed into the gene pool of varieties. To date, molecular genetics, genomics, and biotechnology have accumulated a large amount of information, allowing the problems of extension of the genetic diversity of common potato to be addressed. The article presents a review of modern data about the genetic factors determining prezygotic and postzygotic incompatibility, about the features of involvement in the hybridization process of the self-compatible and self-incompatible species of section *Petota* and species with different values of the endosperm balance number (EBN), as well as possible mechanisms of interaction between the parental genomes during the formation of the endosperm of the hybrid seed. Data are provided on the value of the theory of EBN for the further development of applied research aimed at increasing the genetic diversity of the breeding gene pool. This review discusses the traditional and modern approaches and methods of overcoming interspecific incompatibility and gives examples of successful studies on introgressive hybridization of potato. The article is preceded by information about the genetic diversity of potato species belonging to section *Petota* of the genus *Solanum*.

Key words: *Solanum*; potato; interspecific incompatibility; introgressive hybridization.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Гавриленко Т.А., Ермишин А.П. Межвидовая гибридизация картофеля: теоретические и прикладные аспекты. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(1):16-29. DOI 10.18699/VJ17.220

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Gavrilenko T.A., Yermishin A.P. Interspecific hybridization of potato: theoretical and applied aspects. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):16-29. DOI 10.18699/VJ17.220

Картофель – четвертая по значимости продовольственная культура в мире после пшеницы, риса и кукурузы. Как и многие другие культурные растения, возделываемый картофель *Solanum tuberosum* ($2n = 4x = 48$, геном AAAA) характеризуется низким уровнем разнообразия, особенно в отношении генетических факторов, контролирующих устойчивость растений к действию биотических и абиотических стрессоров. В связи с этим актуальной проблемой селекционно-генетических исследований являются поиск и создание генетически разнообразных источников и доноров аллелей, генов, QTL, детерминирующих хозяйственно ценные признаки с целью выведения новых высокопродуктивных сортов, обладающих групповой и комплексной длительной устойчивостью к болезням и вредителям, толерантных к различным абиотическим стрессорам, с улучшенными качественными характеристиками. Отметим, что задача повышения устойчивости к вредным организмам приоритетна для картофеля. Это обусловлено вегетативным размножением данной культуры, способствующим накоплению в растениях вирусных, виroidной, бактериальных, грибных и микоплазменных инфекций. Наиболее эффективный подход к расширению генетического разнообразия селекционных сортов основан на интрогрессии генетического материала диких и культурных видов картофеля.

В исследованиях по интрогрессивной гибридизации огромное значение имеет информация о межвидовом и внутривидовом генетическом разнообразии многочисленных видов картофеля; в свою очередь результаты изучения процессов гибридизации предоставили важные данные для уточнения вопросов филогении и систематики видов секции *Petota*.

Разнообразие видов картофеля и перспективы интрогрессии генетического материала диких видов в селекционный генофонд

Клубнеобразующие виды рода *Solanum* (картофель) относятся к секции *Petota*, которая, по оценкам ведущих специалистов, включает от 112 (Spooner et al., 2014) до 235 видов (Hawkes, 1990), произрастающих в основном вдоль западного побережья американских континентов от 38° с. ш. до 41° ю. ш. (Hijmans et al., 2002). Наибольшее разнообразие видов картофеля сосредоточено в Центральной Мексике и на Перуано-Боливийском горном плато (Hawkes, 1990, 1994; Hijmans, Spooner, 2001; Spooner et al., 2014). Помимо многочисленных дикорастущих видов в секцию *Petota* входит незначительное количество культурных видов (от 3 до 17, по оценкам разных систематиков), среди которых возделываемый картофель *S. tuberosum* имеет наибольшее экономическое значение. В представлениях о таксономическом составе и структуре секции *Petota* существуют значительные противоречия (Hawkes, 1956, 1990; Correll, 1962; Букасов, 1978). В традиционной систематике разные авторы разделяли виды секции *Petota* на разное число надвидовых таксонов. Так, С.М. Букасов (1978) выделял 25 подсекций и 36 серий, D. Correll (1962) – 32 серии, J. Hawkes (1990) – 21 серию. В настоящее время общепринятой классификации секции *Petota* не существует.

Виды картофеля образуют полный полиплоидный ряд (от $2n = 2x = 24$ до $2n = 6x = 72$), причем около 70 % из них являются диплоидами (Hawkes, 1990; Hijmans et al., 2007; Spooner et al., 2014) (Доп. материалы 1)¹. Во второй половине XX в. по результатам традиционного цитогенетического анализа мейоза межвидовых гибридов и полиплоидных видов был установлен геномный состав большинства видов секции *Petota* (Marks, 1955, 1965; Irikura, 1976; Matsubayashi, 1991). Согласно этим исследованиям, все культурные виды и их дикорастущие предшественники имеют базовый геном А. Многочисленные модификации генома А представлены у диких южноамериканских видов картофеля, ареалы которых находятся на территории современных Колумбии, Перу, Боливии, Аргентины, Чили. В состав аллополиплоидных геномов диких видов Северных Анд и Центральной Америки входят субгеномы А, Р или А, С, а в состав геномов отдаленных мексиканских аллополиплоидов – субгеномы А, В или А, D. Диплоидные доноры В, С, D и Р геномов в этих исследованиях не были идентифицированы.

С использованием современных подходов – геномной ДНК-ДНК гибридизации *in situ* на хромосомах (GISH) (Pendinen et al., 2008, 2012) и секвенирования однокопийных ядерных генов (Spooner et al., 2008; Rodríguez, Spooner, 2009; Rodríguez et al., 2010; Cai et al., 2012) – были получены новые данные о геномном составе мексиканских и ряда южноамериканских видов картофеля. Эти результаты обобщены в обзорах (Gavrilenko, 2011; Spooner et al., 2014). Интеграция данных молекулярных, биогеографических и морфологических исследований, выполненных в последние десятилетия, привела к появлению новых гипотез о филогенетических взаимосвязях существующих видов картофеля, а также к ревизии таксономического состава секции *Petota* (Spooner et al., 2004, 2014, 2016). Результаты этих исследований не поддерживают таксоны надвидовых рангов (подсекции и серии), так же как и выделение многих видов картофеля.

Результаты RFLP (restriction fragment length polymorphism) анализа хлоропластной ДНК (хлДНК) обозначили четыре клады: 1) мексиканские диплоидные виды серии *Pinnatisecta*, за исключением *S. cardiophyllum*; 2) *S. cardiophyllum* и *S. bulbocastanum*; 3) виды серии *Piurana* и ряд видов серии *Conicibaccata*; 4) все оставшиеся южноамериканские виды, полиплоиды Северной и Центральной Америки и диплоидный мексиканский вид *S. verrucosum* (Spooner et al., 1991; Spooner, Sytsma, 1992; Castillo, Spooner, 1997; Spooner, Castillo, 1997). Молекулярно-филогенетические исследования, выполненные с использованием различных молекулярных маркеров ядерной ДНК, обозначили три клады, которые формируют следующие группы видов, выделенные ранее в результате анализа полиморфизма хлДНК: (1+2), (3) и (4), см. обзор (Spooner et al., 2014). Отметим, что авторы современной системы не рассматривают полученные клады в качестве таксономических единиц, но в ряде случаев выделяют неформальные группы, указывая на то, что в этой области остается еще много нерешенных проблем (Spooner et al., 2004, 2014, 2016).

¹ Дополнительные материалы 1–3 см. в Приложении 1 по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2017-21/appx1.pdf>

В настоящем обзоре состав секции *Petota* приведен в соответствии с современной системой (Spooner et al., 2014) (см. Доп. материалы 1), а для согласования с данными других авторов использованы также таксономические категории, принятые в классификации (Hawkes, 1990), которая наиболее широко распространена в литературе в последние десятилетия.

Представления о таксономическом разнообразии и филогении секции *Petota* и близких секций рода *Solanum* имеют важнейшее значение для развития теоретических основ интрогрессивной гибридизации картофеля. Однако в практической селекции наибольший интерес представляет разделение генетического разнообразия дикорастущих видов картофеля на генные пулы в зависимости от потенциальных возможностей их использования в селекционном процессе. Согласно концепции генных пулов (Harlan, de Wet, 1971), к первичному генному пулу (GP1) относят виды, свободно скрещиваемые с сортами; образующиеся гибриды имеют регулярный мейоз и фертильное потомство. Ко вторичному генному пулу (GP2) относят дикие виды, вовлекаемые в гибридизацию с использованием традиционных методов; образующиеся гибриды частично фертильны, интрогрессия возможна. К третичному генному пулу (GP3) относят дикие виды, которые вовлекаются в интрогрессивную гибридизацию только при использовании радикальных методов преодоления межвидовой несовместимости на разных стадиях получения и развития гибридов.

Разделение видового разнообразия секции *Petota* на генные пулы (GP1, GP2, GP3) имеет свои особенности, связанные прежде всего со способностью видов картофеля преодолевать барьеры постзиготической несовместимости, которая определяется на основе теории «эффективной плоидности» или балансового числа эндосперма (endosperm balance number – EBN) (см. далее). Согласно данной теории, каждому виду присваивается определенное значение EBN в зависимости от результатов его участия в межвидовых скрещиваниях; в пределах секции *Petota* значения EBN видов варьируют от 1 до 4 (см. Доп. материалы 1).

К вопросу разделения видового разнообразия секции *Petota* на генные пулы обращались многие исследователи (Ortiz, 1998; Veilleux, De Jong, 2007; Bradeen, Haynes, 2011; Jansky et al., 2013; De Haan, Rodriguez, 2016), однако единого мнения о потенциале использования в селекции генетического разнообразия диких видов картофеля пока не сформировано.

К первичному генному пулу (GP1) большинство исследователей относят культурные виды картофеля, включающие все разнообразие аборигенных и селекционных сортов. S. De Haan, F. Rodriguez (2016) причисляют к GP1 также отдельные дикорастущие виды, которые принимали участие в формировании генофонда культурных видов картофеля: виды «комплекса *Solanum brevicaule*», *S. acaule*, *S. berthaultii* (= *S. tarijense*).

Ко вторичному генному пулу (GP2) относят подавляющее большинство южноамериканских диких видов разных уровней плоидности со значениями EBN, равными 2, 4 и 6, а также полиплоидные мексиканские виды различного геномного состава с EBN = 2 и EBN = 4 и диплоидный

мексиканский вид *S. verrucosum* (EBN = 2, геном AA). Дикие виды из GP2 могут непосредственно скрещиваться с *S. tuberosum* на основе подбора родительских пар с учетом направлений скрещиваний и значений балансового числа эндосперма. Ряд видов вторичного генного пула вовлекается в селекционный процесс с использованием bridge species – видов-посредников и эмбриокультуры (см. далее). Перечисленные методы позволяют преодолевать барьеры постзиготической несовместимости. Образующиеся гибриды культурного картофеля с видами из GP2 фертильны или частично фертильны. Отметим, что первичный и вторичный генные пулы включают виды, формирующие единую кладу 4 в молекулярно-филогенетическом анализе.

К третичному генному пулу (GP3) относят дикие диплоидные виды картофеля с EBN = 1, включающие мексиканские В-геномные виды (формирующие клады 1 + 2) и ряд южноамериканских видов с EBN = 1, например *S. commersonii*, *S. circaeifolium* (см. Доп. материалы 1). Прямая гибридизация видов из GP3 с *S. tuberosum* невозможна. Известны единичные примеры успешной гибридизации GP3 видов с помощью видов-посредников и последующего использования эмбриокультуры (Hermesen, 1994; Carputo et al., 1997; Sanetomo et al., 2014). Чаще всего виды третичного генного пула вовлекаются в селекционный процесс с использованием соматической гибридизации, позволяющей преодолевать барьеры презиготической несовместимости (см. далее).

Можно заключить, что, как и у представителей других родов и семейств, перспективы интрогрессии генетического материала дикорастущих видов секции *Petota* в селекцию определяются прежде всего пре- и постзиготической несовместимостью. Интрогрессивную гибридизацию картофеля также осложняют генно-цитоплазматическая стерильность гибридов (Анисимова, Гавриленко, 2017), снижение жизнеспособности и/или низкая фертильность гибридов ранних ВС поколений. Ниже приведен краткий обзор современного состояния исследований ключевых проблем межвидовой гибридизации картофеля, а также основных методов преодоления межвидовой несовместимости.

Репродуктивные барьеры между культурным картофелем и дикими видами секции *Petota* рода *Solanum*

Презиготическая несовместимость при гибридизации разных видов картофеля может проявляться в неспособности к скрещиваниям, связанной с ингибированием роста пыльцевых трубок в тканях пестика: как правило, они останавливаются в верхней трети пестика. На основе общих проявлений реакций взаимодействия пыльцы с тканями пестика при межвидовых и внутривидовых скрещиваниях еще в середине прошлого века была выдвинута гипотеза об общих генетических факторах, определяющих самонесовместимость и межвидовую несовместимость (Lewis, Crowe, 1958). В этой связи И.М. Суриков (1972, 1991) предложил рассматривать обобщенную несовместимость, которая, с одной стороны, препятствует инбридингу (во внутривидовых скрещиваниях), а с другой –

обуславливает изолирующие механизмы обособления видов (при межвидовых скрещиваниях).

Практически все диплоидные виды картофеля самонесовместимы (self-incompatible – SI). Для одного диплоидного вида картофеля – *S. verrucosum* ($2n = 2x = 24$, AA, EBN = 2) установлена самосовместимость (self-compatibility – SC) (Abdalla, Hermesen, 1973), так же как и для не клубненосных диплоидных видов из близких секций рода *Solanum* – *Etuberosum* и *Lycopersicum*. Полиплоидные виды картофеля в разной степени автофертильны. В литературе сообщалось о возможности отбора самофертильных форм у SI диплоидных культурных (*S. phureja*, *S. stenotomum*) и диких (*S. kurtzianum*, *S. neohawkesii*, *S. raphanifolium*, *S. pinnatisectum*, *S. sanctae-rosae*) видов картофеля (Cipar et al., 1964). К. Hosaka, R.E. Hanneman (1998a) идентифицировали ген *Sli* (*S*-locus inhibitor – ингибитор *S*-локуса) у нескольких самофертильных мутантных клонов дикого самонесовместимого вида *S. chacoense* и картировали его на хромосоме XII (Hosaka, Hanneman, 1998b).

В скрещиваниях самосовместимых и самонесовместимых видов проявляется односторонняя несовместимость (unilateral incompatibility – UI). Комбинация SI × SC характерна презиготическая несовместимость – рост пыльцевых трубок ингибирован (Lewis, Crowe, 1958). В реципрокных скрещиваниях SC × SI пыльцевые трубки SI-видов хорошо растут в тканях пестика SC-видов; эти комбинации могут быть результативными при отсутствии постзиготической несовместимости. Примером односторонней несовместимости могут служить скрещивания SC-вида *S. verrucosum* с самонесовместимыми видами картофеля (Jansky, Hamernik, 2009). Самофертильные мутанты SI-видов не проявляют UI (Eijlander, 1998).

Картофель принадлежит к растениям с гаметофитным контролем реакции самонесовместимости (Pandey, 1962; Cipar et al., 1964), которую детерминирует *S*-локус (Xu et al., 1990), картированный на хромосоме I (Rivard et al., 1996). *S*-локус включает несколько генов, для которых характерен множественный аллелизм. Опыление и оплодотворение происходят только в случае различающихся аллелей генов локуса *S* пыльцы (гаметофита) и пестика (спорофита). Изучение UI в случае гибридизации между SI-дигаплоидами *S. tuberosum* и SC-видом *S. verrucosum* показало, что в этот процесс помимо *S*-генов вовлечены и другие генетические факторы, которые не имеют *S*-аллельной специфичности и могут быть не сцеплены с *S*-локусом (Hermesen et al., 1974; Eijlander, 1998).

Гены самонесовместимости экспрессируются независимо в тканях пестика и в пыльцевой трубке (Trogitz, Schmidiche, 1993). Экспрессирующиеся в диплоидных тканях пестика ген(ы) локуса *S* кодируют цитотоксичные гликопротеины с рибонуклеазной активностью (S-PHКазы), которые могут беспрепятственно проходить через мембрану пыльцевой трубки. В ходе реакции самонесовместимости они разрушают РНК пыльцы, ингибируя и останавливая таким образом рост пыльцевых трубок (Clarke, Newbigin, 1993). Самосовместимые виды рода *Solanum*, например *S. verrucosum*, не содержат в пестиках *S*-специфических РНКаз (Eijlander, 1998), которые, однако, сохраняются у самофертильных мутантных форм картофеля (Thompson et al., 1991).

Гены *S*-локуса, экспрессирующиеся в пыльцевых трубках, кодируют SLF-протеины (F-бокс протеины *S*-локуса) (Eckardt, 2004), которые узнают подлежащие деградации РНКазы и располагают их определенным образом в специальном комплексе ферментов (E3 убиквитин-лигазном SCF-комплексе, включающем Skp1, Cullin1 и F-бокс компоненты). Подлежащие деградации протеины метятся путем АТФ-зависимого присоединения убиквитина. В реакцию самонесовместимости вовлечены продукты, как правило, нескольких *SLF*-генов, локализованных в *S*-локусе в непосредственной близости с геном, кодирующим определенную S-PHКазу. У представителей рода *Petunia* идентифицировано от 16 до 20 *SLF*-генов (Fujii et al., 2016), у *S. penellii* – 23, а у *S. lycopersicum* обнаружено 19 *SLF*-генов (Li, Chetelat, 2015). Каждый из SLF-протеинов способен распознавать один или несколько аллельных вариантов S-PHКаз, а весь набор SLF-протеинов определенного генотипа обеспечивает распознавание широкого спектра аллельных вариантов генов, кодирующих S-PHКазы, за исключением своего собственного варианта (Kubo et al., 2010; Fujii et al., 2016).

В совместимых комбинациях скрещиваний пыльцевые трубки защищены от цитотоксического действия S-PHКаз, которые деградируются 26S протеасомами (комплексом протеолитических ферментов, переваривающих меченные убиквитином протеины). В несовместимых комбинациях скрещиваний, например при самоопылении SI-видов, S-PHКазы пестика не распознаются SLF-протеинами пыльцы и сохраняют свою активность, обуславливающую остановку роста пыльцевых трубок. Полиплоидные виды, как правило, самосовместимы, так как в пыльцевых трубках высокогетерозиготных генотипов представлены SLF-протеины, соответствующие разным аллельным вариантам S-PHКаз, благодаря чему они способны распознавать собственные S-PHКазы (Kubo et al., 2010; Fujii et al., 2016).

Представленная выше модель получила название «совместного распознавания S-вариантов, отличных от самоопыления» (англ. collaborative non-self recognition system) (Kubo et al., 2010). Согласно данной модели, презиготическая несовместимость, проявляющаяся при гибридизации *S. tuberosum* (дигаплоиды) с филогенетически отдаленными диплоидными видами картофеля, например с *S. bulbocastanum*, обусловлена тем, что аллельное разнообразие набора *SLF*-генов одного вида может не обеспечивать распознавания отдельных (или большинства) вариантов S-PHКаз другого вида.

Роль презиготической несовместимости в межвидовой гибридизации картофеля относительно ограничена. Так, например, отмечены высокие значения показателя роста пыльцевых трубок высокофертильных дигаплоидов *S. tuberosum* в столбиках пестиков большинства из изученных 194 образцов 24 диких южноамериканских и полиплоидных мексиканских видов картофеля из GP2 (Маханько, 2008). Можно полагать, что у многих диких видов картофеля могут быть выделены генотипы, для которых презиготические барьеры не являются препятствием в скрещиваниях с *S. tuberosum*. В то же время при гибридизации высокофертильных дигаплоидов *S. tuberosum* (опылители) с отдаленными мексиканскими

диплоидными видами (геном ВВ) из GP3 отмечена высокая частота комбинаций с выраженной презиготической несовместимостью (100 % – с *S. bulbocastanum*, 86 % – с *S. pinnatisectum*, 69 % – с *S. jamesii*) (Маханько, 2008).

Постзиготическая несовместимость, проявляющаяся после оплодотворения, наиболее часто связана с угнетением и гибелью гибридного зародыша или с аномальным развитием и нежизнеспособностью гибридных семян вследствие нарушений развития эндосперма. У семенных растений эндосперм – это один из важнейших элементов семени, выполняющий функцию питания зародыша в ходе его развития с момента образования зиготы. У диплоидных видов триплоидный ($3x$) эндосперм формируется в результате оплодотворения центральной клетки ($2x$) зародышевого мешка одним из спермиев (x); второй спермий (x) оплодотворяет гаплоидную яйцеклетку (x) с образованием диплоидной зиготы ($2x$). Генотип эндосперма идентичен генотипу зародыша, отличаясь от него лишь дозой генов материнского родителя. В норме после оплодотворения центральная клетка претерпевает несколько циклов митотических делений без цитокинеза. В результате образуется синтиций с многочисленными ядрами без клеточных перегородок (Berger, 2003). При переходе зародыша к стадии сердечка начинается процесс перехода от ядерного к клеточному состоянию (*англ.* cellularization) эндосперма. По завершении формирования клеток эндосперм более не развивается, он поддерживает рост зародыша и постепенно дегенерирует.

В межвидовых, а также внутривидовых интерплоидных скрещиваниях разных видов растений имеют место различные нарушения в развитии эндосперма гибридных семян, касающиеся прежде всего продолжительности синтициальной стадии и сроков начала клеточной стадии развития эндосперма: преждевременное образование клеток или более позднее по сравнению с нормой (внутривидовые скрещивания между формами с одинаковым уровнем ploидности) начало этой стадии; отсутствие клеточной стадии. Также могут происходить нарушения митотических делений в ядрах эндосперма и разрастание эндотелия. У многих видов растений, в том числе картофеля, эти и другие нарушения развития эндосперма приводят к гибели зародыша на ранних стадиях. В частности, при гибридизации диплоидного и тетраплоидного картофеля триплоидные гибриды чаще всего не образуются, вне зависимости от направления скрещиваний. Это явление, получившее название «триплоидный блок» (Marks, 1966), позднее было исследовано в модельной системе с разнотипными формами диплоидного вида *Arabidopsis thaliana*. В норме – в скрещиваниях диплоидных форм ($2x \times 2x$) – соотношение материнских и отцовского геномов в гибридном эндосперме составляет 2:1, формируются жизнеспособные диплоидные зародыши в семенах нормального размера. В скрещиваниях $4x \times 2x$ соотношение материнского и отцовского геномов в гибридном эндосперме составляет 4:1 (доза геномов материнского родителя повышена по сравнению с нормой), образуются жизнеспособные мелкие семена. При этом наблюдается преждевременное наступление стадии образования клеток в эндосперме гибридных семян. В обратных скрещиваниях ($2x \times 4x$) соотношение материнского

и отцовского геномов в эндосперме составляет 2:2 (доза геномов отцовского родителя повышена по сравнению со скрещиваниями диплоидных форм), формируются крупные семена с нежизнеспособными в большинстве случаев зародышами, что коррелирует с поздним наступлением или отсутствием клеточной стадии развития эндосперма (Berger, 2003). Аналогичная картина нередко наблюдается и при межвидовой гибридизации, например у картофеля (Ehlenfeldt, Hanneman, 1988), что дало основание предполагать наличие общих механизмов постзиготической несовместимости при межвидовых и интерплоидных внутривидовых скрещиваниях (Hanneman, 1999).

Общее правило, согласно которому нормальное развитие эндосперма возможно только в случае, когда соотношение материнского и отцовского геномов в эндосперме составляет строго 2:1, было сформулировано в работе (Nishiyama, Inomata, 1966). Позднее эта гипотеза получила экспериментальное подтверждение (Lin, 1984). Для того чтобы в эндосперме соблюдалось указанное соотношение 2:1, родительские формы должны иметь одинаковый уровень ploидности. Однако в некоторых межвидовых скрещиваниях картофеля это правило не действует. Так, дикий тетраплоидный вид *S. acaule* и аллотетраплоидные мексиканские виды картофеля не скрещиваются с тетраплоидными сортами *S. tuberosum*, хотя соотношение геномов родительских видов в эндосперме гибридных семян составляет 4:2 (т. е. равно 2:1). В то же время указанные дикие тетраплоидные виды образуют триплоидные гибриды в скрещиваниях с дигаметами *S. tuberosum*, хотя у гибридных семян, полученных в этих комбинациях, в эндосперме соотношение материнского и отцовского геномов составляет 4:1. Для объяснения указанных отклонений была предложена гипотеза балансового числа эндосперма (Johnston et al., 1980). Значение EBN («эффективной ploидности»), устанавливаемое для каждого вида картофеля экспериментально, определяет возможность данного вида участвовать в определенных межвидовых скрещиваниях (формировать эндосперм и жизнеспособные гибридные семена). Согласно гипотезе EBN, для нормального развития гибридного зародыша в межвидовых скрещиваниях в эндосперме должно соблюдаться соотношение 2:1 «эффективной ploидности» материнского и отцовского родительских видов, а не их реальных уровней ploидности (Johnston et al., 1980).

Величину EBN для каждого вида картофеля определяют путем скрещиваний со стандартными видами, у которых значения EBN точно известны. Первым стандартным видом был выбран аргентинский дикий диплоидный вид *S. chacoense* ($2n = 2x$), ему присвоено EBN, равное 2 (Johnston, Hanneman, 1980). Всем видам картофеля, которые успешно скрещивались с *S. chacoense*, также было присвоено значение EBN = 2. Величина EBN каждого вида является постоянной и может не совпадать с его уровнем ploидности (см. Доп. материалы 1). Так, у тетраплоидных видов ($2n = 4x$) *S. acaule* и *S. stoloniferum* значение эффективной ploидности равно двум (EBN = 2), поскольку они успешно скрещивались с *S. chacoense*. В то же время тетраплоидному возделываемому картофелю *S. tuberosum* ($2n = 4x$) и гексаплоидному мексиканскому виду *S. demissum* ($2n = 6x$) присвоено EBN = 4, поскольку

они формировали жизнеспособные гибридные семена в скрещиваниях с тетраплоидными формами *S. chacoense*, полученными с помощью колхицина. Для большинства видов секции *Petota* установлены значения «эффективной плоидности», в соответствии с которыми их можно разделить на три группы: EBN = 1 ($2n = 2x$), EBN = 2 ($2n = 2x$, $2n = 4x$) и EBN = 4 ($2n = 4x$, $2n = 6x$) (см. Доп. материалы 1). Виды картофеля с одинаковыми значениями «эффективной плоидности» (EBN) успешно скрещиваются между собой, поэтому информация о значениях «эффективной плоидности» культурных и диких видов картофеля широко востребована в исследованиях по интрогрессивной гибридизации и в практической селекции.

В фундаментальных исследованиях EBN рассматривают в качестве одного из механизмов изоляции симпатрических видов. Например, аргентинские диплоидные виды *S. commersonii* (EBN = 1) и *S. chacoense* (EBN = 2) произрастают на одной территории, но практически не скрещиваются между собой (Summers, Grun, 1981; Ortiz, Ehlenfeldt, 1992). Высказано предположение, что новые виды могли возникать в результате мутаций генов, действие которых оказывает сильное влияние на развитие эндосперма и приводит к изменению EBN (Johnston et al., 1980). По мнению (Ehlenfeldt, Hanneman, 1988), увеличение значений EBN могло происходить в результате дупликации генов, контролирующих этот признак, или в результате изменения уровня экспрессии этих генов.

В настоящее время нарушения в развитии эндосперма гибридных семян связывают с геномным импринтингом — дифференциальной экспрессией материнских и отцовских аллелей определенных генов. Для разных организмов, включая отдельные виды растений (например, арабидопсис), показано, что экспрессия импринтированных генов определяется активностью комплекса FIS PRC2 (fertilization independent seed polycomb repressive complex 2) (Kinoshita, 2007; Pignatta, Gehring, 2012; Tonosaki et al., 2016). Белки группы Polycomb представляют собой семейство эпигенетических регуляторов, которые модифицируя гистоны, подавляют транскрипцию генов, детерминирующих клеточную дифференциацию. В частности, комплекс PRC2 вызывает репрессию генов-мишеней путем три-метилирования лизина 27 в гистоне H3.

Одними из первых у растений были идентифицированы импринтированные гены комплекса PRC2: *MEA* (*MEDEA*), *FWA* и *FIS2*, регулирующие формирование эндосперма. После оплодотворения эти гены экспрессируются исключительно в геноме, полученном от материнского родителя, и подавляют пролиферацию клеток эндосперма. Мутации генов комплекса PRC2 вызывают нарушения баланса импринтированных генов материнского и отцовского происхождения, что проявляется в нарушениях развития эндосперма, наблюдаемых при интерплоидных внутривидовых и межвидовых скрещиваниях (Kinoshita, 2007).

Мишенью комплекса PRC2 является ген *ADM*, который экспрессируется в геноме, полученном гибридами от отцовского родителя, и репрессируется в материнском геноме. Использование в гибридизационном процессе мутантов арабидопсиса по гену *ADM* позволяет получать жизнеспособные триплоидные семена (Kradolfer et al., 2013).

В работе (Xiao et al., 2006) продемонстрирована ключевая роль процессов метилирования — деметилирования ДНК в регуляции развития эндосперма и формировании жизнеспособных семян. Показано, что мутация *met1* у арабидопсиса, проявляющаяся в гипометилировании промоторной области импринтированного гена *MEDEA*, приводит к преждевременному переходу к клеточной стадии формирующегося эндосперма семян и к снижению жизнеспособности зародышей (Xiao et al., 2006). Аналогичные эффекты наблюдаются при интерплоидных скрещиваниях. Так, установлено (Schatlowski et al., 2014), что использование мутанта арабидопсиса по гену *met1* в скрещиваниях $2x \times 4x$ позволяет практически полностью преодолеть триплоидный блок и получить нормальные семена с высокой всхожестью. Мутация *met1* приводит к супрессии гена *ADM*, что, по мнению авторов (Schatlowski et al., 2014), является основной причиной восстановления жизнеспособности триплоидных семян.

В свете современных представлений о механизмах взаимодействия родительских геномов при формировании эндосперма отнесение двух видов к одной и той же группе EBN определяется балансом продуктов импринтированных генов, который складывается в формирующемся гибридном семени. Получение жизнеспособных семян межвидовых гибридов (соответственно, включение скрещиваемых видов в группу с одинаковыми значениями EBN) возможно в том случае, если этот баланс обеспечивает нормальное прохождение всех стадий развития эндосперма. Остановка развития эндосперма гибридных семян связана с нарушением эпигенетической регуляции генов материнского и отцовского родителей при его формировании.

Методы преодоления межвидовой несовместимости

Проведение межвидовой гибридизации предъявляет высокие требования к условиям выращивания родительских форм растений, проведения скрещиваний и формирования гибридных семян. Для повышения эффективности этих этапов используют различные приемы и методы: обработку пыльцы и завязей физиологически активными веществами, использование двойного опыления (пыльцой совместимых и несовместимых видов), культивирование *in vitro* изолированных семяпочек и зародышей и др. (Hermesen, 1994; Jansky, 2006; Ермишин и др., 2010). Однако наиболее эффективные методы межвидовой гибридизации картофеля основаны на использовании информации о механизмах пре- и постзиготической межвидовой несовместимости.

Преодоление презиготической несовместимости

Как отмечалось выше, презиготическая несовместимость не является основным фактором, затрудняющим гибридизацию *S. tuberosum* с большинством диких видов картофеля из вторичного генного пула. Однако она может существенно осложнить интрогрессию в селекционный материал генетического материала диких видов из GP3, а также диких видов из GP2, для которых характерна односторонняя несовместимость в скрещиваниях с *S. tuberosum*.

Наиболее простой способ преодоления презиготической несовместимости скрещиваемых видов – подбор совместимых комбинаций (Jansky, 2006; Маханько, 2008). Для оценки степени совместимости/несовместимости образцов скрещиваемых видов проводят изучение роста пыльцевых трубок в пестиках после окрашивания флуорохромом анилиновым синим (Martin, 1958).

Как уже говорилось, комбинациям скрещиваний мексиканских диплоидных В-геномных видов из GP3 (EBN = 1) с высокофертильными дигаплоидами *S. tuberosum* характерна выраженная презиготическая несовместимость (Маханько, 2008). Однако японским исследователям (Sanetomo et al., 2014) удалось создать гибриды мексиканского вида *S. pinnatisectum* ($2n = 2x$, геном BB, EBN = 1) с диплоидными гибридными клонами картофеля ($2n = 2x$, EBN = 2), полученными в скрещиваниях примитивных культурных видов (*S. phureja*, *S. stenotomum*) и мутантного образца южноамериканского дикого вида *S. chacoense*, несущего мутацию самосовместимости *Sli* (Hosaka, Hanpeman, 1998a). Авторы сделали вывод, что ген *Sli* ингибирует не только реакцию самонесовместимости, но и межвидовую презиготическую несовместимость (Sanetomo et al., 2014). Для преодоления постзиготической несовместимости в этих скрещиваниях использовался тетраплоидный клон *S. pinnatisectum* ($2n = 4x$, EBN = 2), митотическое удвоение хромосом которого было выполнено для повышения величины «эффективной плоидности» данного вида.

Вовлечению в селекционный процесс самосовместимого (SC) мексиканского вида *S. verrucosum* ($2n = 2x$, геном AA, EBN = 2) из GP2, устойчивого к ряду патогенов, препятствует односторонняя несовместимость. Презиготическая несовместимость проявляется в скрещиваниях SI × SC, поэтому в межвидовых скрещиваниях с самонесовместимыми (SI) видами картофеля *S. verrucosum* может быть использован только в качестве материнской формы – SC × SI. В то же время межвидовые гибриды с цитоплазмой *S. verrucosum*, как правило, характеризуются мужской стерильностью (Abdalla, Hermesen, 1973). Для преодоления односторонней несовместимости и получения фертильных гибридов с *S. verrucosum* успешно используются «акцепторные генотипы» дигаплоидов *S. tuberosum* или других диплоидных видов, которые не проявляют одностороннюю несовместимость в SI × SC скрещиваниях (Grun, Aubertin, 1966; Hermesen et al., 1974; Eijlander et al., 2000).

Обнаружение акцепторных генотипов позволило получить так называемые S_vS_v -линии, которые представляют собой гибриды F2, полученные в комбинации скрещиваний дигаплоидов *S. tuberosum* × *S. verrucosum* (Полухович и др., 2010). Они несут в гомозиготном состоянии ген S_v от *S. verrucosum*, благодаря чему, как и *S. verrucosum*, не образуют пестичных S-РНКаз. Это свойство позволяет устранить презиготическую несовместимость при межвидовых скрещиваниях. В частности, *S. verrucosum* и S_vS_v -линии оказались эффективными для преодоления односторонней несовместимости в скрещиваниях с дикими тетраплоидными видами *S. acaule* и *S. stoloniferum* (Полухович и др., 2013; Левый и др., 2016).

Очевидно, что *S. verrucosum* и полученные на его основе S_vS_v -линии способны устранять презиготическую несовместимость, что обусловило их успешное приме-

нение в программах по интрогрессивной гибридизации, направленных на вовлечение в селекцию ценного генофонда диплоидных (EBN = 1) диких видов картофеля из GP3 (Hermesen, Ramanna, 1976; Dinu et al., 2005; Jansky, Hamernik, 2009; Yermishin et al., 2014; Ермишин и др., 2017) (Доп. материалы 2, б).

Использование методов соматической гибридизации. Для преодоления презиготической несовместимости культурного картофеля с дикими видами третичного генопула и с более отдаленными видами семейства пасленовых активно используются методы соматической гибридизации. Гибридные растения-регенеранты получены в комбинациях слияния протопластов *S. tuberosum* с многими дикими видами рода *Solanum* (Waara, Glimelius, 1995; Гавриленко, 2005; Davey et al., 2005). Однако на следующих этапах интрогрессивной гибридизации исследователи сталкиваются с проблемами стерильности гибридов, генетической нестабильности, летальности или пониженной жизнеспособности гибридного потомства и потерей гибридами целевых признаков, поскольку генетические факторы, вовлеченные в контроль пре- и постзиготической несовместимости, оказывают негативный эффект и в более поздних поколениях. Поэтому исследований, в которых получено фертильное потомство в возвратных скрещиваниях (BC) соматических гибридов с культурным картофелем, совсем немного. Первые беккроссные поколения, как правило, получают на основе подбора родительских компонентов скрещиваний с учетом информации о значениях EBN, эффектах гено-цитоплазматической мужской стерильности, а также с использованием методов культуры *in vitro* незрелых семян или эмбриокультуры. Анализ беккроссных поколений соматических гибридов (как и в исследованиях потомства гибридов, полученных на основе половой гибридизации) проводится с использованием методов фенотипической селекции и маркер-опосредованного отбора. Примеры успешных работ по межвидовой соматической гибридизации картофеля, в которых были реализованы различные этапы (1–4) интрогрессивной гибридизации, приведены ниже и в Доп. материалах 3.

Этап 1. Создание межвидовых соматических гибридов картофеля, полученных с участием диких видов третичного генового пула (EBN = 1): *S. bulbocastanum* (Helgeson et al., 1998), *S. tarnii* (Thieme et al., 2008), *S. commersonii* (Chen et al., 1999; Carputo et al., 2000), а также с участием отдаленных некультурных видов из других секций рода *Solanum*: *S. brevidens* (Austin et al., 1993), *S. etuberosum* (Novy et al., 2002; Gavrilenko et al., 2003), *S. nigrum* (Horsman et al., 2001). В этих работах были получены первые поколения от скрещиваний соматических гибридов, в которых были отобраны гибридные формы с целевыми признаками диких видов: устойчивостью к бактериальным гнилям, фитофторозу, нематодам, вирусам, тле и кратковременным заморозкам (см. Доп. материалы 3).

Этап 2. Создание доноров устойчивости к патогенам, несущих единичные чужеродные хромосомы и/или хромосомные сегменты генома диких видов. Различные механизмы интрогрессии генетического материала отдаленных диких видов в геном *S. tuberosum* выявлены с использованием хромосом-специфичных полиморфных

ДНК-маркеров и методов молекулярной цитогенетики. Так, возможность интрогрессии генетического материала *S. brevidens* в геном *S. tuberosum* на основе межгеномных транслокаций продемонстрирована в молекулярно-генетическом (RFLP) анализе «высоких» ВС поколений соматических гибридов (Helgeson et al., 1993; McGrath et al., 2002). Устойчивые к *Erwinia carotovora* интрогрессивные формы возделываемого картофеля, замещенные по хромосоме VIII *S. brevidens*, были отобраны среди ВС потомства соматических гибридов *S. tuberosum* (+) *S. brevidens* (Tek et al., 2004). Возможность гомеологичного межгеномного спаривания хромосом А-генома *S. tuberosum* и Е-генома не клубненосного вида *S. etuberosum* продемонстрирована в GISH-FISH анализе уникальных аллогамноидных гибридов, полученных с использованием методов клеточной и хромосомной инженерии (Gavrilenko et al., 2015).

Этап 3. Картирование и идентификация генов/QTLs, детерминирующих целевые признаки, и разработка тесно сцепленных с ними маркеров. В результате косегрегационного анализа ВС популяций, полученных в возвратных скрещиваниях межвидовых соматических гибридов, были картированы гены *S. bulbocastanum*: *RMcl* (XI), детерминирующий устойчивость к нематоду *Meloidogyne chitwoodi* (Brown et al., 1995, 1996) и *RB* (VIII), контролирующей нерасоспецифичную устойчивость к *Phytophthora infestans* (Naess et al., 2000, 2001), а также ген *Rlr_{etb}* (IV) не клубненосного вида *S. etuberosum*, который детерминирует устойчивость к ВСЛК (Novy et al., 2002, 2007) (см. Доп. материалы 3).

В отдельных работах выполнена молекулярная идентификация генов дикорастущих видов, интрогрессированных в геном *S. tuberosum* с использованием методов слияния протопластов. Так, группа проф. J.P. Helgeson провела структурно-функциональный анализ и клонирование гена *RB* (VIII) дикорастущего вида *S. bulbocastanum*, а также конструирование векторных систем, содержащих данный ген (Bradeen et al., 2003; Song et al., 2003; Kuhl et al., 2007), которые могут быть использованы для трансгенеза широкого круга культурных видов семейства пасленовых, поражаемых фитофторой.

Этап 4. Вовлечение в селекционный процесс генов/QTLs диких видов, ранее не использованных в селекции; расширение генетического разнообразия культурного картофеля; создание пребридингового материала; выведение новых сортов. В экспериментах, проведенных группой проф. R. Novy, в результате молекулярно-генетического анализа интрогрессивных форм BC₃-BC₄ поколений соматических гибридов *S. tuberosum* (+) *S. etuberosum* была разработана серия ДНК-маркеров, фланкирующих ген *Rlr_{etb}* (IV), который детерминирует устойчивость к ВСЛК (Gillen, Novy, 2007; Kelley et al., 2009; Kuhl et al., 2016), что позволяет проводить эффективный молекулярный скрининг селекционных клонов – доноров гена *Rlr_{etb}* в программах по созданию новых устойчивых к ВСЛК сортов, возделывание которых позволит снизить инсектицидную нагрузку в агробиоценозах.

Южнокорейские исследователи (Kim et al., 2013) сообщили о выведении сорта картофеля 'Jeseo', устойчивого к возбудителю мокрой гнили, парше и ВСЛК, созданного на основе интрогрессивных форм, выделенных в воз-

вратных скрещиваниях соматических гибридов *S. tuberosum* (+) *S. brevidens*.

Еще одним перспективным направлением соматической гибридизации картофеля является получение аллоплазматических форм, поскольку односторонняя межвидовая несовместимость, наблюдаемая в межвидовых скрещиваниях видов секции *Petota*, осложняет создание таких форм методами половой гибридизации. Как известно, соматическая гибридизация позволяет осуществлять перенос органелл между видами и создавать новые формы культурных растений с различными комбинациями ядерных, митохондриальных и пластидных генов, в том числе цитоплазматические гетерозиготы и формы с рекомбинантными органелльными геномами (Glimelius et al., 1991; Waara, Glimelius, 1995). Изучение особенностей передачи геномов органелл родительских видов в процессе межвидовой соматической гибридизации *S. tuberosum* с дикими видами картофеля из GP3 и с отдельными не клубненосными видами рода *Solanum*, а также при беккроссировании соматических гибридов не выявило эффектов ядерно-цитоплазматической несовместимости и/или несовместимости пластид и митохондрий отдаленных видов (Scotti et al., 2003; Gavrilenko et al., 2005; Антонова, Гавриленко, 2006). Практический интерес представляют работы по созданию форм с цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС). Возможность интрогрессии ЦМС от дикорастущего вида *S. stoloniferum* к *S. tuberosum* на основе метода асимметричной соматической гибридизации продемонстрирована в работе (Perl et al., 1990).

Преодоление постзиготической несовместимости на основе варьирования значений EBN (мейотическая и митотическая полиплоидизация) и использования видов-посредников

Концепция балансового числа эндосперма нашла широкое применение в зарубежных селекционно-генетических программах (и, к сожалению, недостаточно используется отечественными исследователями). Информация о значениях «эффективной плоидности» (EBN) скрещиваемых видов имеет первостепенное значение для подбора видов для гибридизации, планирования скрещиваний, прогнозирования результатов преодоления постзиготических барьеров несовместимости, оптимизации программ по модификации уровней плоидности – значений EBN образцов родительских видов и схем использования видов-посредников с целью интрогрессии генофонда дикорастущих видов в селекционный материал.

Виды картофеля делятся на группы со значениями EBN = 1 ($2n = 2x$), EBN = 2 ($2n = 2x$, $2n = 4x$) и EBN = 4 ($2n = 4x$, $2n = 6x$) (см. Доп. материалы 1). В случае отсутствия барьеров презиготической несовместимости виды с одинаковыми значениями EBN относительно легко скрещиваются друг с другом, формируя жизнеспособные гибридные семена. Вовлечение в гибридизацию видов картофеля с разными значениями EBN возможно при использовании специальных экспериментальных подходов, основанных на манипуляциях с уровнем плоидности скрещиваемых образцов. Как отмечалось выше, около 70 % диких видов картофеля являются диплоидами, причем у большинства из них значения EBN равны 2 (см. Доп.

материалы 1). Для успешной гибридизации этих видов с сортами возделываемого картофеля *S. tuberosum* ($2n = 4x$, EBN = 4) необходимо либо повысить величину EBN дикорастущих видов (удвоив плоидность), либо снизить EBN сортов (уменьшив уровень плоидности, получить дигаплоиды), чтобы уравнивать значения «эффективной плоидности» скрещиваемых образцов и достичь соотношения 2:1 «эффективных плоидностей» материнской и отцовской родительских форм в эндосперме формирующихся гибридных семян (см. Доп. материалы 2, а).

Для повышения EBN используют либо митотическое удвоение хромосом отобранных образцов диких диплоидных видов – экспериментальную полиплоидию, либо мейотическое удвоение хромосом (Johnston, Hanneman, 1980; Carputo et al., 1997). В популяциях диплоидных дикорастущих видов картофеля наблюдается относительно высокая частота генотипов, образующих $2n$ гаметы (Jansky et al., 1990; Hijmans et al., 2007), которые формируются в результате реституции первого (first division restitution – FDR) или второго (second division restitution – SDR) делений мейоза (Ramanna, 1979). У картофеля к формированию FDR-гамет приводит мутация *ps* (parallel spindles) (Mok, Peloquin, 1975) или *fs* (fused spindles) (Ramanna, 1979), легко детектируемая по образованию параллельных или слитых веретен деления в метафазе II, что позволяет отбирать *ps ps* (или *fs fs*) генотипы среди образцов диких видов. К образованию гамет SDR-типа, связанного с утратой второго деления мейоза, приводят мутации *os* (omission of the second meiotic division), *fc* (failure of cytokinesis) (Werner, Peloquin, 1990) и *pc* (premature cytokinesis) (Mok, Peloquin, 1975). FDR-гаметы формируются в микроспорогенезе, SDR-гаметы – и в микро-, и в макроспорогенезе. В селекционно-генетических исследованиях преимущество имеют генотипы, которые формируют FDR-гаметы, несущие несестринские хроматиды, поскольку в этом случае сохраняется высокий уровень гетерозиготности (Ramanna, 1983; Hermesen, 1984; Peloquin et al., 1999). Селекцию гибридов, полученных в скрещиваниях $4x \times 4x$ (с участием экспериментальных полиплоидов диких диплоидных видов) или в скрещиваниях $4x \times 2x$ (с участием генотипов диких диплоидных видов, формирующих $2n$ гаметы), ведут на тетраплоидном уровне.

Для понижения значения EBN *S. tuberosum* получают дигаплоиды ($2n = 2x$, EBN = 2) селекционных сортов, которые относительно легко скрещиваются со многими диплоидными дикими видами картофеля ($2n = 2x$, EBN = 2), произрастающими в Южной Америке – комбинации скрещиваний $2x \times 2x$. Это направление интрогрессии генетического материала диплоидных диких видов в селекционный материал наиболее эффективно, поскольку включает проведение отбора на диплоидном уровне. В селекции картофеля для снижения уровня плоидности сортов и тетраплоидных селекционных форм (для получения дигаплоидов) используются специальные клоны-опылители (например, IvP 35 и IvP 48 *S. phureja*). В качестве механизмов получения дигаплоидов *S. tuberosum* рассматривают псевдогамию (гиногенез) (Hermesen, Verdenius, 1973). Некоторые исследователи полагают, что к образованию дигаплоидов приводит избирательная элиминация хромосом опылителей – клонов *S. phureja*

(Clulow et al., 1991). Возврат на исходный тетраплоидный уровень отобранных диплоидных гибридных клонов осуществляется через мейотическую полиплоидизацию (Peloquin et al., 1989; Jansky et al., 1990).

Дикие тетраплоидные виды *S. acaule*, *S. hijertingii*, *S. stoloniferum* ($2n = 4x$, EBN = 2) вовлекаются в гибридизацию с *S. tuberosum* ($2n = 4x$, EBN = 4) на основе различных манипуляций с уровнем плоидности; селекционный процесс проводится на полиплоидном уровне от $3x$ до $6x$ (см. Доп. материалы 2, а). Впервые возможность получения диплоидных гибридов в скрещиваниях *S. acaule* и *S. stoloniferum* (= *S. fendleri*, *S. polytrichon*) и дигаплоидов *S. tuberosum* была продемонстрирована в работах (Воронкова и др., 2007; Ермишин и др., 2010). Среди диплоидных гибридов выделены генотипы с высокой устойчивостью к ХБК, УБК и фитофторозу (Воронкова и др., 2008, 2015; Левый и др., 2015). Поскольку для диплоидных гибридов, полученных в комбинации *S. stoloniferum* ($2n = 4x$, EBN = 2, геном AABB) $\times$ дигаплоиды *S. tuberosum* ($2n = 2x$, EBN = 2, геном AA), характерен регулярный мейоз и, как следствие, высокая фертильность, было сделано заключение, что помимо генома *A S. tuberosum* диплоидные гибриды несут и гомологичный ему субгеном *A' S. stoloniferum* (Воронкова и др., 2007). По нашему мнению, возможным механизмом образования таких диплоидных гибридов может быть избирательная элиминация хромосом субгенома В аллотетраплоидного дикого вида *S. stoloniferum* при формировании гибридных зародышей. Данное предположение требует экспериментального подтверждения.

Дикие виды картофеля из третичного генного пула с EBN = 1, которые не скрещиваются ни с сортами, ни с дигаплоидами возделываемого картофеля, вовлекают в селекционный процесс путем промежуточных скрещиваний с видами-посредниками (bridge species). Виды-посредники могут скрещиваться с отобранными образцами исходных несовместимых диких видов, а полученные гибриды или их потомство в отдельных случаях возможно вовлечь в гибридизацию с сортами *S. tuberosum* или его дигаплоидами (см. Доп. материалы 2, б) (Hermesen, Ramanna, 1976; Hermesen, 1994; Dinu et al., 2005; Jansky, Hamernik, 2009; Yermishin et al., 2014; Ермишин и др., 2017). Например, диплоидные В-геномные виды из GP3 – *S. bulbocastanum* и *S. cardiophyllum* ($2n = 2x$, EBN = 1) с длительной нерасоспецифической устойчивостью к фитофторозу – удалось вовлечь в интрогрессивную гибридизацию с использованием диких (*S. acaule*, *S. verrucosum*) и культурных (*S. phureja*) видов-посредников. Отметим, что большинство гибридов, созданных с участием видов-посредников, получены вопреки правилу EBN, поэтому реализация каждого из этапов потребовала много времени и была сопряжена со значительными трудозатратами при очень низкой результативности. Так, для получения 36 четырехвидовых гибридных форм АВРТ (*S. acaule* – *S. bulbocastanum* – *S. phureja* – *S. tuberosum*) (см. Доп. материалы 2, б) потребовалось опылить в общей сложности 18616 цветков (Hermesen, 1994), а на создание первых сортов Толука и Бионика с интрогрессивированным от *S. bulbocastanum* геном устойчивости к фитофторозу *Rpi-blb2* голландские исследователи затратили 46 лет (Haverkort et al., 2009).

Заключение

На протяжении последних ста лет межвидовая гибридизация была основным методом расширения генетического разнообразия селекционного материала и создания новых сортов картофеля. Большинство современных селекционных сортов являются комплексными многовидовыми гибридами. В то же время из-за барьеров пре- и постзиготической несовместимости в генофонд селекционных сортов был интрогрессирован генетический материал лишь около 10 % дикорастущих видов картофеля. Чаще всего в селекцию вовлекались гибриды с отдельными дикими видами первичного и вторичного генных пулов: *S. acaule*, *S. chacoense*, *S. demissum*, *S. spagazzinii* (= *S. brevicaulle*), *S. stoloniferum*, *S. vernei*, в меньшей мере – *S. maglia*, *S. microdontum*, *S. sparsipilum* (= *S. brevicaulle*), *S. verrucosum* (Ross, 1986), причем в гибридизационном процессе принимало участие очень ограниченное число образцов каждого из дикорастущих видов. В результате этих усилий в генофонд селекционных сортов от диких видов были интрогрессированы: ряд ценных генов и QTLs, контролирующих устойчивость к патогенам, например гены *R1–R11* расоспецифичной устойчивости к фитофторозу от *S. demissum*; гены устойчивости к вирусам – к ХБК ген *Rx2* от *S. acaule*, к УБК гены *RY_{chc}* и *NY_{chc}* от *S. chacoense* и гены *RY_{sto}*, *Ry-f_{sto}* от *S. stoloniferum*; гены устойчивости к цистообразующим нематодам – *GroVI* от *S. vernei*, *GroI* от *S. spagazzinii* (= *S. brevicaulle*) (Ross, 1986; Simko et al., 2007; Gebhardt, 2013; Ramakrishnan et al., 2015). При этом эффективность межвидовой гибридизации остается низкой, реализация программ по преодолению несовместимости видов, интрогрессии целевых признаков и созданию доноров новых генов занимает многие годы и требует больших трудозатрат.

В последние десятилетия получены новые фундаментальные данные о механизмах пре- и постзиготической несовместимости. Разработаны новые технологии (клеточная и хромосомная инженерия, маркер-опосредованный отбор и геномная селекция), повышающие эффективность традиционных методов интрогрессивной гибридизации. Анализ литературных данных показывает, что наиболее перспективны комплексные подходы, основанные прежде всего на использовании информации о механизмах пре- и постзиготической несовместимости, анализе меж- и внутривидового генетического разнообразия и на применении комбинации разных методов интрогрессивной гибридизации. Наиболее часто используются следующие методы и подходы: поиск акцепторных генотипов и видов-посредников, манипуляция с уровнем пloidности с целью модификации значений EBN образцов скрещиваемых видов, привлечение биотехнологических и молекулярных подходов для контроля интрогрессии и развития новых направлений по пирамидированию *R*-генов устойчивости для создания сортов нового поколения с широким спектром длительной устойчивости.

В результате использования комплексных подходов, основанных на сочетании традиционных и современных методов, в интрогрессивную гибридизацию удалось вовлечь дикие виды третичного генного пула и отдельные неклубненосные виды близких секций рода *Solanum*, хотя вклад таких интрогрессивных форм в создание новых

сортот остается пока еще очень небольшим. С развитием новых методов и подходов к расширению генетического разнообразия селекционного генофонда меняется и концепция генных пулов картофеля. Так, уже после первых примеров успешного применения биотехнологических и молекулярно-генетических методов в интрогрессивной гибридизации было предложено относить ко вторичному генному пулу диплоидные мексиканские виды картофеля с EBN = 1, а в третичный генный пул включать неклубненосные виды из других секций рода *Solanum*, не относящиеся к секции *Petota* (Ortiz, 1998). Можно ожидать, что использование новых технологий, например цис-генетики, приведет к дальнейшему пересмотру концепции генных пулов картофеля.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 16-54-0020-Bel-a and the Belarusian Republican Foundation for Basic Research, project B16P-103.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abdalla M.M., Hermesen J.G.Th. An evaluation of *Solanum verrucosum* Schlecht. for its possible use in potato breeding. Euphytica. 1973; 22:19-27.
- Adiwilaga K.D., Brown C.R. Use of 2n pollen-producing triploid hybrids to introduce tetraploid Mexican wild species germplasm to cultivated tetraploid potato gene pool. Theor. Appl. Genet. 1991;81:645-652.
- Anisimova I.N., Gavrilenco T.A. The prospects for utilization of cytoplasmic male sterility in breeding and genetic studies and seed production of potato. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):83-95. DOI 10.18699/VJ17.226. (in Russian)
- Antonova O.Yu., Gavrilenco T.A. Yaderno-tsitoplazmaticheskie vzaimootnosheniya u somaticheskikh gibridov roda *Solanum* L. [Nuclear-cytoplasmic interactions in somatic hybrids of the genus *Solanum* L.]. Struktura i ekspressiya mitokhondrial'nogo genoma rasteniy [Structure and expression of the plant mitochondrial genome]. Irkutsk, 2006;5–10. (in Russian)
- Austin S., Pohlman J.D., Brown C.R., Mojtabadi H., Santo G.S., Douches D.S., Helgeson J.P. Interspecific somatic hybridization between *Solanum tuberosum* L. and *S. bulbocastanum* Dun. as a means of transferring nematode resistance. Am. Potato J. 1993;70:485-495.
- Berger F. Endosperm: the crossroad of seed development. Curr. Opin. Plant Biol. 2003;6:42-50.
- Bradeen J.M., Haynes K.G. Introduction to Potato. Ch. 1. Genetics, Genomics and Breeding of Potato. Eds. J. Bradeen, C. Kole. 1st ed. USA: Sci. Publ., 2011;1-19.
- Bradeen J.M., Naess S.K., Song J., Haberlach G.T., Wielgus S.M., Buell C.R., Jiang J., Helgeson J.P. Concomitant reiterative BAC walking and fine genetic mapping enable physical map development for the broad-spectrum late blight resistance region, RB. Mol. Genet. Genom. 2003;269:603-611. DOI 10.1007/s00438-003-0865-8.
- Brown C.R., Mojtabadi H., James S., Novy R.G., Love S. Development and evaluation of potato breeding lines with introgressed resistance to Columbia root-knot nematode (*Meloidogyne chitwoodi*). Am. J. Potato Res. 2006;83:1-8.
- Brown C.R., Mojtabadi H., Santo G.S. Introgression of resistance to Columbia and northern root-knot nematodes from *Solanum bulbocastanum* into cultivated potato. Euphytica. 1995;83:71-78.
- Brown C.R., Yang C.-P., Mojtabadi H., Santo G.S., Masuelli R. RFLP analysis of resistance to Columbia root-knot nematode derived from

- Solanum bulbocastanum* in a BC2 population. Theor. Appl. Genet. 1996;92:572-576.
- Bukasov S.M. Principles of potato systematics. Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 1978;62:3-35. (in Russian)
- Cai D., Rodríguez F., Teng Y., Ané C., Bonierbale M., Mueller L.A., Spooner D.M. Single copy nuclear gene analysis of polyploidy in wild potatoes (*Solanum* section *Petota*). BMC Evol. Biol. 2012;12:70.
- Camadro E.L., Espinillo J.C. Germplasm transfer from the wild tetraploid species *Solanum acaule* Bitt. to the cultivated potato, *S. tuberosum* L. using 2n eggs. Am. Potato J. 1991;67:737-749.
- Carpato D., Barone A., Cardi T., Sebastiano A., Frusciante L., Peloquin S.J. Endosperm Balance Number manipulation for direct *in vivo* germplasm introgression to potato from a sexually isolated relative (*Solanum commersonii* Dun.). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997;94:12013-12017.
- Carpato D., Basile B., Cardi T., Frusciante L. *Erwinia* resistance in backcross progenies of *Solanum tuberosum* × *S. tarijense* and *S. tuberosum* (+) *S. commersonii* hybrids. Potato Res. 2000;43:135-142. DOI 10.1007/BF02357954.
- Castillo R., Spooner D.M. Phylogenetic relationships of wild potatoes, *Solanum* series *Conicibaccata* (sect. *Petota*). Syst. Botany. 1997;22: 45-83.
- Chen Y.-K.H., Palta J.P., Bamberg J.B. Freezing tolerance and tuber production in selfed and backcross progenies derived from somatic hybrids between *Solanum tuberosum* L. and *S. commersonii* Dun. Theor. Appl. Genet. 1999;99:100-107.
- Cipar M.S., Peloquin S.J., Hougas R.W. Variability in the expression of self-incompatibility in tuber-bearing diploid *Solanum* species. Am. Potato J. 1964;41:155-162.
- Clarke A.E., Newbigin E. Molecular aspects of self-incompatibility in flowering plants. Annu. Rev. Genet. 1993;27:257-279.
- Clulow S.A., Wilkinson M.J., Waugh R., Baird E., Demaine M.J., Powell W. Cytological and molecular observations on *Solanum phureja*-induced dihaploid potatoes. Theor. Appl. Genet. 1991;82:545-551. DOI 10.1007/BF00226789.
- Corell D. The Potato and its Wild Relatives. Renner. Texas: Texas Res. Foundation, 1962.
- Davey M.R., Anthony P., Power J.B., Lowe K.C. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. Biotechnol. Advances. 2005; 23:131-171. DOI 10.1016/j.biotechadv.2004.09.008.
- de Haan S., Rodriguez F. Potato origin and production. Advances in Potato Chemistry and Technology. Eds. J. Singh, L. Kaur. London (UK): Elsevier Inc., 2016;1-32.
- Dinu I.I., Hayes R.J., Kynast R.G., Phillips R.L., Thill C.A. Novel inter-series hybrids in *Solanum*, section *Petota*. Theor. Appl. Genet. 2005;110:403-415. DOI: 10.1007/s00122-004-1782-x.
- Eckardt N.A. F-box proteins take center stage. Plant Cell. 2004;16: 558-561.
- Ehlenfeldt M.K., Hanneman R.E., Jr. Genetic control of Endosperm Balance Number (EBN): three additive loci in a threshold-like system. Theor. Appl. Genet. 1988;75:825-832.
- Eijlander R. Mechanisms of self-incompatibility and unilateral incompatibility in diploid potato (*Solanum tuberosum* L.) Wageningen, Netherlands: Wageningen Univ., 1998.
- Eijlander R., ter Laak W., Hermesen J.G.Th., Ramanna M.S., Jacobsen E. Occurrence of self-compatibility, self-incompatibility and unilateral incompatibility after crossing diploid *S. tuberosum* (SI) with *S. verrucosum* (SC): I. Expression and inheritance of self-compatibility. Euphytica. 2000;115(2):127-139.
- Fujii S., Kubo K., Takayama S. Non-self and self recognition models in plant self-incompatibility. Nature Plants. 2016;2(9):16130. DOI 10.1038/NPLANTS.2016.130.
- Gavrilenko T.A. Sozdanie novykh form kul'turnykh rasteniy na osnove somaticheskoy gibridizatsii [Raise of novel crop forms by somatic fusion] Rigin B.V. (Ed.). Identifitsirovanny genofond rasteniy i selektsiya [Identified plant gene pool and breeding]. St. Petersburg, VIR Publ., 2005;628-643. (in Russian)
- Gavrilenko T. Application of molecular cytogenetics in fundamental and applied research of potato (Review). Ch. 9. Genetics, Genomics and Breeding of Potato. Eds. J. Bradeen, C. Kole. 1st ed. USA: Sci. Publ., 2011;184-206.
- Gavrilenko T., Antonova O., Thieme R., Szczerbakowa A., Wielgat B. Inheritance of chloroplast and mitochondrial DNAs in interspecific somatic hybrids of potato. EAPR-Papers. Bilbao, Spain. 2005;II: 652-654.
- Gavrilenko T., Pendinen G., Rokka V.-M., Antonova O., Thieme R. Homeologous chromosome pairing in distant allohaploid hybrids of the genus *Solanum*. Rus. J. Genetics: Appl. Res. 2015;5(3):182-190.
- Gavrilenko T., Thieme R., Heimback U., Thieme T. Fertile somatic hybrids of *Solanum etuberosum* (+) dihaploid *Solanum tuberosum* and their backcrossing progenies: relationships of genome dosage with tuber development and resistance to potato virus Y. Euphytica. 2003;131:323-332. DOI 10.1023/A:1024041104170.
- Gebhardt C. Bridging the gap between genome analysis and precision breeding in potato. Trends in Genetics. 2013;29(4):248-256. DOI 10.1016/j.tig.2012.11.006.
- Gillen A.M., Novy R.G. Molecular characterization of the progeny of *Solanum etuberosum* identifies a genomic region associated with resistance to potato leafroll virus. Euphytica. 2007;155:403-415. DOI 10.1007/s10681-006-9342-x.
- Glimelius K., Fahleson G., Landgren M., Sjodin C., Sundberg E. Gene transfer via somatic hybridization in plants. Trends Biotechnol. 1991;9:24-30.
- Grun P., Aubertin M. The inheritance and expression of unilateral incompatibility in *Solanum*. Heredity. 1966;212:131-138. DOI 10.1038/hdy.1966.7.
- Hanneman R.E., Jr. The reproductive biology of the potato and its implication for breeding. Potato Res. 1999;42:283-312.
- Harlan J.R., de Wet J.M.J. Toward a rational classification of cultivated plants. Taxon. 1971;20(4):509-517. DOI 10.2307/1218252.
- Haverkort A.J., Struik P.C., Visser R.G.F., Jacobsen E. Applied biotechnology to combat late blight in potato caused by *Phytophthora infestans*. Potato Res. 2009;52:249-264.
- Hawkes J.G. A revision of the tuber-bearing Solanums. Scottish Plant Breed. Stat. Ann. Rep. 1956;37:109.
- Hawkes J.G. The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources. London: Belhaven Press, 1990.
- Hawkes J.G. Origins of cultivated potatoes and species relationships. Potato Genetics. Eds. J.E. Bradshaw, G.R. Mackay. Wallingford: CAB International, 1994;3-42.
- Helgeson J.P., Hunt G.J., Haberland G.T., Ehlenfeldt M.K., Hunt G., Pohlman J.D., Austin S. Sexual progeny of somatic hybrids between potato and *Solanum brevidentis*: potential for use in breeding programs. Am. Potato J. 1993;70(6):437-452.
- Helgeson J.P., Pohlman J.D., Austin S., Haberland G.T., Wielgus S.M., Ronis D., Zambolm L., Tooley P., McGrath J.M., James R.V., Stevenson W.R. Somatic hybrids between *Solanum bulbocastanum* and potato: a new source of resistance to late blight. Theor. Appl. Genet. 1998;96:738-742. DOI 10.1007/s001220050796.
- Hermesen J.G.Th. Mechanisms and genetic implications of 2n-gamete formation. Iowa State J. Research. 1984;58:421-434.
- Hermesen J.G.Th. Introgression of genes from wild species, including molecular and cellular approaches. Potato Genetics. Eds. J.E. Bradshaw, G.R. Mackay. Wallingford, UK: CABI, 1994;515-539.
- Hermesen J.G.Th., Olsder J., Jansen P., Hoving E. Acceptance of self-compatible pollen from *Solanum verrucosum* in dihaploids from *S. tuberosum*. Fertilization in Higher Plants. Ed. H.F. Linskens. Amsterdam; New York: North Holland Am. Elsevier, 1974;37-40.
- Hermesen J.G.Th., Ramanna M.S. Barriers to hybridization of *Solanum bulbocastanum* Dun. and *Solanum verrucosum* Schlecht. and structural hybridity in their F1 plants. Euphytica. 1976;25(1):1-10. DOI 10.1007/BF00041523.
- Hermesen J.G.Th., Verdenius J. Selection from *Solanum tuberosum* group *Phureja* of genotypes combining high frequency haploid induction with homozygosity for embryo-spot. Euphytica. 1973;22:244-259.

- Hijmans R.J., Gavrilenko T., Stephenson S., Bamberg J., Salas A., Spooner D. The geographic and environmental distribution of polyploidy in wild potatoes (*Solanum* section *Petota*). *Global Ecol. Biogeogr.* 2007;16(4):485-495. DOI 10.1111/j.1466-8238.2007.00308.x.
- Hijmans R.J., Spooner D.M. Geographic distribution of wild potato species. *Am. J. Botany.* 2001;88:2101-2112.
- Hijmans R.J., Spooner D.M., Salas A.R., Guarino L., de la Cruz J. Atlas of Wild Potatoes. Syst. Ecogeogr. Studies on Crop Genepools. 2002. www.vcru.wisc.edu/spoonerlab/pdf/Potato%20Atlas%20Final.pdf.
- Horsman K., Gavrilenko T., Bergervoet M., Huigen D.J., Joe A.T.W., Jacobsen E. Alteration of the genomic composition of *Solanum nigrum* (+) potato backcross derivatives by somatic hybridization: selection of fusion hybrids by DNA measurements and GISH. *Plant Breeding.* 2001;120:201-207. DOI 10.1046/j.1439-0523.2001.00591.x.
- Hosaka K., Hanneman R.E. Genetics of self-compatibility in a self-incompatible wild diploid potato species *Solanum chacoense*. 1. Detection of an S locus inhibitor (*Sli*) gene. *Euphytica.* 1998a;99:191-197.
- Hosaka K., Hanneman R.E. Genetics of self-compatibility in a self-incompatible wild diploid potato species *Solanum chacoense*. 2. Localization of an S locus inhibitor (*Sli*) gene on the potato genome using DNA markers. *Euphytica.* 1998b;103:65-271.
- Irikura Y. Cytogenetic studies on the haploid plants of tuber-bearing *Solanum* species. II. Cytogenetic investigations on haploid plants and interspecific hybrids by utilizing haploidy. *Res. Bull. Hokkaido Nat. Agric. Exp. Stat.* 1976;115:1-80.
- Jansky S.H. Overcoming hybridization barriers in potato. *Plant Breeding.* 2006;125:1-12.
- Jansky S.H., Dempewolf H., Camadro E.L., Simon R., Zimnoch-Guzowska E., Bisognin D.A., Bonierbale M.A. Case for crop wild relative preservation and use in potato. *Crop Science.* 2013;53:746-754. DOI 10.2135/cropsci2012.11.0627.
- Jansky S.H., Hamernik A.J. The introgression of 2x 1 EBN *Solanum* species into the cultivated potato using *Solanum verrucosum* as a bridge. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 2009;56:1107-1115.
- Jansky S.H., Peloquin S.J., Yerk G.L. Use of potato haploids to put 2x wild species germplasm in usable form. *Plant Breeding.* 1990;104(4):290-294. DOI 10.1111/j.1439-0523.1990.tb00438.x.
- Johnston S.A., den Nijs T.M., Peloquin S.J., Hanneman R.E., Jr. The significance of genetic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theor. Appl. Genet.* 1980;57:5-9.
- Johnston S.A., Hanneman R.E., Jr. Support of the endosperm balance number hypothesis utilizing some tuber-bearing *Solanum* species. *Am. Potato J.* 1980;57:7-14.
- Kelley K., Whitworth J.L., Novy R.G. Mapping of the potato leafroll virus resistance gene, *Rlretb*, from *Solanum etuberosum* identifies interchromosomal translocations among its E-genome chromosomes 4 and 9 relative to the A-genome of *Solanum* L. sect. *Petota*. *Mol. Breeding.* 2009;23:489-500.
- Kim S.R., Ahn Y.K., Kim T.G., Kang H.S., Song S.W., Kim B.C., Kang S.G. Breeding of a new cultivar 'Jeseo' with resistance to common scab. *Kor. J. Breed. Sci.* 2013;45:468-473. DOI https://doi.org/10.9787/KJBS.2013.45.4.468.
- Kinoshita T. Reproductive barrier and genomic imprinting in the endosperm of flowering plants. *Genes Genet. Syst.* 2007;82:177-186.
- Kradolfer D., Wolff P., Jiang H., Siretskiy A., Kohler C. An imprinted gene underlies postzygotic reproductive isolation in *Arabidopsis thaliana*. *Dev. Cell.* 2013;26:525-535.
- Kubo K., Entani T., Takara A., Wang N., Fields A.M., Hua Z., Toyoda M., Kawashima S., Ando T., Isogai A., Kao T., Takayama S. Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility. *Science.* 2010;330:796-799.
- Kuhl J.C., Novy R.G., Whitworth J.L., Dibble M.S., Schneider B., Hall D. Development of molecular markers closely linked to the Potato leafroll virus resistance gene, *Rlretb*, for use in marker-assisted selection. *Am. J. Potato Res.* 2016;93(3):203-212.
- Kuhl J.C., Zarka K., Coombs J., Kirk W., Douches D.S. Late blight resistance of RB transgenic potato lines. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 2007;132(6):783-789.
- Laferriere L., Helgeson J., Allen C. Fertile *Solanum tuberosum* + *S. comersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Theor. Appl. Genet.* 1999;98:1272-1278. DOI 10.1007/s001220051193.
- Lamm R. Investigation of some tuber-bearing *Solanum* hybrids. *Hereditas.* 1953;39:97-112.
- Levy A.V., Voronkova E.V., Polyukhovich Yu.V., Yermishin A.P. Polymorphism of microsatellite DNA fragments in interspecific hybrids contrasting for late blight resistance that were derived from *Solanum stoloniferum*. *Vesti NAN Belarusi. Ser. biyal. navuk = Proc. Nat. Acad. Sci. Belarus. Ser. Biol. Sci.* 2015;1:43-49. (in Russian)
- Levy A.V., Polyukhovich Yu.V., Voronkova E.V., Gukasyan O.N., Yermishin A.P. Use of *Solanum verrucosum* and *S_v*-lines for overcoming unilateral incompatibility in involvement to breeding of wild allotetraploid potato species *S. stoloniferum*. *Tez. dokl. mezhd. nauch. konf. Sankt-Peterburg.* 3-5 avgusta 2016 g. [Abstracts from the Int. Conf. "Problems of systematics and breeding of potato". Aug. 3-5, 2016]. St.-Petersburg, 2016;69-70. (in Russian)
- Lewis D., Crowe L.K. Unilateral incompatibility in flowering plants. *Heredity.* 1958;12:233-256.
- Li W., Chetelat R.T. Unilateral incompatibility gene *ui1.1* encodes an S-locus F-box protein expressed in pollen of *Solanum* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015;112(14):4417-4422. DOI 10.1073/pnas.1423301112.
- Lin B.-Y. Ploidy barrier to endosperm development in maize. *Genetics.* 1984;107:103-115.
- Makhan'ko O.V. Interspecific incompatibility in potato diploid breeding. *Zemlyarobstva i akhova raslin = Agriculture and Plant Protection.* 2008;1:11-14. (in Russian)
- Marks G.E. Cytogenetic studies in tuberous *Solanum* species. I. Genomic differentiation in the group Demissa. *J. Genetics.* 1955;53:262-269.
- Marks G.E. Cytogenetic studies in tuberous *Solanum* species: III. Species relationships in some South and Central American species. *New Phytologist.* 1965;64:293-306.
- Marks G.E. The origin and significance of intraspecific polyploidy: experimental evidence from *Solanum chacoense*. *Evolution.* 1966;20:552-557.
- Martin F.W. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technol.* 1958;34:125-128.
- Matsubayashi M. Phylogenetic relationships in the potato and its related species. *Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution.* Pt. B. Eds. T. Tsuchiya, P.K. Gupta. Amsterdam: Elsevier, 1991;93-118.
- McGrath J., Williams C., Haberlach G., Wielgus S., Uchtyl T., Helgeson J.P. Introgression and stabilization of *Erwinia* tuber soft rot resistance into potato after somatic hybridization of *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*. *Am. J. Potato Res.* 2002;79:19-24.
- Mok D.W.S., Peloquin S.J. Three mechanisms of 2n pollen formation in diploid potatoes. *Can. J. Genet. Cytol.* 1975;17:217-225.
- Naess S., Bradeen J., Wielgus S., Haberlach G., McGrath J., Helgeson J.P. Resistance to late blight in *Solanum bulbocastanum* is mapped to chromosome 8. *Theor. Appl. Gen.* 2000;101:697-704.
- Naess S., Bradeen J., Wielgus S., Haberlach G., McGrath J., Helgeson J.P. Analysis of the introgression of *Solanum bulbocastanum* DNA into potato breeding lines. *Mol. Gen. Genomics.* 2001;265(4):694-704.
- Nishiyama I., Inomata N. Embryological studies in cross incompatibility between 2x and 4x in *Brassica*. *Japan. J. Genetics.* 1966;41(1):27-42.
- Novy R.G., Gillen A.M., Whitworth J.L. Characterization of the expression and inheritance of potato leafroll virus (PLRV) and potato virus Y (PVY) resistance in three generations of germplasm derived from *Solanum etuberosum*. *Theor. Appl. Genet.* 2007;114:1161-1172. DOI 10.1007/s00122-007-0508-2.
- Novy R.G., Nasruddin A., Ragsdale D.W., Radcliffe E.B. Genetic resistances to potato leafroll virus, potato virus Y, and green peach aphid in progeny of *Solanum etuberosum*. *Am. J. Potato Res.* 2002;79:9-18. DOI 10.1007/BF02883518.

- Ortiz R. Potato breeding via ploidy manipulations. *Plant Breed. Rev.* 1998;16:15-86.
- Ortiz R., Ehlenfeldt M. The importance of Endosperm Balance Number in potato breeding and the evolution of tuber-bearing *Solanum* species. *Euphytica*. 1992;60:105-113.
- Pandey K.K. Interspecific incompatibility in *Solanum* species. *Am. J. Bot.* 1962;49:874-882.
- Peloquin S.J., Boiteux L.S., Carputo D. Meiotic mutants in potato. Valuable variants. *Genetics*. 1999;153(4):1493-1499.
- Peloquin S.J., Yerk G.L., Werner J.E., Darmono E. Potato breeding with haploids and 2n gametes. *Genome*. 1989;31:1000-1004.
- Pendinen G., Gavrilenko T., Jiang J., Spooner D.M. Allopolyploid speciation of the tetraploid Mexican potato species revealed by genomic *in situ* hybridization. *Genome*. 2008;51:714-720. DOI 10.1139/G08-052.
- Pendinen G., Spooner D.M., Jiang J., Gavrilenko T. Genomic *in situ* hybridization (GISH) reveals both auto- and allopolyploid origins of different North and Central American hexaploid potato (*Solanum* section *Petota*) species. *Genome*. 2012;55(6):407-415. DOI 10.1139/G2012-027.
- Perl A., Aviv D., Galun E. Protoplast-fusion-derived *Solanum* hybrids: application and phylogenetic limitations. *Theor. Appl. Genet.* 1990;79(5):632-640.
- Pidgaetskiy A.A. Vikarystannya dikogo vidu kartopli *S. demissum* Lindl. pri zaluchenni do selektsionnoy roboti *S. bulbocastanum* Dun. [Use of wild potato species *S. demissum* Lindl. in the involvement of *S. bulbocastanum* Dun. to breeding]. Kartoplyarstvo, mezhdomstvennyy tematicheskyy sbornik [Potato Growing, an interdepartmental subject collection]. Kyiv, 1981;12:9-12. (in Ukrainian)
- Pignatta D., Gehring M. Imprinting meets genomics: new insights and new challenges. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 2012;15(5):530-535. DOI 10.1016/j.pbi.2012.09.004.
- Polyukhovych Yu.V., Makhan'ko O.V., Savchuk A.V., Voronkova E.V., Yermishin A.P. Development of bridge lines for overcoming interspecific incompatibility in potatoes. *Vesti NAN Belarusi. Ser. biyol. nauk = Proc. Nat. Acad. Sci. Belarus. Ser. Biol. Sci.* 2010;2:51-58. (in Russian)
- Polyukhovych Yu.V., Voronkova E.V., Savchuk A.V., Yermishin A.P. Use of *Solanum verrucosum* for overcoming unilateral incompatibility in crosses with wild allotetraploid potato species. *Kartofelevodstvo = Potato Growing (Minsk)*, 2013;21(1):136-145. (in Russian)
- Ramakrishnan A.P., Ritland C.E., 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.
- Ramanna M.S. A re-examination of the mechanisms of 2n-gamete formation in potato and its implications for breeding. *Euphytica*. 1979;28:537-561.
- Ramanna M.S. First division restitution gametes through fertile desynaptic mutants of potato. *Euphytica*. 1983;32:337-350.
- Rivard S.R., Cappadocia M., Landry B.S. A comparison of RFLP maps based on another culture derived, selfed, and hybrid progenies of *Solanum chacoense*. *Genome*. 1996;39:611-621.
- Rodríguez F., Ghislain M., Clausen A.M., Jansky S.H., Spooner D.M. Hybrid origins of cultivated potatoes. *Theor. Appl. Genet.* 2010;121:1187-1198. DOI 10.1007/s00122-010-1422-6.
- Rodríguez F., Spooner D. Nitrate reductase phylogeny of potato (*Solanum* sect. *Petota*) genomes with emphasis on the origins of the polyploid species. *Syst. Botany*. 2009;34:207-219.
- Ross H. Potato breeding. Problems and perspectives. *Adv. Plant Breed.* 1986;13.
- Sanetomo R., Akino S., Suzuki N., Hosaka K. Breakdown of a hybridization barrier between *Solanum pinnatisectum* Dunal and potato using the *S* locus inhibitor gene (*Sli*). *Euphytica*. 2014;197:119-132. DOI 10.1007/s10681-013-1057-1.
- Schatlowski N., Wolff P., Santos-González J., Schoft V., Siretskiy A., Scott R., Tamaru H., Kohlera C. Hypomethylated pollen bypasses the interploidy hybridization barrier in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2014;26(9):3556-3568. DOI 10.1105/tpc.114.130120.
- Scotti N., Monti L., Cardi T. Organelle DNA variation in parental *Solanum* spp. genotypes and nuclear-cytoplasmic interactions in *Solanum tuberosum* (+) *S. commersonii* somatic hybrid-backcross progeny. *Theor. Appl. Genet.* 2003;108(1):87-94.
- Simko I., Jansky S., Stephenson S., Spooner D. Genetics of resistance to pests and disease. Ch. 7. *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives*. Ed. D. Vreugdenhil. Elsevier, 2007.
- Song J., Bradeen J.M., Naess S.K., Raasch J.A., Wielgus S.M., Haberalach G.T., Liu J., Kuang H., Austin-Phillips S., Buell C.R., Helgeson J.P., Jiang J. Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003;100:9128-9133. DOI 10.1073/pnas.1533501100.
- Spooner D.M., Alvarez N., Peralta I.E., Clausen A.M. Taxonomy of wild potatoes and their relatives in southern South America (*Solanum* sects. *Petota* and *Etuberosum*). *Syst. Bot. Monogr.* 2016;100:1-240.
- Spooner D.M., Castillo R.T. Reexamination of series relationships of South American wild potatoes (*Solanaceae*: *Solanum* sect. *Petota*): evidence from chloroplast DNA restriction site variation. *Am. J. Botany*. 1997;84(5):671-685.
- Spooner D.M., Ghislain M., Simon R., Jansky S.H., Gavrilenko T. Systematics, diversity, genetics, and evolution of wild and cultivated potatoes. *Bot. Review*. 2014;80(4):283-383. DOI 10.1007/s12229-014-9146-y.
- Spooner D.M., Rodríguez F., Polgár Z., Ballard H.E., Jr., Jansky S.H. Genomic origins of potato polyploids: GBSSI gene sequencing data. *Plant Genome: Suppl. to Crop Sci.* 2008;48(S1):S27-S36.
- Spooner D.M., Sytsma K.J. Reexamination of series relationships of Mexican and Central American wild potatoes (*Solanum* sect. *Petota*): evidence from chloroplast DNA restriction site variation. *Syst. Botany*. 1992;17:432-448.
- Spooner D.M., Sytsma K.J., Conti E. Chloroplast DNA evidence for genome differentiation in wild potatoes (*Solanum* sect. *Petota*: *Solanaceae*). *Am. J. Botany*. 1991;78:1354-1366.
- Spooner D.M., van den Berg R.G., Rodríguez A., Bamberg J., Hijmans R.J., Lara-Cabrera S.I. Wild potatoes (*Solanum* section *Petota*) of North and Central America. *Syst. Bot. Monogr.* 2004;68:1-209.
- Summers D., Grun P. Reproductive isolation barriers to gene exchange between *Solanum chacoense* and *S. commersonii* (*Solanaceae*). *Am. J. Bot.* 1981;68:1240-1248.
- Surikov I.M. Genetics of intraspecific incompatibility of male gametophyte and pistil in flowering plants. *Uspekhi sovremennoy genetiki = Progress in Modern Genetics*. 1972;4:119-169. (in Russian)
- Surikov I.M. Nesovmestimost' i embrional'naya steril'nost' rasteniy [Incompatibility and embryonal sterility of plants]. Moscow, Agropromisdat Publ., 1991 (in Russian)
- Tek A.L., Stevenson W.R., Helgeson J.P., Jiang J. Transfer of tuber soft rot and early blight resistances from *Solanum brevidens* into cultivated potato. *Theor. Appl. Genet.* 2004;109:249-254.
- Thieme R., Rakosy-Tican E., Gavrilenko T., Antonova O., Schubert J., Nachtigall M., Heimbach U., Thieme T. Novel somatic hybrids (*Solanum tuberosum* L. + *Solanum tarnii*) and their fertile BC₁ progenies express extreme resistance to potato virus Y and late blight. *Theor. Appl. Genet.* 2008;116:691-700. DOI 10.1007/s00122-007-0702-2.
- Thieme R., Rakosy-Tican E., Nachtigall M., Schubert J., Hammann T., Antonova O., Gavrilenko T., Heimbach U., Thieme T. Characterization of the multiple resistance traits of somatic hybrids between *Solanum cardiophyllum* Lindl. and two commercial potato cultivars. *Plant Cell Rep.* 2010;29:1187-1201. DOI 10.1007/s00299-010-0905-x.
- Thieme R., Schubert J., Nachtigall M., Hammann T., Truberg B., Heimbach U., Thieme T. Wild potato species of the series *Pinnatisecta* – progress in their utilisation in potato breeding. *Crop Plant Resistance to Biotic and Abiotic Factors: Current Potential and Future Demands*. Proc. of the 3rd Intern. Symp. on Plant Protection and Plant Health in Europe, 14–16 May 2009, Berlin, Germany. Braunschweig, 2009;428-436.

- Thompson R.D., Uhrig H., Hermesen J.G.Th., Salamini F., Kaufmann H. Investigation of a self-compatible mutation in *Solanum tuberosum* clones inhibiting S-allele activity in pollen differentially. *Mol. Gen. Genet.* 1991;226:283-288.
- Tonosaki K., Osabe K., Kawanabe T., Fujimoto R. The importance of reproductive barriers and the effect of allopolyploidization on crop breeding. *Breed. Sci.* 2016;66(3):333-349. DOI 10.1270/jsbbs.15114.
- Trognitz B.R., Schmidiche P.E. A new look at incompatibility relationships in higher plants. *Sex Plant Reprod.* 1993;6:183-190.
- Veilleux R.E., De Jong H. Potato. Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement. Vol. 3. Ed. R.J. Singh. Boca Raton: CRC Press, 2007;17-58.
- Voronkova E.V., Lisovskaya V.M., Pavlyuchuk N.V., Savchuk A.V., Yermishin A.P. Resistance to virus diseases in the progeny of diploid interspecific hybrids derived from allotetraploid species *Solanum acaule* and *S. stoloniferum*. *Kartofelevodstvo = Potato Growing (Minsk)*. 2008;14:144-152. (in Russian)
- Voronkova E.V., Lisovskaya V.M., Yermishin A.P. Diploid hybrids between allotetraploid wild potato species *Solanum acaule* Bitt., *Solanum stoloniferum* Schltdl. and dihaploids of *Solanum tuberosum* L. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 2007;43(8):882-889. (in Russian)
- Voronkova E.V., Pavlyuchuk N.V., Polykhovich Yu.V., Gukasyan O.N., Zharich V.M., Luksha V.I., Yermishin A.P. Resistance to PVY transferred to diploid interspecific hybrids from *Solanum stoloniferum*. *Kartofelevodstvo = Potato Growing (Minsk)*. 2015;23:27-39. (in Russian)
- Waara S., Glimelius K. The potential of somatic hybridization in crop breeding. *Euphytica*. 1995;85:217-233.
- Watanabe K., Arbizu C., Schmiediche P. Potato germplasm enhancement with disomic tetraploid *Solanum acaule*. I. Efficiency of introgression. *Genome*. 1992;35:53-57.
- Werner J.E., Peloquin S.J. Inheritance and two mechanisms of 2n egg formation in 2x potatoes. *J. Heredity*. 1990;81:371-374.
- Xiao W., Brown R.C., Lemmon B.E., Harada J.J., Goldberg R.B., Fischer R.L. Regulation of seed size by hypomethylation of maternal and paternal genomes. *Plant Physiol.* 2006;142:1160-1168.
- Xu B.B., Mu J.H., Nevins D.L., Grun P., Kao T.H. Cloning and sequencing of cDNAs encoding two self-incompatibility associated proteins in *Solanum chacoense*. *Mol. Gen. Genet.* 1990;224:341-346.
- Yermishin A.P., Polyukhovich Yu.V., Voronkova E.V., Gukasyan O.N. S_pS_p lines, an effective tool for involvement of valuable germplasm from 1EBN diploid potato species. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(1):42-50. DOI 10.18699/VJ17.222. (in Russian)
- Yermishin A.P., Polyukhovich Y.V., Voronkova E.V., Savchuk A.V. Production of hybrids between 2 EBN bridge species *Solanum verucosum* and 1 EBN diploid potato species. *Am. J. Potato Res.* 2014; 91(6):610-617. DOI 10/1007/s12230-014-9385-9/.
- Yermishin A.P., Voronkova E.V., Kozlov V.A. *Kartofel [Potato]. Kilchevskiy A.V., Khotyleva L.V. (Eds.) Geneticheskie osnovy selekcii rasteniy. Tom 2. Chastnaya genetika rasteniy [Genetic basis of plant breeding. V. 2. Specific genetics]. Minsk, 2010;156-234. (in Russian)*

Межвидовые гибриды картофеля как доноры долговременной устойчивости к патогенам

Е.В. Рогозина¹, Э.Е. Хавкин²✉

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова» (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, Россия

Межвидовая гибридизация – основной метод селекции картофеля на устойчивость к патогенам. В результате интрогрессии генетического материала видов рода *Solanum* L. и отбора наилучших комбинаций удается совместить в одном генотипе высокую продуктивность с устойчивостью к болезням и вредителям. Наибольшие успехи интрогрессивной селекции картофеля связаны с созданием сортов, устойчивых к *Phytophthora infestans*, Y вирусу картофеля и *Globodera rostochiensis*. В родословных современных сортов (селекционных линий), устойчивых к патогенам, присутствует генетический материал *Solanum andigenum*, *S. demissum*, *S. stoloniferum*, *S. acaule*, *S. vernei* и других дикорастущих и культурных видов картофеля. Селекционная ценность клубненосных видов *Solanum* зависит от их совместимости с культурным картофелем и характера наследования целевого признака. Для преодоления несовместимости при скрещивании применяют гибридизацию с изменением уровня ploидности скрещиваемых форм, метод посредника или различные клеточные технологии. Для селекции на основе межвидовых гибридов картофеля особое значение имеют выявление перспективного исходного материала, контроль за переносом целевых признаков в процессах скрещивания, отбор гибридных клонов, рекомендуемых для практической селекции, и определение их донорских способностей. Все эти процессы можно значительно ускорить и усовершенствовать при использовании методов маркер-опосредованной селекции. Селекционные клоны и сорта, созданные методом межвидовой гибридизации, отличаются высокой степенью разнообразия генотипов и отдельных генов и служат уникальными донорами для создания новых сортов с высокой и долговременной устойчивостью к болезням и вредителям.

Ключевые слова: картофель; межвидовые гибриды; R-гены; селекционные доноры; фитофтороз; вирусы; нематода.

Interspecific potato hybrids as donors of durable resistance to pathogens

E.V. Rogozina¹, E.E. Khavkin²✉

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

² All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

Interspecific hybridization is the primary method of potato breeding for resistance to pathogens. By introgressing genetic material from various species of the genus *Solanum* L. and selecting the best combinations, it is possible to merge, in a single genotype, both high productivity and resistance to diseases and pests. Among the most impressive outcomes of potato breeding, we find varieties resistant to late blight, potato virus Y and nematodes. In the pedigrees of many recent varieties (breeding lines) that are resistant to pathogens of different nature (fungi, oomycetes, bacteria or viruses), we find genetic material of *Solanum andigenum*, *S. demissum*, *S. stoloniferum*, *S. acaule*, *S. vernei* and other wild and cultivated potato species. The breeding value of tuber-bearing *Solanum* species depends on their compatibility with the cultivated potato and the mechanism of target trait inheritance. To overcome incompatibility in crosses, breeders employ ploidy manipulation in the parental forms, bridge crosses, the mediator method and various *in vitro* technologies. Potato genotypic variation is significantly expanded by interspecific hybridization of wild and cultivated potato relatives. The main components of breeding technology based on interspecific potato hybrids are the identification of promising initial genotypes, the control over the introgression of the target traits through the crosses, the selection of hybrid clones prospective for practical breeding and the assessment of their donor properties. All of these processes are greatly accelerated and promoted by the methods of marker-assisted selection. Advanced lines and clones developed by interspecific hybridization manifest a high diversity of genotypes and particular genes and are unique donors for breeding new varieties maintaining high and durable resistance to diseases and pests.

Key words: potato; interspecific hybrids; R-genes; breeding donors; late blight; viruses; nematodes.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Рогозина Е.В., Хавкин Э.Е. Межвидовые гибриды картофеля как доноры долговременной устойчивости к патогенам. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(1):30-41. DOI 10.18699/VJ17.221

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Rogozina E.V., Khavkin E.E. Interspecific potato hybrids as donors of durable resistance to pathogens. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):30-41. DOI 10.18699/VJ17.221

Картофель – вегетативно размножаемая культура, и потому вредные организмы опасны не только для посадок текущего года: сохраняясь в последующих репродукциях, они приводят к увеличению потерь и снижению качества продукции. Более 70 % потенциального урожая может быть утеряно из-за вредителей и болезней, если не использовать средства защиты. Фитофтороз, вирусы и нематоды наносят картофелеводству самый большой ущерб, который даже при проведении защитных мероприятий достигает 39 % (Oerke, Dehne, 2004). В современной системе интегрированной защиты картофеля основным элементом является возделывание сортов, устойчивых к вредителям и болезням. Создание сортов картофеля, устойчивых к патогенам, основано на интрогрессии генетического материала дикорастущих сородичей путем половой или соматической гибридизации либо на переносе изолированных генов устойчивости методом трансгеноза. В практической селекции в качестве доноров признаков устойчивости чаще всего используют межвидовые гибриды картофеля, полученные методом половой гибридизации. В настоящем обзоре обсуждаются основные итоги этой работы, а также проблемы и перспективы использования межвидовых гибридов для создания новых сортов картофеля.

История применения межвидовой гибридизации для создания сортов картофеля, устойчивых к патогенам

История межвидовой гибридизации в селекции картофеля подразделяется на два периода: конец XIX – начало XX в. – время бессистемных опытов по скрещиванию картофеля с его дикорастущими сородичами; начиная с 1925 г. – этап научно обоснованной гибридизации с использованием разнообразного исходного материала.

Впервые о гибридизации сортов картофеля путем искусственного опыления сообщил Т. Найт (Т.А. Knight) в 1807 г. в Англии (Bradshaw et al., 2006). Катастрофические по своим последствиям эпифитотии фитофтороза (возбудитель оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) в 1845–1849 гг. и поражение картофеля раком (возбудитель – *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Pers.) в 1888 г. определили основные направления селекции на устойчивость к вредным организмам. Однако длительное время в скрещивания вовлекали близкородственные формы, и основным методом селекции была внутривидовая гибридизация (Glendinning, 1983). В качестве исходного материала использовали случайные единичные образцы культурного картофеля: Garnet Chili, Rough Purple Chili или неизвестную форму-прародитель сорта Alte Daber (Hawkes, 1979). В 1906–1910 гг. устойчивые к фитофторозу растения *Solanum edinense* (естественный гибрид *S. demissum* × *S. tuberosum*) начали использовать для скрещивания с местными сортами в Шотландии и Германии (Ross, 1966).

1925 г. ознаменовал начало новой эры в селекции картофеля (Букасов, 1933; Hawkes, 1979). Экспедиции ВИР 1925–1927 гг. и открытие центров генетического разнообразия привели к революционным изменениям: межвидовая гибридизация стала главным методом создания сортов картофеля, устойчивых к болезням и вредителям

(Ross, 1966; Росс, 1989). Плановая интродукция, изучение и использование в селекции разнообразия дикорастущих и культурных видов секции *Petota* рода *Solanum*, как и других родичей возделываемых растений, – это реализация на практике учения об исходном материале, ведущего раздела селекции как научной дисциплины (Вавилов, 1935). В XX в. селекция на основе межвидовой гибридизации успешно развивалась в СССР (Букасов, Камераз, 1972), США (Love, 2000) и странах Западной Европы: Германии (Ross, 1966; Росс, 1989; Darsow, 2014), Великобритании (Bradshaw, 2009), Польше (Zimnoch-Guzowska et al., 2013), Нидерландах. За неполное столетие методами научной селекции был создан обширный сортимент картофеля, многие представители которого устойчивы к возбудителям инфекционных заболеваний. В Европейской базе данных (<https://www.europotato.org>) собрана информация, характеризующая более 4000 сортов и 1500 селекционных линий, в том числе генотипов с высокой устойчивостью к возбудителям инфекционных заболеваний различной природы (см. таблицу). При создании этих форм картофеля использованы виды *S. andigenum*, *S. phureja*, *S. rybinii*, *S. stenotomum*, *S. demissum*, *S. stoloniferum*, *S. acaule*, *S. vernei*, *S. chacoense*, *S. simplicifolium*, *S. spagazzinii*, *S. sparsipilum*, *S. oplocense*, *S. bulbocastanum*, *S. vallis-mexici* и *S. chilotanum* (названия видов приведены в соответствии с классификацией С.М. Букасова (1978)). В родословных нескольких сортов, созданных в США, Польше и Великобритании, присутствуют и другие дикие виды: *S. kurtzianum*, *S. maglia*, *S. raphanifolium* и *S. toralapanum* (Love, 2000), *S. megistacrolobum* (Chrzanowska et al., 2002), *S. multidissectum* (Bradshaw, 2009).

Наибольшие успехи интрогрессивной селекции картофеля связаны с созданием сортов, устойчивых к *P. infestans*, Y вирусу картофеля и *Globodera rostochiensis* (Jansky et al., 2013; Vos et al., 2015). Сорт картофеля – это уникальный генотип, в котором объединены около 50 признаков продуктивности, качества урожая и устойчивости к неблагоприятным факторам среды. Основными факторами, определяющими успех интрогрессивной селекции картофеля, являются скрещиваемость дикорастущих *Solanum* с культурным картофелем, жизнеспособность потомства, полученного в этих скрещиваниях, и характер наследования родительских признаков у гибридных форм.

Скрещиваемость диких и культурных видов картофеля

Для выделения дикорастущих сородичей возделываемых растений, приоритетных для сохранения и использования в селекции, применяют концепцию генных пулов (Harlan, de Wet, 1971), основанную на результатах межвидовых скрещиваний. В отсутствие таких данных обращаются к концепции таксономических групп, согласно которой таксономическая классификация отражает генетическую близость видов и, следовательно, возможность их гибридизации (Vincent et al., 2013). Перспективы использования клубненосных видов *Solanum* для интрогрессивной селекции картофеля также описывают в соответствии с концепцией генных пулов и с учетом филогенетических отношений видов секции *Petota* рода *Solanum* (Bradeen et al., 2011); кроме того, широко используется показатель

Pathogen-resistant potato varieties and breeding

lines bearing tuber-producing *Solanum* spp. germplasm (according to www.europotato.org)

Disease, pest (pathogen)	<i>Solanum</i> ssp. in the pedigree*
Early blight (<i>Alternaria solani</i> Sorauer)	<i>adg, dms, chc</i>
Bacterial rot (<i>Erwinia</i> ssp.)	<i>adg, dms</i>
Potato leafroll virus	<i>adg, dms, vrn, sto, acl, spg</i>
Potato mop-top virus	<i>adg, dms</i>
Tobacco rattle virus	<i>adg, phu, dms</i>
Potato virus A	<i>adg, phu, ryb, dms, vrn, sto, acl, spg, chc, cht</i>
Potato virus M	<i>adg, dms, sto, acl</i>
Potato virus S	<i>adg, dms, sto, acl, spg</i>
Potato virus X	<i>adg, phu, ryb, dms, vrn, sto, acl, spg, chc, cht</i>
Potato virus Y	<i>adg, phu, dms, sto, acl, spg, cht</i>
Pale cyst nematode (<i>Globodera pallida</i> (Stone, 1973) Behrens) race 1	<i>adg, vrn</i>
<i>G. pallida</i> race 2	<i>adg, dms, vrn, sto</i>
<i>G. pallida</i> race 3	<i>adg, dms, vrn, sto, acl, spg, spl, opl</i>
Yellow potato cyst nematode (<i>Globodera rostochiensis</i> (Wollenweber, 1923) Behrens) race 1	<i>adg, phu, ryb, stn, dms, vrn, sto, acl, chc, spg, spl, opl</i>
<i>G. rostochiensis</i> race 2	<i>adg, dms, vrn, sto, acl</i>
<i>G. rostochiensis</i> race 3	<i>adg, dms, vrn, sto, acl</i>
<i>G. rostochiensis</i> race 4	<i>adg, ryb, dms, vrn, sto, acl, spg</i>
<i>G. a rostochiensis</i> race 5	<i>adg, dms, vrn, sto, acl</i>
Ring rot (<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> (Spieckermann & Kotthoff) Davis et al.)	No data
Common scab (<i>Streptomyces scabies</i> Lambert and Loria)	<i>adg, phu, dms, vrn, sto, acl, chc</i>
Powdery scab (<i>Spongospora subterranea</i> (Wallr.) Lagerh.)	<i>adg, phu, dms, vrn</i>
Black scab (<i>Rhizoctonia solani</i> J.G. Kühn)	<i>adg, phu, dms, acl</i>
Dry rot (<i>Fusarium</i> spp.)	<i>adg, dms, chc</i>
Foliar blight (<i>Phytophthora infestans</i> Mont. de Bary)**	<i>adg, phu, dms, vrn, sto, acl, spg, blb, vll</i>
Tuber blight (<i>P. infestans</i> Mont. de Bary)	<i>adg, phu, dms, vrn, sto, acl, spg, cht, vll</i>
Skin necrosis (<i>Phoma exigua</i> var. <i>foveata</i> (Foister) Boerema)	<i>adg, phu, dms, vrn, sto, acl, spg</i>
Fusarial wilt (<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht. ex Fr.)	<i>adg, dms, chc</i>
Black stem (<i>Erwinia</i> ssp.)	<i>adg, phu, dms, sto, acl, spg, vrn, cht</i>

* Designations: *acl*, *S. acaule*; *adg*, *S. andigenum*; *blb*, *S. bulbocastanum*; *chc*, *S. chacoense*; *cht*, *S. chilolanum*; *dms*, *S. demissum*; *opl*, *S. oplocense*; *phu*, *S. phureja*; *ryb*, *S. rybinii*; *spl*, *S. sparsipilum*; *spg*, *S. spengazzinii*; *stn*, *S. stenotomum*; *sto*, *S. stoloniferum*; *vll*, *S. vallis-mexici*; *vrn*, *S. vernei* (Huaman, Ross, 1985).

** Late blight resistance in 2005, 2009, 2011, or 2015 according to www.europotato.org.

балансового числа эндосперма (endosperm balance number – EBN) (Johnston, Hanneman, 1980). Разные авторы по-разному распределяют дикие сородичи картофеля по трем уровням генных пулов. К первичному генофонду относят ландрасы и сорта картофеля (Bradeen et al., 2011) или дикорастущие виды *S. acaule*, *S. berthaultii*, *S. brevicaulle*, *S. candolleianum* и *S. vernei* (Castañeda-Álvarez et al., 2015).

В сравнении с другими важнейшими сельскохозяйственными культурами картофель располагает наибольшим разнообразием дикорастущих сородичей. Общее число клубненосных видов *Solanum* до настоящего времени остается предметом дискуссии: Дж. Хокс описал в составе подсекции *Potatoes* (G. Don.) 228 видов (Hawkes,

1990), Л.Е. Горбатенко (2006) разработала классификацию 212 видов, произрастающих в Южной Америке, тогда как Д. Спунер и А. Салаз (Spooner, Salaz, 2006) рассматривают многие таксоны в качестве синонимов и различают 110 видов картофеля. В «Атласе диких видов картофеля» приведены морфологические описания и сведения о географии местообитаний 196 видов картофеля (Hijmans et al., 2002). Для установления филогенетических отношений между клубнеобразующими видами *Solanum* использованы молекулярные методы генотипирования (Spooner et al., 2014; Machida-Hirano, 2015). Однако до настоящего времени нет общепризнанной классификации этих видов. При описании исходного материала селекци-

онеры часто пользуются названиями уже упраздненных видовых таксонов: *S. rybinii* – син. *S. phureja* (Bradshaw, 2009), *S. neoantipoviczii* – син. *S. stoloniferum* (Zoteyeva et al., 2014), *S. ruiz-ceballosii* – син. *S. sparsipilum* (Brylińska et al., 2015) и т. д.

С учетом плоидности и EBN (установленным экспериментальным путем) в секции *Petota* различают виды 6x (4 EBN), 4x (4 EBN), 4x (2 EBN), 2x (2 EBN), 2x (1 EBN) (Hanneman, 1994). Для нескольких десятков видов картофеля EBN не определено (Hijmans et al., 2002). В качестве диплоидного тестера (EBN = 1) используют *S. commersonii*, однако скрещивания с *S. mochiquense* (также EBN = 1) могут привести к другим выводам (Ochoa, 2004). Возможно, что EBN – часть сложной системы репродуктивной изоляции, действующей на пред- и послезиготной стадиях (Masuelli, Camadro, 1997). В работе (Spooner et al., 2014) предложено дифференцировать виды картофеля на пять групп, в соответствии с их показателями EBN и самонесовместимостью. Известны примеры удачных скрещиваний партнеров, чьи показатели EBN несовместимы, и, напротив, при благоприятных показателях EBN скрещивания не всегда оказывались удачными (Masuelli, Camadro, 1997; Jackson, Hanneman, 1999; Jansky, 2006). Концепции генных пулов, филогенетических отношений видов или EBN оперируют крупными комплексами, объединяющими по несколько серий, в составе которых значительное число клубненосных видов *Solanum*. Вероятно, этих подходов недостаточно для характеристики разнообразия генофондов родичей картофеля и прогнозирования результатов межвидовых скрещиваний.

Генетическая обособленность видов сохраняется благодаря механизмам репродуктивной изоляции. Действие таких докопуляционных преград, как временная и механическая изоляция при межвидовой гибридизации картофеля, можно преодолеть, оптимизируя условия и технику скрещивания, разные приемы которой подробно описаны в литературе (Букасов, Камераз, 1972; Jansky, 2006). Более серьезным препятствием для интрогрессивной селекции являются разнообразные послекопуляционные преграды. Непрораствание пыльцы на рыльце пестика, ядерно-цитоплазматическая мужская стерильность и нарушения в развитии эндосперма – наиболее частые причины неудач при межвидовой гибридизации картофеля (Carpato, Frusciante, 2011). Стерильность или подавление мощности и плодовитости гибридного потомства (hybrid breakdown) также усложняют селекционную работу с видами *Solanum*.

Важной особенностью процесса генеративного размножения у многих видов картофеля является формирование нередуцированных (2n) гамет, которые появляются в результате мейотических мутаций в процессах микро- и/или мегаспорогенеза. У видов из разных серий секции *Petota* нередуцированная пыльца образуется с частотой до 33 % (Jackson, Hanneman, 1999). Цитологические механизмы и генетический контроль формирования диплогапет у картофеля хорошо исследованы. Считают, что 2n пыльца в основном образуется в результате нарушений в первом делении мейоза, а появление 2n яйцеклеток вызвано нарушениями во втором делении мейоза (Carpato, Frusciante, 2011). При межвидовой гибридизации тетраплоидное потомство можно получить за счет образования 2n гамет при

скрещивании диплоидных родительских форм (феномен мейотической полиплоидизации).

Результаты практической работы по проведению скрещиваний между близко- и дальнеродственными видами картофеля широко представлены в литературе (Житлова, 1969; Камераз и др., 1974; Лаптев, 1984; Hanneman, 1994; Hermesen, 1994; Jackson, Hanneman, 1999; Ochoa, 2004; Jansky, 2006). Более 50 дикорастущих видов скрещиваются с культурными формами картофеля. В зависимости от вида, вовлекаемого в гибридизацию, и целевого признака интрогрессия генетического материала сородичей картофеля осуществляется путем простого скрещивания или с изменением уровня плоидности, с помощью вида-посредника или соматической гибридизации. Гексаплоидный (6x) вид *S. demissum* в качестве материнской формы напрямую скрещивается с *S. tuberosum*. Также очень часто в селекции используется *S. stoloniferum* (Росс, 1989). Но *S. stoloniferum*, равно как и другой тетраплоидный (4x) вид *S. acaule*, с большим трудом скрещивается с *S. tuberosum*, поэтому необходима предварительная полиплоидизация диких видов. В России первые полиплоидные формы *S. punae* (син. *S. acaule*), *S. antipoviczii* (син. *S. stoloniferum*), *S. parodii* и *S. gibberulosum* (син. *S. chacoense*) были получены и применены в селекции Н.А. Лебедевой (1955). Н.А. Житлова (1969) создала полиплоидные формы видов серий *Transaequatorialia*, *Cuneolata*, *Megistacroloba*, *Longipedicellata*, *Verrucosa* и гибриды на их основе, которые использовались при селекции сортов картофеля в России и Белоруссии.

В качестве вида-посредника наиболее широко использовался *S. chacoense*, который удачно скрещивался с видами серий *Demissa*, *Longipedicellata*, *Acaulia*, *Commerstoniana*, *Megistacroloba*, *Tarijensia*, *Simpliciora*, *Conicibaccata* и *Transaequatorialia* (Камераз и др., 1978). Гибриды *S. chacoense* с видами серий *Cardiophylla* и *Trifida* получены с помощью культуры зародышей (Singsit, Hanneman, 1991), а в случае *S. commersonii* – после предварительной полиплоидизации (Johnston, Hanneman, 1982). Виды-посредники *S. acaule*, *S. microdontum* и *S. verrucosum* использовали для вовлечения в селекцию филогенетически удаленных видов: *S. bulbocastanum*, *S. pinnatisectum*, *S. cardiophyllum*, *S. trifidum*, *S. chancayense* и *S. commersonii* (Dionne, 1963; Лаптев, 1984; Jansky, Hamernik, 2009). Предварительные межвидовые и межсерийные скрещивания позволили вовлечь в селекцию виды серий *Piurana*, *Commerstoniana*, *Circaeifolia* и *Pinnatisecta* (Вавилова, 1978; Bamberg, Hanneman, 1990; Hermesen, 1994). Сравнительно легкая гибридизация между диплоидными южноамериканскими дикими и культурными видами показана в опытах Т.С. Седовой (1980). Южноамериканские диплоидные дикие виды скрещиваются с *S. tuberosum* при изменении уровня плоидности одного из партнеров, диплоидные североамериканские виды не скрещиваются с дигиплоидами *S. tuberosum* (Камераз и др., 1974; Лаптев, 1984; Серегина, 1991; Novy, Hanneman, 1991).

При половой гибридизации выбор оптимальной комбинации скрещивания во многом определяет продолжительность работы по интрогрессии в культурный картофель генетического материала дикого вида – источника желаемого признака. Метод митотической полиплоидизации

является достаточно трудоемким как на этапе, предшествующем работе по скрещиванию, так и в дальнейшем, при оценке полученных межвидовых гибридов. Еще более длительный процесс – получение селекционного материала путем соматической гибридизации. Наши опыты (Рогозина, 2005) свидетельствуют об эффективности скрещивания с дигамплоидами сортов диплоидных диких южноамериканских видов *S. alandiae*, *S. × doddsii*, *S. hondelmannii*, *S. incamayoense*, *S. multidissectum* и *S. vidadurrei*, ранее не использованных в селекции. Нам удалось вовлечь в гибридизацию с *S. chacoense* трудно скрещивающийся с культурными формами картофеля вид *S. okadae* и не скрещивающийся вид *S. multiinterruptum*; впервые получены гибриды культурного картофеля с видом *S. gandarillasii*.

Многообразие клубнеобразующих диких видов *Solanum* недостаточно изучено с точки зрения скрещиваемости с культурным картофелем или межвидовой совместимости. Необходимо «дифференциальное понимание вида», т. е. знание генетической структуры популяций конкретных видов и видового потенциала, амплитуды различий по важнейшим хозяйственно ценным признакам (Вавилов, 1935). Вероятно, при интродукции в новые почвенно-климатические условия клубнеобразующие виды рода *Solanum* с разными системами скрещивания будут различаться по частоте и спектру рекомбинационной изменчивости. Специфические особенности партнеров, участвующих в гибридизации, определяют успех интрогрессии ценного генетического материала и тем самым эффективность использования в селекции конкретного вида картофеля.

Первое поколение межвидовых гибридов как исходный материал для селекции картофеля

Особый интерес для селекции представляют виды с генами, интрогрессия которых позволяет улучшить качество культурного картофеля за минимальное число скрещиваний. Результаты гибридизации видов серии *Demissa* (Букасов, Камераз, 1972), *Longipedicellata* (Котова, 1976), *Acaulia* (Камераз и др., 1978а), *Simpliciora* и *Transaequatorialia* (Ross, 1966; Камераз и др., 1974), видов *S. commersonii* и *S. chomatophilum* (Вавилова, 1978) на исходном уровне плоидности или при привлечении полиплоидных форм свидетельствуют о том, что однократного скрещивания с *S. tuberosum* недостаточно. Использование поколения F_1 в практической селекции ограничено незначительным урожаем, малым числом клубней в гнезде, их плохой формой, горьким вкусом, длинными столонами, интенсивной окраской. Продуктивные генотипы, обнаруживающие хозяйственно ценные признаки и хорошую форму клубней, можно выделить в потомстве от скрещивания диких видов картофеля с дигамплоидами *S. tuberosum* (Hermundstad, Peloquin, 1986) или культурными видами (Седова, 1980). Однако родительские формы, сочетающие хозяйственно ценные качества с устойчивостью к патогенам, получают лишь после нескольких поколений возвратных скрещиваний (Ross, 1966).

Возвратные скрещивания (беккроссы) применяют с целью фиксации желаемого признака дикого вида и улучшения хозяйственно полезных качеств гибридов. Выбор варианта скрещиваний (см. схему) и количество беккроссов зависят от дикого вида и целевого признака.

Варианты скрещиваний с использованием беккроссов (Будин, 1998; Колобаев, 2001; Darsow, 2014)*

Простой беккросс:

- 1 год $W \times tbr = F_1$
- 2 год Отбор в потомстве F_1 и скрещивание $F_1(W \times tbr) \times tbr = B_1$
- 3 год Отбор в потомстве B_1 и скрещивание $B_1[(W \times tbr) \times tbr] \times tbr = B_2$
- 4 год Отбор в потомстве B_2 и скрещивание $B_2\{[(W \times tbr) \times tbr] \times tbr\} \times tbr = B_3$

Прерывающийся беккросс:

- 1 год $W \times tbr = F_1$
- 2 год Самоопыление гибридов $F_1 = F_2(W \times tbr)$
- 3 год Отбор в потомстве F_2 и скрещивание $F_2(W \times tbr) \times tbr = F_2B_1$
- 4 год Отбор в потомстве F_2B_1 и скрещивание $F_2B_1[(W \times tbr) \times tbr] \times tbr = F_2B_2$
- 5 год Отбор в потомстве F_2B_2 и самоопыление лучших клонов

Комбинация беккроссов:

- 1 год $W^1 \times tbr = F_1^1$ и $W^2 \times tbr = F_1^2$
- 2 год Отборы в потомствах F_1^1, F_1^2 и скрещивания $F_1^1(W^1 \times tbr) \times tbr = B_1^1, F_1^2(W^2 \times tbr) \times tbr = B_1^2$
- 3 год Отборы в потомствах B_1^1, B_1^2 и скрещивания $B_1^1[(W^1 \times tbr) \times tbr] \times tbr = B_2^1, B_1^2[(W^2 \times tbr) \times tbr] \times tbr = B_2^2$
- 4 год Отборы в потомствах B_2^1, B_2^2 и скрещивание $B_2^1 \times B_2^2$

Беккроссирование двувидавого гибрида:

- 1 год $W^1 \times W^2 = F_{1a}$
- 2 год Отбор в потомстве F_{1a} и скрещивание $F_{1a}(W^1 \times W^2) \times tbr = F_{1b}$
- 3 год Отбор в потомстве F_{1b} и скрещивание $F_{1b}[F_{1a}(W^1 \times W^2) \times tbr] \times tbr = W_2B_1$
- 4 год Отбор в потомстве W_2B_1 и скрещивание $W_2B_1\{F_{1b}[F_{1a}(W^1 \times W^2) \times tbr] \times tbr\} \times tbr = W_2B_2$

* W, W^1, W^2 – виды картофеля, tbr – сорт картофеля, F_1 – первое гибридное поколение, F_{1a} – первое гибридное поколение от скрещивания разных видов картофеля, F_2 – самоопыление первого гибридного поколения, B_1 – первый беккросс, W_2B_1 – первый беккросс трехвидового гибрида.

Простой беккросс эффективен при передаче культурному картофелю от дикого вида признака устойчивости с моногенно-доминантным контролем: расоспецифической устойчивости к фитофторозу, крайней устойчивости к вирусам ХВК, YBK, устойчивости к нематоде патотипа Ro1. После трех-четырёхкратного беккроссирования гибридов *S. demissum* были получены урожайные и устойчивые к фитофторозу формы, в том числе сорта с *R*-генами: Камераз, Невский, Агрономический, Истринский, Веселовский 2-4. В потомстве трехкратных беккроссов отобраны сорта, унаследовавшие устойчивость к YBK от полиплоидной формы *S. chacoense* f. *garciae* 55d (Яшина, 2003), и нематодоустойчивые сорта на основе *S. andigenum* CPC 1673 (Bradshaw, 2009). Перспективный селекционный материал на основе *S. stoloniferum* был создан за пять-шесть циклов скрещивания и отбора (Ross, 1966; Murphy et al., 1999). Иммунные к ХВК сорта Saphir и Anett получены после шести-семикратного беккроссирования *S. acaule* на *S. tuberosum* (Solomon-Blackburn, Barker, 2001).

В течение всего процесса гибридизации проводят индивидуальный отбор по целевому признаку и другим хозяйственно ценным качествам. Устойчивые к вирусам формы можно выделить на стадии семян, но для испытания на иммунитет к X и Y вирусам необходимо привить оцениваемые генотипы на инфицированные растения табака. При испытании на устойчивость к золотистой нематоде и возбудителю рака картофеля клоновое потомство оценивают в течение двух лет в специализированных лабораториях, и тогда один цикл скрещивания и отбора длится не менее четырех лет.

Прерывающийся беккросс (см. схему) применяют, если целевой признак контролируется полигенами или его проявление зависит от взаимодействия генетических факторов обеих скрещиваемых форм (Будин, 1998; Darsow, 2014). Чередование скрещиваний с получением потомств от самоопыления – один из факторов успеха В.А. Колобаева (2001) по созданию доноров горизонтальной устойчивости картофеля к фитофторозу. Отбор по полигенным признакам, например форм с горизонтальной устойчивостью к фитофторозу, проводят методами искусственного заражения и полевой оценки в условиях высокой инфекционной нагрузки (Dorrance, Inglis, 1997; Zimnoch-Guzowska, Tatarowska, 2004; Kuznetsova et al., 2014). При нестабильных погодных условиях полевые испытания не обеспечивают надежных результатов. При проведении опытов с отделенными листьями в лаборатории или с целыми растениями в теплице для искусственного заражения используют высоковирулентные изоляты *P. infestans*. При этом для достоверной характеристики сортообразцов картофеля по устойчивости к фитофторозу необходим набор изолятов из разных регионов. Оценки устойчивости к фитофторозу в лабораторных испытаниях и полевых опытах варьируют в широких пределах в зависимости от исследуемого материала и методов тестирования и не всегда согласуются между собой. Как показал опрос исследователей из 39 селекционных центров и лабораторий, не существует единой методики проведения таких испытаний (Zimnoch-Guzowska, Flis, 2002). Селекцию серьезно затрудняют невысокие агро-

номические качества родительских форм – источников фитофтороустойчивости (Zimnoch-Guzowska, Tatarowska, 2004). В результате продолжительность периода от первого скрещивания источников устойчивости к фитофторозу, отобранных среди диких видов *S. demissum* или *S. simplicifolium*, до регистрации сорта составляет 20 лет и более (Bradshaw, 2009). Принципиальным шагом в преодолении этих затруднений станет использование мономорфных линий *P. infestans* вместо полиморфных изолятов и характеристика этих линий по генам авирулентности с использованием молекулярных методов (Vleeshouwers et al., 2011).

Комбинация беккроссов (см. схему) позволяет повысить устойчивость межвидовых гибридов картофеля к фитофторозу (Колобаев, 2001). И.М. Яшина (2003) использовала этот же подход для создания интрогрессивных родительских линий с генами иммунитета к YBK и нематоде патотипа Ro1 и с полигенами полевой устойчивости к фитофторозу. Шотландские селекционеры в потомстве разных комбинаций беккроссов выделили сорта и линии, устойчивые к нематоде, и ценные родительские формы для селекции (Bradshaw, 2009).

Беккроссирование двух-, трех- и четырехвидовых гибридов результативно для некоторых комбинаций диких видов. Беккроссы гибрида *S. vernei* × *S. chacoense* 55d, при сравнении с полученными на основе только *S. chacoense* 55d, отличались лучшими показателями хозяйственно ценных признаков, что позволило уже в поколении B₂ отобрать генотипы – сорта Брянский деликатес, Накра, Мастер (Яшина, 2003). Сорт Pentland Ace выделен в потомстве B₃ гибрида *S. rybinii* × *S. demissum* (Bradshaw, 2009). Образец *S. bulbocastanum* был вовлечен в гибридизацию с *S. acaule* в 1959 г. В результате последующего скрещивания амфидиплоида *S. bulbocastanum* × *S. acaule* (6n) с культурным диплоидным видом *S. phureja*, а затем нескольких циклов беккроссирования получены устойчивые к фитофторозу сорта Бионика и Толука, унаследовавшие от *S. bulbocastanum* ген *Rpi-blb2* (Hermesen, 1994; Bradshaw, 2009).

Для выделения ценных форм в потомстве беккроссов межвидовых гибридов необходимо оценить большой объем селекционного материала. При работе с дикими видами и поколениями F₁ и B₁ результативность отбора источников иммунитета к YBK или устойчивости к нематоде составляет всего 2–2.5 % (Яшина, 2003). Создание беккроссов межвидового происхождения (поколений B₂, B₃) занимает в среднем 10–12 лет (Яшина и др., 2010). Еще более длительный процесс – создание сложных межвидовых гибридов, устойчивых к фитофторозу (Колобаев, 2001). Столь значительная продолжительность пребридинга вызвана необходимостью оценить и отобрать сегреганты по признакам устойчивости к патогенам в сочетании с хорошими агрономическими качествами – признакам, имеющим сложную генетическую природу.

В процессе беккроссирования у части потомства снижается устойчивость к патогенам, при этом отмечены случаи отклонения наблюдаемых в гибридном потомстве расщеплений от теоретически ожидаемых (Flis, 1995; De Jong et al., 2001; Simko et al., 2007). Возможное объяснение этого кроется в организации генома картофеля, в котором локусы большинства генов устойчивости сгруппированы

в кластеры и расположены в «горячих точках» (hotspots) генома с высокой частотой рекомбинации (Gebhardt, Valkonen, 2001). Гены, контролирующие продуктивность, напротив, в основном сосредоточены на участке между центромерой и проксимальной хиазмой (Buso et al., 1999). Другой возможной причиной снижения устойчивости к патогенам в новых поколениях межвидовых гибридов может быть влияние генетического фона или эпигенетические изменения. Так, например, у гибридов *S. tuberosum* × *S. kurtzianum* обнаружены изменения в метилировании цитозина и новые AFLP-фрагменты в поколении F₁ и последующих беккроссов, которые могут влиять на экспрессию или выключение (silencing) генов, в том числе потенциально ценных (Marfil et al., 2006).

Место молекулярных маркеров в создании межвидовых гибридов картофеля, устойчивых к патогенам

За неполные тридцать лет своего развития маркер-опосредованная селекция картофеля открыла невиданные ранее возможности для поиска новых источников хозяйственно ценных признаков и определяющих их генов в генетических коллекциях, ускорения селекционного процесса и повышения его эффективности на всех стадиях создания новых сортов, от обследования больших генетических коллекций и подбора родительских форм до контроля подлинности зарегистрированных сортов в процессе семеноводства (Gebhardt et al., 2006; Gebhardt, 2013; Slater et al., 2013, 2014, 2016; Hirsch et al., 2016). Новые горизонты открывает геномная селекция, оперирующая всей совокупностью полиморфизмов исследуемого генома (Barrell et al., 2013).

Особенно эффективными оказались эти методы при создании сложных межвидовых гибридов картофеля, прежде всего гибридов, устойчивых к многочисленным патогенам. В силу уникальной специфичности молекулярных маркеров, позволяющих различать гены устойчивости к разным расам/штаммам патогенов картофеля, эти маркеры решают задачи, недоступные традиционным методам фенотипического анализа (Tiwarī et al., 2012, 2013; Ramakrishnan et al., 2015).

Необходимо подчеркнуть, что большинство описанных к настоящему времени маркеров хозяйственно ценных признаков картофеля (Slater et al., 2014; Ramakrishnan et al., 2015) фланкируют соответствующие локусы, в то время как многие гены, отвечающие за эти признаки, остаются неидентифицированными. Между тем для мониторинга селекционного процесса предпочтительны маркеры, которые являются фрагментами самих целевых генов и, в отличие от фланкирующих маркеров, полностью сохраняют свою информационную ценность даже при значительной рекомбинации генетического материала в геномах межвидовых гибридов. В этом отношении лучше всего обстоит дело с маркерами генов расоспецифичной устойчивости к *P. infestans* и некоторыми маркерами устойчивости к вирусам и нематодам. В самое последнее время были идентифицированы некоторые гены расоспецифичной устойчивости к фитофторозу (Muktar et al., 2015; Mosquera et al., 2016), однако маркеры этих генов еще не испытаны применительно к задачам селекции.

Однако и при работе с маркерами, созданными на основе последовательностей целевых генов, существуют две серьезные проблемы. Во-первых, многие маркеры, созданные с целью картировать и клонировать целевые гены, не верифицированы применительно к разнообразию культурных и дикорастущих форм картофеля, используемых при создании межвидовых гибридов. Во-вторых, при использовании этих маркеров необходимо отличать функциональные гены от их неактивных структурных гомологов, которые также будут узнаваться маркерами. В случае расоспецифичных генов устойчивости к фитофторозу эти проблемы удастся отчасти разрешить с помощью методов эффектормики: в этом случае гены устойчивости растения распознаются с помощью индивидуальных генов авирулентности патогена (Vleeshouwers et al., 2011). Однако эти методы имеют свои ограничения и слишком громоздки для целей практической селекции.

Донорские качества селекционных клонов и сортов картофеля

Методология генетического изучения исходного материала для селекции с целью поиска и создания доноров ценных признаков разработана А.Ф. Мережкой (ВИР) на примере мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). При скрещивании с культурной формой донор должен давать жизнеспособное и плодovitое потомство, которое наследует целевой признак, не сцепленный с отрицательными качествами (Мережка, 1994). Принципы создания доноров картофеля сформулированы К.З. Будиным (1997) и реализованы при создании межвидовых гибридов – доноров устойчивости картофеля к патогенам. В потомстве от скрещивания донора с сортом, восприимчивым к болезням и вредителям, можно отобрать генотипы с высокой продуктивностью, хорошими качествами клубней и устойчивостью к патогенам (Будин, 1997). В зарубежной литературе используют термины parents, parental lines – родительские формы, линии (Bradshaw, 2009; Zimnoch-Guzowska et al., 2013). Для определения селекционной ценности потенциальных родительских форм также проводят оценку потомства (progeny tests).

Большинство возделываемых сортов картофеля имеют межвидовое происхождение. Обилие сортов – межвидовых гибридов – уже в середине прошлого столетия послужило основанием для выделения их в особый подвид *Solanum tuberosum* L. ssp. × *europaeum* Buk. et Lechn. Позднее, принимая объем вида *S. tuberosum* в понимании Букасова и Лехновича и исправляя допущенные авторами неточности в оформлении таксона, Л.И. Костина (1991) обосновала правомерность выделения сортов картофеля в подвид *Solanum tuberosum* L. subsp. *tuberosum*.

Все устойчивые к фитофторозу сорта имеют в родословной *S. demissum* (Росс, 1989). Первый российский сорт – Фитофтороустойчивый, выведенный с участием *S. demissum*, не возделывался в производстве, но стал родоначальником многих отечественных сортов. Европейские селекционные линии, полученные с участием *S. demissum*, а возможно, и *S. andigenum*, так называемые W-расы (Glendinning, 1983), в 1932 г. были переданы в США, где послужили исходным материалом для создания сорта Кеннебек и многих других сортов (Hougas, Ross, 1956).

W-расы широко использовались селекционерами Бельгии и Великобритании. Надежно идентифицированные гены *R1*, *R2*, *R3a*, *R3b* и *R8* перенесены из *S. demissum* в сорта картофеля по одному или в разных сочетаниях.

Селекция на основе *S. demissum* в направлении сверхчувствительного типа устойчивости к фитофторозу оказалась малоэффективной. Вследствие быстрой эволюции *P. infestans* и отбора наиболее успешных рас этого патогена, действие одиночных генов расоспецифической устойчивости не обеспечивает длительной защиты сортового картофеля. Тем не менее в современной селекции продолжают использовать сорта и селекционные линии с генетическим материалом *S. demissum* как источник *R*-генов; механизм их действия остается дискуссионным (Gebhardt, 2013). В последние сорок лет основным направлением работы по созданию устойчивого к фитофторозу картофеля стала селекция на полевую (расонеспецифичную) устойчивость в сочетании с расоспецифичной устойчивостью, основанной на *R*-генах. Расонеспецифичная устойчивость присуща широкому кругу клубненосных видов *Solanum* и контролируется многочисленными генами, многие из которых пока картированы только как локусы количественных признаков и исследованы значительно слабее, чем расоспецифичные гены (Gebhardt, 2013; Rodewald, Trognitz, 2013; Śliwka, Zimnoch-Guzowska, 2013). Примером длительной устойчивости к фитофторозу, которую обеспечивает соединение в одном растении (пирамидирование) *R*-генов разной специфичности, служат сорта Sarpō Mira (Rietman et al., 2012; Tomczyńska et al., 2014b), дифференциатор MaR9 (Kim et al., 2012; Yo et al., 2015), а также сложные межвидовые гибриды картофеля, полученные в российских селекцентрах (Рогозина и др., 2013). Эти формы несут 4–7 *R*-генов (Kim et al., 2012; Rietman et al., 2012; Khavkin et al., 2014) – существенно больше, чем сорта, созданные методами генетической инженерии (Haltermann et al., 2016; Haverkort et al., 2016). На основе информации о профилях *R*-генов появляется возможность их комплементации с помощью накапливающих скрещиваний межвидовых гибридов.

Длительную устойчивость к YBK имеют сорта картофеля с генами *Rysto* и *Ryadg* (Solomon-Blackburn, Barker, 2001; Zimnoch-Guzowska et al., 2013). Использование нескольких разных источников – образцов *S. stoloniferum* – стало причиной различий по признаку фертильности между клонами и сортами российской, польской и немецкой селекции, одни из которых унаследовали мужскую стерильность и γ-тип цитоплазмы (Lindner et al., 2011), а другие являются фертильными (Flis et al., 2005).

Сорта и селекционные клоны с генами устойчивости к фитофторозу, вирусам или нематодам используют в качестве родительских форм для создания нового поколения сортов с улучшенными агрономическими качествами или групповой устойчивостью к патогенам. Обширный перечень таких сортов и селекционных клонов рекомендован для российских селекционеров (Симаков и др., 2006; Яшина и др., 2010).

Сорт Сага, устойчивый к различным штаммам YBK, XBK и нематоде патотипа Ro1, послужил родительской формой для 11 сортов селекции Шотландского института сельскохозяйственных исследований (Scottish Crop Re-

search Institute), которые были включены в Национальный перечень с 1993 по 2005 г. (Bradshaw, 2009). Клон 11-79 и его производные – сорта Pentland Crown, Pentland Javelin (источник гена *H1*) – также были неоднократно использованы как родительские формы в селекции. Ген *H1*, унаследованный от *S. andigenum*, – длительного действия и обеспечивает защитный эффект от инвазии *G. rostohiensis* Ro1. Но распространение в Великобритании сортов с геном *H1* стало причиной доминирования в популяции другого вида нематоды – *G. pallida* (Bradshaw et al., 2006). Устойчивые к бледной нематоде сорта Eden, Vales Everest – сложные межвидовые гибриды, отобранные в потомстве от скрещивания клона H1H3 (с *S. andigenum* и *S. multidissectum* в родословной) с сортами Pentland Ivory, Maris Piper или Saga. Продолжительность периода от скрещивания H1H3 и Pentland Ivory до внесения сорта Vales Everest в Национальный перечень сортов составила 33 года (Bradshaw, 2009). Российские сорта Ресурс и Эффект с *Rysto* геном крайней устойчивости к YBK, перенесенным из *S. stoloniferum*, использовали в качестве материнских форм при выведении сортов Слава Брянщины и Ветеран соответственно (Яшина, 2003).

Современный сорт картофеля создается методом комбинационной селекции при тщательном подборе родительских пар, дополняющих друг друга по возможно большему числу положительных признаков. В качестве исходных родительских форм российские селекционеры используют гибриды-беккроссы межвидового происхождения, унаследовавшие от клубненосных видов *Solanum* доминантные гены устойчивости к вирусам и нематоде. Устойчивость к фитофторозу повышают путем проведения накапливающих скрещиваний. Подбор родительских компонентов по генетической отдаленности обеспечивает гетерозиготность их потомства, что ведет к увеличению частоты появления гибридов с повышенной урожайностью (Яшина и др., 2010). Генетическое разнообразие современного сортимента и селекционных клонов картофеля оценивают с помощью ДНК-маркеров, ассоциированных с *R*-генами устойчивости к XBK, YBK, нематоде и фитофторозу (Milczarek et al., 2011; Gebhardt, 2013; Scharma et al., 2014; Бирюкова и др., 2015; Fulladolsa et al., 2015; Lopez et al., 2015; Ramakrishnan et al., 2015).

У сортового картофеля идентифицированы новые гены, прежде не обнаруживаемые у клубненосных видов *Solanum*. При заражении новыми рекомбинантными штаммами YBK эти гены обеспечивают реакцию сверхчувствительности у сортов Albatros, Sekwana и Romula (гены *Ny-1*, *Ny-2*) (Szajko et al., 2014) и Sarpō Mira (ген *Ny-Smira*) (Tomczynska et al., 2014a). Сочетание (пирамидирование) генов разной специфичности у сорта Sarpō Mira делает его высокоустойчивым к возбудителю фитофтороза (Rietman et al., 2012). Ген *Ryadg*, привнесенный от *S. andigenum*, контролирует иммунитет ко всем штаммам YBK, в том числе новым рекомбинантным формам PVY^{NTN}, PVY^{N-Wi} (Rodrigues de Paula et al., 2014). Вопрос о происхождении этих генов пока не выяснен, но о появлении множественной устойчивости к патогенам у гибридных клонов, не отсеleetированных по данному признаку, сообщают и другие исследователи (Jansky, Rouse, 2003). Генотипические изменения у современных сортов в сравнении с

сортами, созданными на начальных этапах научной селекции, отслежены с помощью SNP-маркеров (Hamilton et al., 2011; Vos et al., 2015). При анализе более 500 сортов и селекционных линий разного происхождения и назначения выявлены интрогрессивные сегменты и установлены значительные изменения в составе геномного пула. Частота уникальных аллелей у сортов, созданных после 1945 г., составляет 18 %, что значительно выше, чем у сортов, созданных в предыдущий период, – 1.4 %. Очевидно, что интрогрессивная селекция с привлечением генетического материала дикорастущих родичей способствует генетическому и генотипическому разнообразию сортов и селекционных клонов картофеля.

Acknowledgments

The compilation of this review was supported by State Budgeted Projects 0662-2014-0018 and 0574-2014-0020 and by the Russian Foundation for Basic Research, project 16-04-00098.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Bamberg J., Hanneman R. Allelism of endosperm balance number (EBN) in Mexican tuber-bearing *Solanum* species. *Theor. Appl. Genet.* 1990;80(2):161-166. DOI 10.1007/BF00224380.
- Barrell P.J., Meiyalaghan S., Jacobs J.M.E., Conner A.J. Applications of biotechnology and genomics in potato improvement. *Plant Biotechnol. J.* 2013;11(8):907-920. DOI 10.1111/pbi.12099.
- Biryukova V.A., Shmyglya I.V., Abrosimova S.B., Zapekina T.I., Melleshin A.A., Mityushkin A.V., Manankov V.V. Search for sources of genes for resistance to pathogens among accessions of plant breeding and genetics collections of the Lorkh All-Russia Research Institute of Potato Farming by using molecular markers. *Zashhita kartofelya = Potato Protection*. 2015;1:3-7. (in Russian)
- Bradeen J.M., Haynes K.G., Kole C. Introduction to potato. *Genetics, Genomics and Breeding of Potatoes*. Eds. J.M. Bradeen, K.G. Haynes. Enfield, NH: Sci. Publ., 2011;1-19.
- Bradshaw J.E. Potato breeding at the Scottish Plant Breeding Station and the Scottish Crop Research Institute: 1920–2008. *Potato Res.* 2009;52(2):141-172. DOI 10.1007/s11540-009-9126-5.
- Bradshaw J., Bryan G., Ramsay G. Genetic resources (including wild and cultivated *Solanum* species) and progress in utilization. *Potato Res.* 2006;49(1):49-65. DOI 10.1007/s11540-006-9002-5.
- Brylińska M., Tomczyńska I., Jakuczun H., Wasilewicz-Flis I., Wittek K., Jones J., Śliwka J. Fine mapping of the *Rpi-rzc1* gene conferring broad-spectrum resistance to potato late blight. *Eur. J. Plant Pathol.* 2015;143(1):193-198. DOI 10.1007/s10658-015-0663-2.
- Budin K.Z. *Geneticheskie osnovy sozdaniya donorov kartofelya* [Genetic Basis of Breeding Potato Donors]. St.-Petersburg, VIR Publ., 1997. (in Russian)
- Budin K.Z. *Genetika kartofelya* [Potato Genetics]. *Genetika kul'turnykh rasteniy* (len, kartofel', morkov', zelenyye kul'tury, gladiolus, yablonya, lyutserna) [Genetics of domestic plants (flax, potato, carrot, leaf vegetables, gladiolus, apple tree, and alfalfa)]. St.-Petersburg, VIR Publ., 1998;53-96. (in Russian)
- Bukasov S.M. *Revolutsiya v selektsii kartofelya* [Revolution in Potato Breeding]. Leningrad, VIR Publ., 1933. (in Russian)
- Bukasov S.M. Principles of the systematics of potatoes. *Trudy po prikladnoi botanike, genetike i selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 1978;62(1):3-35. (in Russian)
- Bukasov S.M., Kameraz A.Ya. *Selektsiya i semenovodstvo kartofelya* [Potato Breeding and Seed Production]. Leningrad, Kolos Publ., 1972. (in Russian)
- Buso J., Boiteux L., Tai G., Peloquin S. Chromosome regions between centromeres and proximal crossovers are the physical sites of major effect loci for yield in potato: Genetic analysis employing meiotic mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999;96(4):1773-1778. DOI 10.1073/pnas.96.4.1773.
- Carpato D., Frusciante L. Classical genetics and traditional breeding. *Genetics, Genomics and Breeding of Potatoes*. Eds. J.M. Bradeen, K.G. Haynes. Enfield, NH: Sci. Publ., 2011;20-40.
- Castañeda-Álvarez N.P., de Haan S., Juárez H., Khoury C.K., Achicanoy H.A., Sosa C.C., Bernau V.V., Salas A., Heider B., Simon R., Maxted N., Spooner D. *Ex situ* conservation priorities for the wild relatives of potato (*Solanum* L. section *Petota*). *PLoS ONE*. 2015;10(4):e0122599. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0122599>.
- Chrzanowska M., Sieczka M., Zagórska H. Resistance to PMV in potato parental lines bred in Młochów Research Center, IHAR. *Plant Breed. Seed Sci.* 2002;46(2):57-65.
- Darsow U. Pre-breeding and breeding of potatoes for quantitative resistance to *Phytophthora infestans* on foliage and tubers and for different utilization – problems, solutions and results. *Julius Kühn-Institute, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg*, 2014;312. DOI 10.5073/jka.2014.441.000.
- De Jong H., Proudfoot K.G., Murphy A.M. The germplasm release of F87084, a fertile, adapted clone with multiple disease resistances. *Am. J. Potato Res.* 2001;78(2):141-149. DOI 10.1007/BF02874769.
- Dionne L. Studies on the use of *Solanum acaule* as a bridge between *Solanum tuberosum* and species in the series *Bulbocastana*, *Cardiophylla* and *Pinnatisecta*. *Euphytica*. 1963;12(3):263-269. DOI 10.1007/BF00027461.
- Dorrance A.E., Inglis D.A. Assessment of greenhouse and laboratory screening methods for evaluating potato foliage for resistance to late blight. *Plant Dis.* 1997;81(10):1206-1213. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.10.1206>.
- Flis B. Inheritance of extreme resistance to potato virus Y in potato. *Potato Res.* 1995;38(2):199-210. DOI 10.1007/BF02357933.
- Flis B., Hennig J., Strzelczyk-Zyta D., Gebhardt C., Marczewski W. The *Ry-sto* gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistance to *Potato virus Y* maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122₇₁₈ in PVY resistant potato cultivates. *Mol. Breeding*. 2005;15(1):95-101. DOI 10.1007/s11032-004-2736-3.
- Fulladolsa A.C., Navarro F.M., Kota R., Severson K., Palta J., Charkowski A. Application of marker assisted selection for *Potato virus Y* resistance in the University of Wisconsin Potato Breeding Program. *Am. J. Potato Res.* 2015;92(3):444-450. DOI 10.1007/s12230-015-9431-2.
- 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 D., Henselewski H., Lehmann W., Schwarzfischer J., Valkonen J. Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. *Theor. Appl. Genet.* 2006;112(8):1458-1464. DOI 10.1007/s00122-006-0248-8.
- Gebhardt C., Valkonen J. Organization of genes controlling diseases resistance in the potato genome. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2001;39:79-102. DOI 10.1146/annurev.phyto.39.1.79.
- Glendinning D. Potato introductions and breeding up to the early 20th century. *New Phytol.* 1983;94(3):479-505. DOI 10.1111/j.1469-8137.1983.tb03460.x.
- Gorbatenko L.E. *Vidy kartofelya Yuzhnoy Ameriki (ekologiya, geografiya, introduktsiya, sistematika, selektsionnaya znachimost')* [Potato species of South America: ecology, geography, introduction, systematics, and breeding significance]. St.-Petersburg, VIR Publ., 2006. (in Russian)
- Halterman D., Guenther J., Collinge S., Butler N., Douches D. Biotech potatoes in the 21st century: 20 years since the first biotech potato. *Am. J. Potato Res.* 2016;93(1):1-20. DOI 10.1007/s12230-015-9485-1.

- Hamilton J., Hansey C., Whitty B., Stoffel K., Massa A., Van Deynze A., De Jong V., Douches D., Buell R. Single nucleotide polymorphism discovery in elite North American potato germplasm. *BMC Genomics*. 2011;12:302. DOI 10.1186/1471-2164-12-302.
- Hanneman R. Assignment of Endosperm Balance Numbers to the tuber-bearing *Solanums* and their close non-tuber-bearing relatives. *Euphytica*. 1994;74(1):19-25. DOI 10.1007/BF00033762.
- Harlan J.R., de Wet J.M.J. Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon*. 1971;20(4):509-517. DOI 10.2307/1218252.
- 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(1):35-66. DOI 10.1007/s11540-015-9312-6.
- Hawkes J. Genetic poverty of the potato in Europe. *Proc. Conf. Broadening Genet. Base Crops*, Wageningen, 1978. Pudoc. Wageningen, 1979;19-27.
- Hawkes J. The Potato, Evolution, Biodiversity and Genetic Resources. London: Belhaven Press, 1990.
- Hermesen J. Introgression of genes from wild species, including molecular and cellular approaches. *Potato Genetics*. Eds. J.E. Bradshaw, G.R. Mackay. CAB International. Wallingford, Oxon, UK, 1994; 515-538.
- Hermundstad S., Peloquin S. Tuber yield and tuber traits of haploid-wild F1 species hybrids. *Potato Res.* 1986;29(3):287-297. DOI 10.1007/BF02359958.
- Hijmans R.J., Spooner D.M., Salas A.R., Guarino L., de la Cruz J. Atlas of wild potatoes. *Syst. Ecogeogr. Studies on Crop Genepools*. 2002;10. <http://www.biodiversityinternational.org/e-library/publications/detail/atlas-of-wild-potatoes/>.
- Hirsch C.D., Buell C.R., Hirsch C.N. A toolbox of potato genetic and genomic resources. *Am. J. Potato Res.* 2016;93(1):21-32. DOI 10.1007/s12230-015-9486-0.
- Hougas R., Ross R. The use of foreign introductions in breeding American potato varieties. *Am. Potato J.* 1956;33(11):328-339. DOI 10.1007/BF02877174.
- Human Z., Ross R. Updated listing of potato species names, abbreviations and taxonomic status. *Am. Potato J.* 1985;62(11):629-641. DOI 10.1007/BF02854438.
- Jackson S.A., Hanneman R.E., Jr. Crossability between cultivated and wild tuber- and non-tuber-bearing *Solanums*. *Euphytica*. 1999; 109(1):51-67. DOI 10.1023/A:1003710817938.
- Jansky S. Overcoming hybridization barriers in potato. *Plant Breed.* 2006;125(1):1-12. DOI 10.1111/j.1439-0523.2006.01178.x.
- Jansky S., Dempewolf H.H., Camadro E.L., Simon R., Zimnoch-Guzowska E., Bisognin D.A., Bonierbale M. A case for crop wild relative preservation and use in potato. *Crop Sci.* 2013;53(3):746-754. DOI 10.2135/cropsci2012.11.0627.
- Jansky S., Hamernik A. The introgression of 2 × 1EBN *Solanum* species into the cultivated potato using *Solanum verrucosum* as a bridge. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2009;56(8):1107-1115. DOI 10.1007/s10722-009-9433-3.
- Jansky S., Rouse D. Multiple disease resistance in interspecific hybrids of potato. *Plant Dis.* 2003;87(3):266-272. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.3.266>.
- Johnston S., Hanneman R. Support of the endosperm balance number hypothesis utilizing some tuber-bearing *Solanum* species. *Am. Potato J.* 1980;57(1):7-14. DOI 10.1007/BF02852750.
- Johnston S., Hanneman R. Manipulations of endosperm balance number overcome crossing barriers between diploid *Solanum* species. *Science*. 1982;217(4558):446-448. DOI 10.1126/science.217.4558.446.
- Kameraz A.Ya., Vavilova M.A., Zhitlova N.A., Ivanova V.N. Interspecific hybridization of the potatoes involving wild species of the series *Acaulia* Juz. *Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii* = Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 1978a;62(1):92-109. (in Russian)
- Kameraz A.Ya., Zhitlova N.A., Ivanova V.N. Employing wild diploid potato species *Solanum chacoense* Bitt. in interspecific hybridization. *Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii* = Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 1978b;62(1):110-122. (in Russian)
- Khavkin E.E., Fadina O.A., Sokolova E.A., Beketova M.P., Drobyazina P.E., Rogozina E.V., Kuznetsova M.A., Yashina I.M., Jones R.W., Deahl K.L. Pyramiding R genes: genomic and genetic profiles of interspecific potato hybrids and their progenitors. *PPO-Special Rep. no. 16*. Wageningen, DLO Foundation, 2014;215-220.
- Kim H.J., Lee H.R., Jo K.R., Mortazavian S.M.M., Huigen D.J., Evenhuis B., Kessel G., Visser R.G.F., Jacobsen E., Vossen J.H. Broad spectrum late blight resistance in potato differential set plants MaR8 and MaR9 is conferred by multiple stacked R genes. *Theor. Appl. Genet.* 2012;124(5):923-935. DOI 10.1007/s00122-011-1757-7.
- Kolobaev V.A. Printsipy i metody sozdaniya vysokoeffektivnykh donorov gorizontally ustoichivosti kartofelya k fitoflorozu [Principles and Methods of Breeding Highly Efficient Donors of Horizontal Late Blight Resistance]. St.-Petersburg, VIZR Publ., 2001. (in Russian)
- Kostina L.I. Ob ob'eme vida *Solanum tuberosum* L. [On the volume of the species *Solanum tuberosum* L.] *Problemy evolyutsii, populyatsionnoy izmenchivosti i sistematiki rasteniy* [Problems of Evolution, Population Variability, and Plant Taxonomy]. St.-Petersburg: VIR Publ., 1991;139:58-64. (in Russian)
- Kotova K.A. Mezhdovidovaya gibridizatsiya v selektsii kartofelya na ustoichivost' k fitoflore, virusu Y i produktivnost' [Interspecies hybridization in potato breeding for resistance to late blight and potato virus Y and for performance]. *Geneticheskie osnovy mezhsortovoy i mezhdovidovoy gibridizatsii kartofelya i pshenitsy* [Genetic bases of the intervarietal and interspecies hybridization of potato and wheat]. Leningrad, 1976;295:33-39. (in Russian)
- Kuznetsova M.A., Spiglazova S.Yu., Rogozhin A.N., Smetanina T.I., Filippov A.V. New approaches for measuring potato susceptibility to *Phytophthora infestans*. *PPO-Special Rep. no. 16*. Wageningen, DLO Foundation, 2014;223-232. http://130.226.173.223/euroblight/Workshop/2013Limassol/Proceedings/Page223-232_Kuznetsova.pdf.
- Laptev Yu.P. Geteroploidiya v selektsii rasteniy [Heteroploidy in Plant Breeding]. Moscow, Kolos Publ., 1984. (in Russian)
- Lebedeva N.A. Polyploid production in some wild potato species. *Botanicheskiy zhurnal* = Journal of Botany (Leningrad). 1955;40:575-583. (in Russian)
- Lindner K., Behn A., Schwarzfischer A., Song Y.-S. Extreme Y-Resistenz im aktuellen deutschen Kartoffelsortiment. *J. Kulturpflanz.* 2011;63(4):97-103.
- Lopez M., Riegel R., Lizana C., Behn A. Identification of virus and nematode resistance genes in the Chilota Potato Genebank of the Universidad Austral de Chile. *Chilean J. Agr. Res.* 2015;75(3). DOI 10.4067/S0718-58392015000400008.
- Love S.L. Founding clones, major contributing ancestors, and exotic progenitors of prominent North American potato cultivars. *Am. J. Potato Res.* 2000;76(5):263-272. DOI 10.1007/BF02853624.
- Machida-Hirano R. Diversity of potato genetic resources. *Breed. Sci.* 2015;65(1):26-40. DOI 10.1270/jsbbs.65.26.
- Marfil C.F., Masuelli R.W., Davison J., Comai L. Genomic instability in *Solanum tuberosum* × *Solanum kurtzianum* interspecific hybrids. *Genome*. 2006;49(2):104-113. DOI 10.1139/g05-088.
- Masuelli R.W., Camadro E.L. Crossability relationships among wild potato species with different ploidies and Endosperm Balance Numbers (EBN). *Euphytica*. 1997;94(2):228-235. DOI 10.1023/A:1002996131315.

- Merezhko A.F. Problema donorov v selektsii rasteniy [The Donor Problem in Plant Breeding]. St.-Petersburg, VIR Publ., 1994. (in Russian)
- Milczarek D., Flis B., Przetakiewicz A. Suitability of molecular markers for selection of potatoes resistant to *Globodera* spp. *Am. J. Potato Res.* 2011;88(3):245-255. DOI 10.1007/s12230-011-9189-0.
- Mosquera T., Alvarez M.F., Jiménez-Gómez J.M., Muktar M.S., Paulo M.J., Steinemann S., Li J., Draffehn A., Hofmann A., Lübeck J., Strahwald J., Tacke E., Hofferbert H.R., Walkemeier B., Gebhardt C. Targeted and untargeted approaches unravel novel candidate genes and diagnostic SNPs for quantitative resistance of the potato (*Solanum tuberosum* L.) to *Phytophthora infestans* causing the late blight disease. *PLoS ONE*. 2016;11(6):e0156254. DOI 10.1371/journal.pone.0156254.
- Muktar M.S., Lübeck J., Strahwald J., Gebhardt C. Selection and validation of potato candidate genes for maturity corrected resistance to *Phytophthora infestans* based on differential expression combined with SNP association and linkage mapping. *Front. Genet.* 2015;6:294. DOI 10.3389/fgene.2015.00294.
- Murphy A., Jong H., Proudfoot K. A multiple disease resistant potato clone developed with classical breeding methodology. *Can. J. Plant Pathol.* 1999;21(3):207-212. <http://dx.doi.org/10.1080/07060669909501183>.
- Novy R., Hanneman R. Hybridization between *Tuberosum* haploids and IEBN wild potato species. *Am. Potato J.* 1991;68(3):151-169. DOI 10.1007/BF02853896.
- Ochoa C. The Potatoes of South America: Peru. CIP. 2004.
- Oerke E.-C., Dehne H.-W. Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection*. 2004;23(4):275-285. DOI 10.1016/j.cropro.2003.10.001.
- Ramakrishnan A.P., Ritland C.E., 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.
- Rietman H., Bijsterbosch G., Cano L.M., Lee H.-R., Vossen J.H., Jacobsen E., Visser R.G.F., Kamoun S., Vleeshouwers V.G.A.A. Qualitative and quantitative late blight resistance in the potato cultivar Sarpo Mira is determined by the perception of five distinct RXLR effectors. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2012;25(7):910-919. DOI 10.1094/MPMI-01-12-0010-R.
- Rodewald J., Trognitz B. *Solanum* resistance genes against *Phytophthora infestans* and their corresponding virulence genes. *Mol. Plant Pathol.* 2013;14(7):740-757. DOI 10.1111/mpp.12036.
- Rodrigues de Paula R.S.R., Pereira Pinto C.A.B., Galvino Costa S.B.F., de Menezes M., dos Reis Figueira A. Resistance of potato clones to necrotic recombinant strains of potato virus Y (PVY). *Ciênc. Agrotec.* 2014;38(4):343-351. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000400004>.
- Rogozina E.V. South-American wild potato species: Ontogenetic patterns and the prospects of breeding deployment. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2005;5:33-41. (in Russian)
- Rogozina E.V., Kolobaev V.A., Khavkin E.E., Kuznetsova M.A., Beke-tova M.P., Sokolova E.A. Interspecific potato hybrids as a resource for late blight resistance genes. *Doklady Rossiyskoy Akademii Selskokhozyaystvennykh Nauk = Proceedings of the Russian Academy of Agricultural Sciences*. 2014;40(1):10-13.
- Ross H. The use of wild *Solanum* species in German potato breeding of the past and today. *Am. Potato J.* 1966;43:63-80.
- Ross H. Seleksiya kartofelya – problemy i perspektivy [Potato breeding: problems and prospects]. Moscow, Agropromizdat, 1989. (in Russian)
- Sarma R., Bhardwaj V., Dalamu D., Kaushik S.K., Singh B.P., Sharma S., Umamaheshwari R., Baswaraj R., Kumar V., Gebhardt C. Identification of elite potato genotypes possessing multiple disease resistance genes through molecular approaches. *Scientia Hort.* 2014;179:201-211. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2014.09.018>.
- Sedova T.S. Interspecific hybridization of some South-American diploid wild and cultivated potato species. *Byulleten VIR = Bulletin of the Institute of Plant Industry (Leningrad)*. 1980;105:34-37. (in Russian)
- Seregina N.I. Crossability of wild potato species with forms of *Solanum tuberosum* L. Sources of Characters Genetically Studied for the Breeding of Most Important Plants in the Nonchernozem Zone of Russia. *Trudy po prikladnoi botanike, genetike i selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 1991;68-73. (in Russian)
- Simakov E.A., Sklyarova N.P., Yashina I.M. Manual of the technologies for potato breeding. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC*. 2006. (in Russian)
- Simko I., Jansky S., Stephenson S., Spooner D. Genetics of resistance to pests and disease. *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives*. Eds. R. Vreugdenhil et al. Amsterdam: Elsevier, 2007;7:117-155.
- Singsit C., Hanneman R. Rescuing abortive inter-EBN potato hybrids through double pollinations and embryo culture. *Plant Cell Rep.* 1991;9(9):475-478. DOI 10.1007/BF00232099.
- Slater A.T., Cogan N.O., Forster J.W. Cost analysis of the application of marker-assisted selection in potato breeding. *Mol. Breeding*. 2013;32(2):299-310. DOI 10.1007/s11032-013-9871-7.
- Slater A.T., Cogan N.O., Forster J.W., Hayes B.J., Daetwyler H.D. Improving genetic gain with genomic selection in autotetraploid potato. *Plant Genome*. 2016;9(3). DOI 10.3835/plantgenome2016.02.0021.
- Slater A.T., Cogan N.O., Hayes B.J., Schultz L., Dale M.F., Bryan G.J., Forster J.W. Improving breeding efficiency in potato using molecular and quantitative genetics. *Theor. Appl. Genet.* 2014;127(11):2279-2292. DOI 10.1007/s00122-014-2386-8.
- Śliwka J., Zimnoch-Guzowska E. Resistance to late blight in potato. *Translational Genomics for Crop Breeding: Biotic Stress*. Vol. 1. Eds. R.K. Varsnhey, R. Tuberosa. John Wiley & Sons, 2013; 221-240.
- Solomon-Blackburn R.M., Barker H. Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a review of traditional and molecular approaches. *Heredity*. 2001;86(1):17-35.
- Spooner D., Ghislain M., Simon R., Jansky S.H., Gavrilenko T. Systematics, diversity, genetics, and evolution of wild and cultivated potatoes. *Bot. Rev.* 2014;80(4):283-383. DOI 10.1007/s12229-014-9146-y.
- Spooner D., Salas A. Structure, biosystematics and genetic resources. *Handbook of Potato, Production, Improvement and Postharvest Management*. Eds. J. Gopal, S.M.P. Khurana. N.Y.: Haworth Press, 2006;1-39.
- Szajko K., Strzelczyk-Żyta D., Marczewski W. *Ny-1* and *Ny-2* genes conferring hypersensitive response to potato virus Y (PVY) in cultivated potatoes: mapping and marker-assisted selection validation for PVY resistance in potato breeding. *Mol. Breeding*. 2014;34:267-271. DOI 10.1007/s11032-014-0024-4.
- The European Cultivated Potato Database. Available at: <https://www.europotato.org/menu> (accessed 20 Sept. 2016).
- Tiwari J.K., Gopal J., Singh B.P. Marker-assisted selection for virus resistance in potato: options and challenges. *Potato J.* 2012;39(2):101-117.
- Tiwari J.K., Siddappa S., Singh B.P., Kaushik S.K., Chakrabarti S.K., Bhardwaj V., Chandel P. Molecular markers for late blight resistance breeding of potato: an update. *Plant Breeding*. 2013;132(3):237-245. DOI 10.1111/pbr.12053.
- Tomczyńska I., Jupe F., Hein I., Marczewski W., Śliwka J. Hypersensitive response to *Potato virus Y* in potato cultivar Sarpo Mira is conferred by the *Ny-Smira* gene located on the long arm of chromosome IX. *Mol. Breeding*. 2014a;34(2):471-480. DOI 10.1007/s11032-014-0050-2.
- Tomczyńska I., Stefańczyk E., Chmielarz M., Karasiewicz B., Kamiński P., Jones J.D.G., Lees A.K., Śliwka J. A locus conferring effective late blight resistance in potato cultivar Sarpo Mira maps to chromosome XI. *Theor. Appl. Genet.* 2014b;127(3):647-657. DOI 10.1007/s00122-013-2248-9.
- Vavilov N.I. Seleksiya kak Nauka [The Theoretical Basis of Plant Breeding]. Moscow, Sel'khozgiz Publ., 1935;1:1-14. (in Russian)
- Vavilova M.A. Using wild frost resistant potato species *S. commerso-*

- nii* Dun. and *S. chomatophilum* Bitt. in interspecific hybridization. Trudy po prikladnoi botanike, genetike i selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. 1978;62(1):123-131. (in Russian)
- Vincent H., Wiersema J., Kell S., Fielder H., Dobbie S., Castañeda-Álvarez N.P., Guarino L., Eastwood R., Leo B., Maxted N. A prioritized crop wild relative inventory to help underpin global food security. Biol. Conservation. 2013;167:265-275. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2013.08.011>.
- Vleeshouwers V.G.A.A., Raffaele S., Vossen J., Champouret N., Oli-va R., Segretin M.E., Rietman H., Cano L.M., Lokossou A., Kes-sel G., Pel M.A., Kamoun S. Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors. Annu. Rev. Phytopathol. 2011;49:507-531. DOI 10.1146/annurev-phyto-072910-095326.
- Vos P.G., Uitdewilligen J.G., Voorrips R.E., Visser R.G., van Eck H.J. Development and analysis of a 20K SNP array for potato (*Solanum tuberosum*): an insight into the breeding history. Theor. Appl. Genet. 2015;128(12):2387-2401. DOI 10.1007/s00122-015-2593-y.
- Yashina I.M. Metodicheskie ukazaniya po tekhnologii upravleniya protsessom introgressii tsennykh genov ot dikikh vidov kartofelya v selektsionnye sorta i gibrity [Manual of the Technologies for Monitoring Introgression of Valuable Genes from Wild Potato Species to Selection Varieties and Hybrids]. Moscow, 2003. (in Russian)
- Yashina I.M., Simakov E.A., Morozova N.N., Derevyagina M.K., Prokhorova O.A., Sklyarova N.A., Zharova V.A., Belov G.L., Us-kov A.I., Varitsev Yu.A., Varitseva G.P. Donory i geneticheskie is-techniki dlya ispol'zovaniya v selektsionnom protsesse kartofelya. Katalog [Catalogue of donors and genetic sources to be employed in potato breeding], Moscow. 2010. (in Russian)
- Yo K.-R., Visser R.G.F., Jacobsen E., Vossen J.H. Characterisation of the late blight resistance in potato differential MaR9 reveals a quali-tative resistance gene, *R9a*, residing in a cluster of *Tm22* homologs on chromosome IX. Theor. Appl. Genet. 2015;128(5):931-941. DOI 10.1007/s00122-015-2480-6.
- Zhitlova N.A. Using experimental polyploidy in potato interspecies hybridization. Genetika = Genetics (Moscow). 1969;5(11):40-44. (in Russian)
- Zimnoch-Guzowska E., Flis B. Evaluation of resistance to *Phytoph-thora infestans*: A survey. Late Blight: Managing the Global Threat: Proc. Global Initiative on Late Blight Conf. Eds. N.E. Adler et al. Hamburg, 2002;37-47.
- Zimnoch-Guzowska E., Tatarowska B. Bottle necks in breeding late blight resistant potato. Plant Breed. Seed Sci. 2004;50(1):71-79.
- Zimnoch-Guzowska E., Yin Z., Chrzanowska M., Flis B. Sources and effectiveness of potato PVY resistance in IHAR's breeding research. Am. J. Potato Res. 2013;90(1):21-27. DOI 10.1007/s12230-012-9289-5.
- Zoteyeva N., Mežaka I., Vilcāne D., Carlson-Nilsson U., Skrabule I., Rostoks N. Assessment of genes *R1* and *R3* conferring resistance to late blight and of gene *Ry_{sto}* conferring resistance to potato virus Y in two wild species accessions and their hybrid progenies. Proc. Latv. Acad. Sci. Sect. B. 2014;68(3/4):133-141.

$S_V S_V$ -линии – эффективный инструмент для вовлечения в селекцию ценного генофонда 1 EBN диплоидных диких видов картофеля

А.П. Ермишин , Ю.В. Полюхович, Е.В. Воронкова, О.Н. Гукасян

Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь

Имеется ряд ценных для селекции диких видов картофеля, в частности 1 EBN мексиканские диплоидные виды, которые практически не скрещиваются с культурным картофелем, включая дигаплоиды *Solanum tuberosum* (2x, 2 EBN), из-за жестких пре- и постзиготных межвидовых репродуктивных барьеров. Для вовлечения в селекцию генофонда этих видов предлагается использовать оригинальные $S_V S_V$ -линии (F_2 дигаплоиды *S. tuberosum* × *S. verrucosum*), у которых S_V -аллели культурного картофеля замещены на S_V от самосовместимого диплоидного вида *S. verrucosum*, не образующего пестичных S-RNаз. Предполагалось, что благодаря наличию в гомозиготном состоянии S-генов, привнесенных от *S. verrucosum*, $S_V S_V$ -линии имеют те же возможности для устранения презиготной несовместимости при межвидовой гибридизации, что и этот дикий вид, однако их использование позволит устранить нежелательные эффекты, связанные с его применением (мужская стерильность гибридов, пониженное клубнеобразование). Целью исследования была оценка эффективности использования $S_V S_V$ -линий (по сравнению с *S. verrucosum*) в качестве посредника для вовлечения в селекцию 1 EBN видов картофеля *S. bulbocastanum*, *S. pinnatisectum* и *S. polyadenium*. Установлено, что $S_V S_V$ -линии превосходят *S. verrucosum* по эффективности гибридизации с 1 EBN видами благодаря обильному и продолжительному цветению в более поздние, по сравнению с *S. verrucosum*, сроки, когда наступает цветение видов-опылителей. Среди гибридов между $S_V S_V$ -линиями и 1 EBN дикими видами было достоверно меньше стерильных и низкофертильных генотипов и больше генотипов со средней и высокой функциональной фертильностью пыльцы. Они обладали более высокой способностью к клубнеобразованию, благодаря чему, в отличие от гибридов на основе *S. verrucosum*, были пригодны для многолетней селекционной оценки в полевых условиях. Полученные межвидовые гибриды удалось скрестить в качестве материнских форм с дигаплоидами *S. tuberosum*.

Ключевые слова: картофель; отдаленная гибридизация; презиготная несовместимость; балансовое число эндосперма – EBN; *S. verrucosum*; $S_V S_V$ -линии.

$S_V S_V$ -lines is an effective tool for involvement of the valuable genepool of 1 EBN diploid potato species into breeding

A.P. Yermishin , Yu.V. Polyukhovich, E.V. Voronkova, O.N. Gukasyan

Institute of Genetics and Cytology of NAS of Belarus, Minsk, Belarus

There is a set of wild potato species valuable for breeding, in particular 1 EBN diploid species from Mexico, which is practically not crossable to cultivated potatoes, including *Solanum tuberosum* dihaploids (2x, 2 EBN), because of strict pre- and postzygotic interspecific reproductive barriers. It is proposed to involve that species germplasm into breeding by using the original $S_V S_V$ -lines (F_2 *S. tuberosum* dihaploids × *S. verrucosum*), in which S_V -alleles have been substituted for S_V from the self-compatible diploid species *S. verrucosum* not producing stylar S-RNase. It was anticipated that $S_V S_V$ -lines have the same ability for elimination of prezygotic incompatibility in interspecific hybridization as *S. verrucosum* due to S-genes of that species in homozygous state. However, their use would help avoid undesirable effects associated with *S. verrucosum* application (male sterility and reduced tuber formation in hybrids). The aim of the research was estimation of the efficiency of using $S_V S_V$ -lines, in comparison with *S. verrucosum*, as a bridge for involvement of the 1 EBN potato species *S. bulbocastanum*, *S. pinnatisectum* and *S. polyadenium* into breeding. It was revealed that $S_V S_V$ -lines excels *S. verrucosum* in hybridization efficacy due to abundant and prolonged flowering in later term than *S. verrucosum*, when flowering of pollinator species occurs. There were significantly less sterile or low fertility genotypes among the hybrids between $S_V S_V$ -lines and 1 EBN wild species. They had higher ability for tuber formation, and so they were suitable for long term field trials, contrast to hybrids with *S. verrucosum*. The interspecific hybrids produced were crossed as female parents to *S. tuberosum* dihaploids.

Kew words: potato; hybridization between distantly related species; prezygotic incompatibility; endosperm balance number – EBN; *S. verrucosum*; $S_V S_V$ -lines.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Ермишин А.П., Полюхович Ю.В., Воронкова Е.В., Гукасян О.Н. $S_V S_V$ -линии – эффективный инструмент для вовлечения в селекцию ценного генофонда 1 EBN диплоидных диких видов картофеля. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(1):42-50. DOI 10.18699/VJ17.222

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Yermishin A.P., Polyukhovich Yu.V., Voronkova E.V., Gukasyan O.N. $S_V S_V$ -lines is an effective tool for involvement of the valuable genepool of 1 EBN diploid potato species into breeding. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):42-50. DOI 10.18699/VJ17.222

Одно из важных направлений в селекции картофеля – использование генофонда диких видов с целью расширения аллельного разнообразия культурного картофеля, интрогрессии новых генов устойчивости к болезням и вредителям. Большинство диплоидных южноамериканских диких и примитивных культурных видов картофеля хорошо скрещиваются с дигаплоидами ($2n = 2x = 24$) *Solanum tuberosum*. Применение беккрасса и отбора на диплоидном уровне позволяет эффективно осуществлять интрогрессию генов диких видов в селекционный материал, а с помощью мейотического удвоения хромосом переносить их на тетраплоидный уровень (Jansky et al., 1990). Однако имеется ряд ценных для селекции диких видов картофеля, в частности группа мексиканских диплоидных видов из секций *Bulbocastana*, *Pinnatisecta*, *Polyadenia*, которые практически не скрещиваются с культурным картофелем, включая дигаплоиды *S. tuberosum*.

Проблемы получения межвидовых гибридов с их участием связаны прежде всего с гибелью гибридных зародышей вследствие недоразвития эндосперма, что объясняют различиями их эффективной плоидности (EBN – балансового числа эндосперма), равной 1 EBN, и эффективной плоидности дигаплоидов (2 EBN). В соответствии с плоидностью и EBN виды картофеля объединены по группам скрещивания: $2x$ (1 EBN), $2x$ (2 EBN), $3x$ (2 EBN), $4x$ (2 EBN), $4x$ (4 EBN) и $6x$ (4 EBN). Для успешной гибридизации EBN родительских форм должны совпадать (Johnston, Hanneman, 1980, 1982; Carputo et al., 1999; Hanneman, 1999). Кроме того, для диплоидных видов картофеля из Мексики при гибридизации их с дигаплоидами *S. tuberosum* характерны также презиготные барьеры несовместимости, которые проявляются в виде ингибирования роста пыльцевых трубок в пестике (Маханько, 2008).

Методы преодоления названных межвидовых репродуктивных барьеров с целью интрогрессии в селекционный материал ценного генофонда 1 EBN диплоидных видов картофеля (Hermesen, Ramanna, 1973; Bamberg, 1990; Cardi et al., 1993; Carputo et al., 1997; Nyman, Waara, 1997; Thieme et al., 1997; Helgeson et al., 1998; и др.) технически сложные и в большинстве случаев неэффективные.

Разработанная нами технология вовлечения в селекцию 1 EBN видов картофеля основана на гипотезе, согласно которой в пыльце или среди яйцеклеток некоторых образцов этих видов наряду с нормальными 0.5 EBN гаметами может присутствовать небольшое количество нетипичных 1 EBN (но нормальной плоидности – n) гамет. Причинами того, что гибридные семена в интер-EBN скрещиваниях не завязываются или завязываются очень редко, могут быть низкая частота нетипичных гамет, низкая функциональная фертильность пыльцы опылителей, презиготная межвидовая несовместимость, преждевременное осыпание или недоразвитие малосемянных ягод. Устранение или минимизация названных факторов, препятствующих достижению завязи пыльцевыми трубками нетипичных гамет, позволило нам получить сравнительно большое количество гибридных семян между видом-посредником *S. verrucosum* ($2x$, 2 EBN) и рядом 1 EBN видов. Гибриды относительно легко скрещивались с дигаплоидами *S. tuberosum* ($2x$, 2 EBN), что открывает возможность

эффективной интрогрессии ценных генов 1 EBN видов в селекционный материал (Полухович и др., 2011; Yermishin et al., 2011, 2014).

Среди факторов, обеспечивших успех проведенной гибридизации, на наш взгляд, наибольшее значение имело использование для устранения презиготной несовместимости дикого диплоидного вида картофеля *S. verrucosum*.

У картофеля презиготные барьеры имеют место как при внутривидовых, так и при межвидовых скрещиваниях. Для диплоидных видов *Solanum* характерна система однолокусной гаметофитной самонесовместимости, связанная с функционированием *S*-локуса, который может быть представлен у конкретного генотипа разными аллелями. Продуктами пестичного компонента *S*-локуса являются гликопротеины, имеющие рибонуклеазную активность (*S*-РНКазы). *S*-РНКазы могут свободно проникать в цитоплазму пыльцевых трубок и, действуя как ингибитор процесса трансляции, останавливать их рост. Этот своеобразный барьер могут преодолеть лишь те пыльцевые трубки, которые содержат определенные продукты, способные дезактивировать соответствующие РНКазы (Ермишин, 2001).

Дикий диплоидный вид картофеля из Мексики *S. verrucosum* в систематическом отношении близок южноамериканским видам картофеля, в том числе *S. tuberosum* (Hawkes, 1990). Однако в отличие от большинства диплоидных видов картофеля он является самосовместимым, т.е. способен завязывать семена при самоопылении. Как и для многих самосовместимых видов, для *S. verrucosum* характерна односторонняя несовместимость: он легко завязывает семена в скрещиваниях с 2 EBN диплоидными видами картофеля в качестве материнской формы и практически не завязывает семян в таких скрещиваниях при использовании его в качестве опылителя, несмотря на высокую, как правило, функциональную фертильность пыльцы.

При изучении механизмов односторонней межвидовой несовместимости с участием *S. verrucosum* было установлено, что самосовместимость некоторых образцов этого вида обусловлена отсутствием в пестиках *S*-РНКаза (Eijlander, 1998). Известно, что при опылении *S. verrucosum* не только собственной пылью, но и пылью других видов картофеля, в том числе имеющих 1 EBN, не наблюдается ингибирования роста пыльцевых трубок, и они в большом количестве могут достигать семязпочки (Hermesen, Ramanna, 1976). Впервые на связь этого свойства *S. verrucosum* с отсутствием у него пестичных *S*-РНКаза и наличием видоспецифического аллеля *S*-гена – *S_v* – было указано в нашей работе (Ермишин, 2001).

В литературе имеется ряд сообщений об использовании (с разной долей успеха) *S. verrucosum* в качестве посредника для вовлечения в селекцию ценного генофонда 1 EBN диплоидных диких видов картофеля (Hermesen, Ramanna, 1976; Камераз и др., 1982; Dinu et al., 2005; Jansky, Hamernik, 2009; Полухович и др., 2011; Yermishin et al., 2014). Также показана высокая эффективность этого вида для преодоления односторонней несовместимости, характерной для гибридизации между *S. tuberosum* и дикими тетраплоидными видами картофеля *S. acaule* и *S. stoloniferum* (Полухович и др., 2013).

Отмечая высокую значимость *S. verrucosum* как ценного вида-посредника для вовлечения в селекцию генофонда диких видов картофеля, называют и его недостатки. Большинство растений межвидовых гибридов мужски стерильны по причине взаимодействия чувствительной цитоплазмы *S. verrucosum* с ядерными генами видов картофеля, которые используют в качестве опылителей (Abdalla, Hermesen, 1972). Мужски фертильные гибриды сложно вовлечь в скрещивания с культурным картофелем из-за односторонней межвидовой несовместимости. Все это существенно затрудняет их использование в селекционном процессе.

Для устранения названных недостатков *S. verrucosum* нами предложено использовать в скрещиваниях с 1 EBN дикими диплоидными видами картофеля не этот вид, а S_vS_v -линии *S. tuberosum*, которые представляют собой дигаплоиды *S. tuberosum*, у которых S_t -аллели культурного картофеля замещены на S_v от *S. verrucosum* (Ермишин, 2001). Благодаря наличию в гомозиготном состоянии S -генов (S_vS_v), привнесенных от *S. verrucosum*, S_vS_v -линии не образуют пестичных РНКаз. Следовательно, можно предположить, что они имеют те же возможности для устранения презиготной несовместимости, что и *S. verrucosum*.

Создание S_vS_v -линий – непростая задача из-за выраженной односторонней несовместимости при гибридизации между *S. verrucosum* и дигаплоидами *S. tuberosum*. Тем не менее нам удалось выявить так называемые акцепторные генотипы *S. tuberosum* (способные скрещиваться с *S. verrucosum* в качестве материнских форм) и отобрать в F_2 полученных гибридов *S. tuberosum* × *S. verrucosum* гомозиготы S_vS_v (S_vS_v -линии) (Ермишин и др., 2003; Полюхович и др., 2010).

Целью настоящего исследования была оценка эффективности использования S_vS_v -линий (по сравнению с *S. verrucosum*) в качестве посредника для вовлечения в селекцию генофонда 1 EBN видов картофеля.

Материалы и методы

Для сравнения эффективности использования S_vS_v -линий и *S. verrucosum* в качестве посредников для вовлечения в селекцию 1 EBN диплоидных диких видов картофеля, гибридизацию с их участием и испытания полученных гибридов проводили параллельно в сопоставимых условиях среды (Минск, 2009–2011 гг.).

В качестве материнских форм использовали 12 образцов *S. verrucosum* и 24 S_vS_v -линии. Последние – гибриды F_2 , полученные в результате самоопыления и сестринских скрещиваний F_1 между полученным нами первичным дигаплоидом IGC 98/109.5 мексиканского сорта Nortena и образцами *S. verrucosum*. В качестве опылителей выступали мужски фертильные образцы диплоидных 1 EBN видов картофеля *S. bulbocastanum*, *S. pinnatisectum* и *S. polyadenium*. Семена этих диких видов, как и семена *S. verrucosum*, были получены из Национального генбанка США по картофелю NRSP-6. В работе использованы следующие образцы: *S. verrucosum* – PI 190170, PI 195171, PI 195172, PI 275256, PI 275257, PI 310966, PI 498010, PI 570643, PI 570644, PI 570645, PI 545745, PI 498060; *S. bulbocastanum* – PI243505, PI243506,

PI243512, PI243513, PI255516, PI275191, PI275192, PI498011; *S. pinnatisectum* – PI275231–275236, PI537023; *S. polyadenium* – PI230480, PI275238, PI347770, PI498036.

Для проведения гибридизации растения родительских форм выращивали при естественном освещении (летний период 2009 и 2010 гг.) на участке, расположенном между двумя теплицами и оборудованном устройством для мелкокапельного полива. Семена проращивали в плошках с торфогрунтом в конце апреля–начале мая, предварительно замочив на 12 ч в водном растворе гиббереллина (GA_3 , 100 мг/л). Рассаду с пятью-шестью настоящими листьями высаживали на участке 15–20 мая. Сеянцы выращивали в гребнях, расстояние между гребнями 70 см, между растениями – 50 см. В 2009 г. условия были очень благоприятными для скрещиваний: в течение всего вегетационного периода стояла умеренно теплая погода с частыми дождями. В начале периода скрещиваний 2010 г. также были благоприятные условия, однако затем последовали продолжительные экстремально высокие температуры (более 30 °C), что привело к резкому снижению фертильности опылителей.

Для предотвращения самоопыления перед гибридизацией проводили кастрацию цветков материнских образцов (нераскрывшиеся бутоны). Распустившиеся цветки опылителей собирали на пике цветения, подсушивали 1 сут при комнатной температуре, затем вытряхивали из них пыльцу с помощью электрического вибратора. В скрещиваниях использовали только свежесобранную пыльцу. Перед проведением гибридизации оценивали функциональную фертильность пыльцы (ФФП) путем определения частоты прорастания пыльцевых зерен за 2 ч при 25 °C на питательной среде, содержащей сахарозу (200 г/л), H_3BO_3 (100 мг/л), $Ca(NO_3)_2 \times 4H_2O$ (300 мг/л), $MgSO_4 \times 7H_2O$ (200 мг/л), KNO_3 (100 мг/л); pH 5.5 (Pallais et al., 1984). Учитывали по 300 пыльцевых зерен с образца в нескольких полях зрения микроскопа (увеличение 600×). ФФП рассчитывали как отношение числа проросших пыльцевых зерен к общему числу пыльцевых зерен, помноженное на 100 %. В скрещиваниях использовали смесь пыльцы фертильных образцов одного вида.

У полученных семян межвидовых гибридов в 2010–2011 гг. оценивали всхожесть, а у выращенных из семян сеянцев – ФФП, способность к клубнеобразованию (доля сеянцев комбинации скрещивания, сформировавших клубни; масса клубней с растения; количество клубней с растения; средняя масса одного клубня) и скрещиваемость с фертильными дигаплоидами *S. tuberosum*. Оценка способности к клубнеобразованию у межвидовых гибридов проводилась в течение двух лет: в 2010 г. сеянцы выращивались в горшках с торфом на участке, расположенном между двумя теплицами и оборудованном устройством для мелкокапельного полива; в 2011 г. клубни, образовавшиеся в предыдущий год, были высажены в поле. Гибриды, формировавшие наиболее мелкие клубни, перед высадкой в поле подращивали в горшочках с торфом до рассады размером 20–25 см. Клубни диаметром более 15 мм высаживали непосредственно в поле. При гибридизации межвидовых гибридов в качестве опылителей использовали вторичные дигаплоиды *S. tuberosum* с высокой функциональной фертильностью пыльцы: IGC 01/60.5;

IGC 01/62.10; IGC 01/63.28, IGC 01/64.6, выделенные нами в результате специальной селекции на фертильность (Лукша и др., 2010).

Для детекции в межвидовых гибридах локусов ДНК, интрогрессированных от мексиканских диплоидных 1 EBN видов и связанных с наличием у них фрагментов генома этих видов, использовали ПЦР-маркеры RB629 и SolBCOSII-5₄₅₉, разработанные лабораторией ДНК-маркеров растений ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии (Москва). По данным (Pankin et al., 2011), SCAR-маркер RB629 области экзона гена *Rpi-blb1* устойчивости к фитофторозу *S. bulbocastanum* характерен для мексиканских 1 EBN диплоидных видов. SCAR-маркер SolBCOSII-5₄₅₉ применяется в филогенетических исследованиях для детекции генома В аллотетраплоидных диких видов картофеля, а также родственных геномов мексиканских 1 EBN диплоидных видов, в том числе *S. bulbocastanum*, *S. pinnatisectum* и др. (Соколова и др., 2013). ДНК выделяли из листьев семян с использованием наборов DNA purification Kit (фирма Thermo Scientific, EU) в соответствии с рекомендациями производителя. Амплификацию ДНК осуществляли на автоматическом программируемом термоциклере GeneAmp System 2700 (фирма PE Applied Biosystems, США). Программа ПЦР для праймеров, различающих последовательность RB629: начальная денатурация в течение 3 мин при 94 °C; далее 35 циклов по 30 с при 94 °C, 30 с при 65 °C и 2 мин при 72 °C; финальная элонгация в течение 7 мин при температуре 72 °C. Программа ПЦР для праймеров, различающих последовательность SolBCOSII-5₄₅₉: начальная денатурация в течение 3 мин при 94 °C; далее 35 циклов по 20 с при 94 °C, 40 с при 65 °C и 1 мин 30 с при 72 °C; финальная элонгация в течение 5 мин при температуре 72 °C.

Для статистической обработки данных использовали критерий *t* Стьюдента при сравнении показателей, выраженных в виде средних арифметических, и метод χ^2 – при сравнении показателей, представленных в виде частот.

Результаты

Средняя функциональная фертильность смеси пыльцы использованных в работе диких видов картофеля составила: 67.9 % у *S. polyadenium*, 53.7 % у *S. bulbocastanum* и 48.4 % у *S. pinnatisectum*. Это очень высокие показатели; наш опыт показывает, что хорошие результаты в скрещиваниях диплоидного картофеля получают при ФФП более 10 %.

Наиболее высокая скрещиваемость S_vS_v -линий установлена с *S. pinnatisectum* (получено 3 125 семян, 45.3 семени на опыление). Эффективность гибридизации с другими видами была несколько ниже: 37.3 семени на опыление в скрещиваниях с *S. bulbocastanum* и 30.3 семени на опыление в скрещиваниях с *S. polyadenium* (табл. 1). Раньше других 1 EBN видов в условиях опыта цвели растения *S. pinnatisectum*. В ходе выполнения последующих скрещиваний было уже видно, какие растения из использованных в работе гибридов F_2 дигиплоиды *S. tuberosum* × *S. verrucosum* завязывают ягоды после опыления пыльцой этого вида. Они преимущественно и опылялись далее пыльцой *S. bulbocastanum* и *S. polyadenium*. Очевидно, линии, которые завязывали менее 20 семян на опыление, на основании результатов проведенных нами

ранее исследований роста пыльцевых трубок диких видов в пестиках гибридов (Полюхович и др., 2010) могут быть отнесены к гетерозиготам S_vS_v . Линии, которые не завязывали семян, являются гомозиготами S_vS_v (в табл. 1 не приведены и не учитывались при вычислении эффективности гибридизации), а линии, которые завязывали более 20 семян на опыление, скорее всего, являются гомозиготами S_vS_v .

Сопоставление данных табл. 1 по скрещиваемости S_vS_v -линий с 1 EBN дикими диплоидными видами *S. bulbocastanum*, *S. pinnatisectum* и *S. polyadenium* и скрещиваемости *S. verrucosum* с этими видами (Yermishin et al., 2014) (см. табл. 1, последняя строка) указывает на преимущество первых. Во всех случаях эффективность гибридизации при использовании в качестве материнских форм S_vS_v -линий была выше (статистически достоверные различия отмечены для скрещиваний с *S. pinnatisectum*, а также в целом для всех использованных 1 EBN видов). У S_vS_v -линий удалось опылить значительно больше цветков, чем у образцов *S. verrucosum*, и получить в результате значительно больше гибридных семян.

Большинство семян, полученных в результате гибридизации S_vS_v -линий с 1 EBN дикими видами, обладало высокой выполненностью и жизнеспособностью, их всхожесть в среднем составила 66 % (табл. 2). По этому показателю они превосходили гибриды между *S. verrucosum* и 1 EBN дикими диплоидными видами *S. bulbocastanum* и *S. polyadenium*. Семена *S. verrucosum* × *S. pinnatisectum* имели более высокую всхожесть (88 %), чем семена соответствующих гибридов с участием S_vS_v -линий.

В большинстве случаев растения межвидовых гибридов по внешнему виду были ближе к материнской форме. Тем не менее среди них встречались образцы со звездчатой формой венчика, присущей примитивным *Stellata*, и строением листовой пластинки, характерной для диких видов, использованных в качестве опылителей. Детекция ДНК-маркеров, специфичных для генома В 1 EBN диплоидных диких видов, показала их наличие у большей части проанализированных гибридов (см. рисунок). С их помощью подтверждено гибридное происхождение всех 15 проанализированных гибридов S_vS_v -линии × *S. bulbocastanum*, 11 из 12 изученных гибридов *S. verrucosum* × *S. pinnatisectum* и 15 из 16 гибридов S_vS_v -линии × *S. pinnatisectum*.

Среди гибридов между S_vS_v -линиями и 1 EBN дикими видами было достоверно меньше стерильных и низкофертильных генотипов и больше генотипов со средней и высокой функциональной фертильностью пыльцы по сравнению с соответствующими гибридами на основе *S. verrucosum* (см. табл. 2).

Межвидовые гибриды, полученные при использовании в качестве материнских форм S_vS_v -линий, заметно превосходили аналогичные гибриды на основе *S. verrucosum* по всем показателям клубнеобразования на уровне как семян, так и первой клубневой репродукции (исключение – семена гибридов с *S. polyadenium* по процентному содержанию генотипов, формирующих клубни) (табл. 3).

Как видно из табл. 4, гибриды на основе S_vS_v -линий, как и гибриды на основе *S. verrucosum*, в целом достаточно просто вовлекались в гибридизацию с дигиплоидами *S. tuberosum* в качестве материнских форм, хотя эффек-

<i>S_vS_v</i> -line (<i>S. verrucosum</i>)	Males									Mean Seeds/ pollination
	<i>S. bulbocastanum</i>			<i>S. pinnatisectum</i>			<i>S. polyadenium</i>			
	Pollina- tions	Seeds	Seeds / pollination	Pollina- tions	Seeds	Seeds / pollination	Pollina- tions	Seeds	Seeds / pollination	
IGC08/169.2	3	174	58	3	172	57.5	—*	—	—	57.6
IGC08/169.3	4	42	10.5	3	150	50	3	140	46.6	33.2
IGC08/169.4	—	—	—	4	20	5	6	40	6.6	6
IGC08/169.5	5	92	23	—	—	—	7	172	24.6	22
IGC08/169.6	3	117	39	2	0	0	4	187	46.8	33.8
IGC08/169.7	4	208	52	7	89	12.7	5	55	11	22
IGC08/170.2	4	0	0	7	323	46.1	4	251	62.8	38.3
IGC08/170.3	6	555	92.5	7	575	82.1	7	100	14.3	61.5
IGC08/170.4	—	—	—	5	227	45.4	4	295	73.8	58
IGC08/170.5	—	—	—	5	521	104.2	5	156	31.2	67.7
IGC08/170.6	4	113	28.3	3	235	78.3	5	45	9	32.8
IGC08/172.2	2	37	18.5	1	16	16	—	—	—	17.7
IGC08/172.5	—	—	—	3	330	110	—	—	—	110
IGC08/172.6	—	—	—	3	133	44.3	3	52	17.3	30.8
IGC08/172.7	—	—	—	3	91	30.3	5	266	53.2	44.6
IGC08/173.1	—	—	—	4	32	8	—	—	—	8
IGC08/173.2	—	—	—	3	31	10.3	—	—	—	10.3
IGC08/173.3	3	82	27.3	2	0	0	—	—	—	16.4
Total/mean	38	1420	37.3±8.9	65	2945	45.3±8.3**	58	1759	30.3±6.5	38.0±4.6**
<i>S. verrucosum</i> (by Yermishin et al., 2014)	13	270	20.7±7.7	35	154	4.4±3.3	8	147	18.4±12.4	10.1±3.4

** Excess of the corresponding character over the analogous hybrid (*S₁S₂*-line or *S. verrucosum* as a female) is significant at $p < 0.01$.

нить значительно больший, по сравнению с *S. verrucosum*, объем скрещиваний и получить намного больше гибридных семян (см. табл. 1).

Результаты гибридизации $S_v S_v$ -линий с 1 EBN дикими видами картофеля подтвердили предположение о ведущей роли S_v -генов в преодолении межвидовой презиготной несовместимости. Хотя точную числовую оценку расщепления гибридов F_2 дигаметоиды $S. tuberosum \times S. verrucosum$ по способности завязывать семена в скрещиваниях с 1 EBN видами сделать невозможно (поскольку скрещивания проводились в разное время), несложно заметить его сходство с наблюдавшимся при анализе степени роста пыльцевых трубок 1 EBN видов в пестиках аналогичных гибридов F_2 (Полюхович и др., 2010).

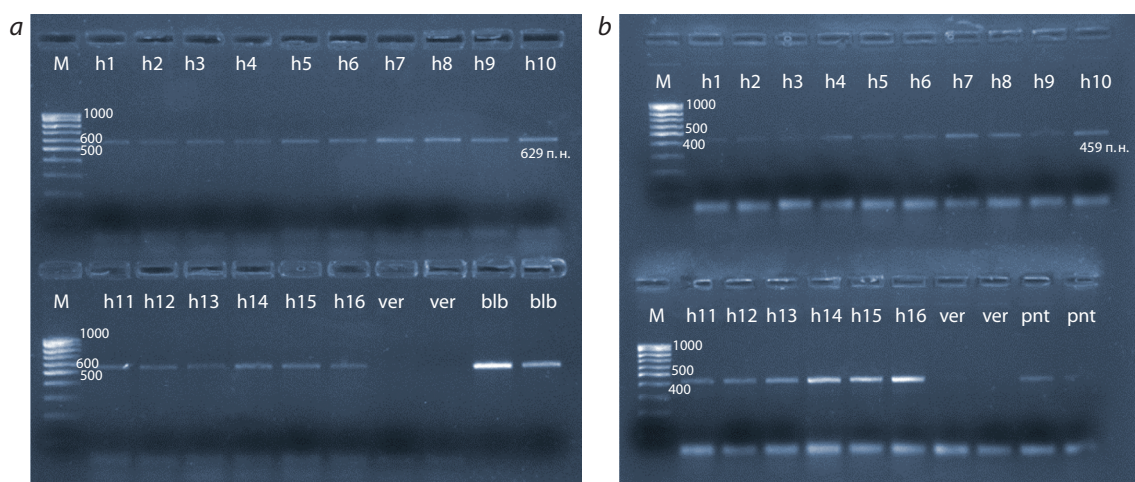
Большинство семян, полученных в результате гибридизации $S_v S_v$ -линий, как и *S. verrucosum*, с 1 EBN дикими видами, обладали высокой выполненностью и жизнеспособностью. По показателю всхожести они превосходили гибриды между *S. verrucosum* и 1 EBN дикими диплоидными видами (только семена *S. verrucosum* $\times$ *S. pinna-*

Table 2. Seed germination and male fertility of F₁ hybrids between *S_vS_v*-lines and 1 EBN wild diploid potato species and of F₁ hybrids between *S. verrucosum* and 1 EBN wild diploid potato species

Hybrids	Seed germination, %	Number of plants studied	PFF, %	Percentages of plants belonging to different PFF classes		
				Sterile and low fertility (PFF < 2)	Moderate (2.1 < PFF < 10)	high fertility (PFF > 10)
Hybrids F ₁ S _v S _v -lines × 1 EBN wild diploid potato species						
S _v S _v -lines × <i>S. bulbocastanum</i>	77.0* χ ² = 3.87	151	8.6	25.8	40.4	33.8
S _v S _v -lines × <i>S. pinnatisectum</i>	66.7	171	7.7	38.0	28.1	33.9
S _v S _v -lines × <i>S. polyadenium</i>	67.6	80	12.5	13.8	35.0** χ ² = 7.7	51.3
Mean	66.6	402	9.6	28.6	34.1* χ ² = 4.7	37.3
Hybrids F ₁ <i>S. verrucosum</i> × 1 EBN wild diploid potato species (by Yermishin et al., 2014)						
<i>S. verrucosum</i> × <i>S. bulbocastanum</i>	50.0	18	7.1	55.6* χ ² = 4.9	22.2	22.2
<i>S. verrucosum</i> × <i>S. pinnatisectum</i>	88.1	23	9.0	34.8	30.4	34.8
<i>S. verrucosum</i> × <i>S. polyadenium</i>	46.4	22	6.1	63.6** χ ² = 17.5	0	36.4
Mean	59.5	63	7.4	50.8** χ ² = 8.4	17.5	31.8

* Excess of the corresponding character against the analogous hybrid (*S_vS_v*-line or *S. verrucosum* as a female) is significant at $p < 0.05$.

** $p < 0.01$.



The occurrence of markers typical for genome B of 1 EBN diploid potato species in DNA of interspecific hybrids: (a) hybrids *S_vS_v*-lines × *S. bulbocastanum*, marker RGA2₆₂₉; (b) hybrids *S_vS_v*-lines × *S. pinnatisectum*, marker SolBCOSII-5₄₅₉.

The markers are present in 1 EBN parental species (designated as blb and pnt) and in interspecific hybrids (h1, h2, h3...) but absent from the 2 EBN diploid species *S. verrucosum* (ver), which possesses genome A, like *S. tuberosum*.

tisectum имели более высокую всхожесть). Образование выполненных семян обычно связывают с формированием нередуцированных гамет у родителя с более низким EBN (Carputo et al., 1999). При этом в семени восстанавливается баланс эндосперма, но зародыш становится триплоидным (при скрещивании диплоидов), что приводит к стерильности межвидовых гибридов. Полученные в настоящем исследовании межвидовые гибриды были в основной массе диплоидными. В пользу этого говорит их высокая

фертильность, а также результаты подсчета числа хромосом у ряда гибридов на основе *S. verrucosum* (Yermishin et al., 2014). В литературе описаны и другие случаи получения выполненных семян, имеющих диплоидный зародыш, в частности при гибридизации *S. verrucosum* с 1 EBN видами (Hermsen, Ramanna, 1976; Jansky, Hamernik, 2009). На наш взгляд, образование таких семян подтверждает гипотезу о формировании 1 EBN видами нетипичных 1 EBN гамет (Yermishin et al., 2011).

Hybrids	2010 (seedlings)			2011 (the first tuber generation)			Number of tubers/plant	Mean tuber weight, g
	Number of hybrids studied	Tuber formation, %	Tuber weight/plant, g	Number of hybrids studied	Tuber formation, %	Tuber weight/plant, g		
1. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
2. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
3. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
4. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
5. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
6. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
7. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
8. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
9. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
10. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
11. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
12. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
13. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
14. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
15. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
16. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
17. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
18. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
19. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
20. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
21. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
22. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
23. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
24. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
25. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
26. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
27. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
28. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
29. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
30. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
31. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
32. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
33. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
34. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
35. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
36. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
37. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
38. <i>Agrotis</i> × <i>Agrotis</i>	10	100	1.2	10	100	1.5	10	1.2
39. <i>Agrotis</i> × <i>Agrot</i>								

*Excess of the corresponding character over the analogous hybrid ($\zeta_v\zeta_v$ -line or *S. verrucosum* as a female) is significant at $p < 0.05$.
 ** $p < 0.01$.

Females	Pollinations	Berries	Berry set, %	Seeds	Seeds/berry	Seeds/ pollination
---------	--------------	---------	--------------	-------	-------------	--------------------

* Excess of the corresponding character over the analogous hybrid ($s_v s_v$ -line or *S. verrucosum* as a female) is significant at $p < 0.05$.

** $p < 0.01$

в качестве материнских форм, является их характерной особенностью (Abdalla, Hermesen, 1972, 1973). Она считается результатом взаимодействия специфического плазмона *S. verrucosum* и плазмон-чувствительных ядерных генов многих видов картофеля. В работе (Abdalla, Hermesen, 1973) на основании формирования всеми полученными гибридами с *S. verrucosum* стерильной пыльцы

было сделано заключение, что названные гены у диких видов картофеля находятся в гомозиготном состоянии. В нашем исследовании по гибридизации *S. verrucosum* с 1 EBN дикими видами, несмотря на получение большого количества стерильных генотипов, были выявлены и фертильные гибриды (Yermishin et al., 2014). О получении мужски фертильных гибридов на основе *S. verrucosum* сообщалось также в работах (Камераз и др., 1982; Jansky, Hamernik, 2009). По-видимому, плазмон-чувствительные ядерные гены могут быть представлены у диких видов картофеля не только в гомозиготном, но и в гетерозиготном состоянии.

Использование в межвидовых скрещиваниях вместо *S. verrucosum* S_vS_v -линий, имеющих цитоплазму *S. tuberosum*, позволяет в значительной мере решить рассматриваемую проблему. Мужская фертильность межвидовых гибридов расширяет возможности их беккроссирования культурным картофелем: их можно использовать в качестве опылителей в скрещиваниях с акцепторными генотипами дигаплоидов *S. tuberosum* или S_vS_v -линиями. Мужская фертильность диплоидного селекционного материала является обязательным условием успешного применения мейотического удвоения хромосом при его переводе на тетраплоидный уровень.

Межвидовые гибриды между S_vS_v -линиями и 1 EBN видами картофеля заметно превосходили аналогичные гибриды на основе *S. verrucosum* по способности к клубнеобразованию, размеру и урожаю клубней. Следовательно, требуется меньше поколений беккрасса культурным картофелем, чтобы получить продвинутый селекционный материал (элиминировать нежелательные признаки диких видов). Благодаря этому свойству оказалось возможным проведение трехлетней оценки полевой устойчивости полученных межвидовых гибридов к фитофторозу (гибриды на основе *S. verrucosum* удалось оценить в течение только одного года). В результате выделен ряд ценных для селекции клонов со стабильно высокой устойчивостью к этому заболеванию (Воронкова и др., 2013). Дальнейшее улучшение S_vS_v -линий путем повторных скрещиваний с дигаплоидами культурного картофеля в сочетании с самоопылением (или сестринскими скрещиваниями) и отбором S_vS_v -гомозигот позволит значительно повысить клубнеобразование у них и у межвидовых гибридов.

Успех интрогрессии ценного генофонда 1 EBN видов в селекционный материал определяется не только получением межвидовых гибридов, но и возможностью их беккроссирования культурным картофелем. В свете рассмотренных выше взглядов на природу презиготной межвидовой несовместимости гибриды между *S. verrucosum* или S_vS_v -линиями и 1 EBN видами картофеля должны с трудом скрещиваться с дигаплоидами *S. tuberosum*. Поскольку они являются гетерозиготами по *S*-генам, в их пестиках будет образовываться *S*-РНКаза дикого вида, использованного в качестве опылителя, которая может ингибировать рост пыльцевых трубок *S. tuberosum*. Так, по этой причине не скрещивались с сортами картофеля тетраплоидные соматические гибриды *S. tuberosum* + *S. bulbocastanum* (Ермишин и др., 2006).

В настоящем исследовании удалось скрестить с дигаплоидами межвидовые гибриды на основе как *S. verru-*

cosum, так и S_vS_v -линий. Это подтвердило их диплоидный статус и способность образовывать 1 EBN гаметы. Очевидно, аллель S_v может каким-то образом существенно снижать активность функционирующего *S*-аллеля дикого вида у гетерозигот межвидовых гибридов. В пользу этого говорят приведенные выше данные о получении S_vS_v -линий в результате самоопыления гибридов F_1 дигаплоиды *S. tuberosum* × *S. verrucosum* (они были самосовместимыми) и о росте пыльцевых трубок 1 EBN видов в пестиках гибридов F_2 (в пестиках предполагаемых гетерозигот S_vS_v наблюдали промежуточную скорость роста пыльцевых трубок) (Полюхович и др., 2010). S.H. Jansky, A.J. Hamernik (2009) удалось скрестить с дигаплоидами *S. tuberosum* один из полученных ими гибридов *S. verrucosum* × *S. cardiophyllum* и 9 из 10 гибридов *S. verrucosum* × *S. commersonii*, а также беккроссировать большинство межвидовых гибридов *S. verrucosum* (в качестве опылителя). Неудача в скрещиваниях между гибридами *S. verrucosum* × *S. bulbocastanum* и дигаплоидами *S. tuberosum* (Hermesen, Ramanna, 1976), по-видимому, связана с недостаточно высокой функциональной фертильностью пыльцы использованных генотипов *S. tuberosum*.

Таким образом, проведенное исследование показало, что S_vS_v -линии не уступают *S. verrucosum* по эффективности использования в качестве посредников для вовлечения в селекцию ценного генофонда 1 EBN диких видов картофеля, а по ряду показателей его превосходят. S_vS_v -линии лучше подходят для скрещиваний благодаря обильному и продолжительному цветению в более поздние, по сравнению с *S. verrucosum*, сроки, когда наступает цветение 1 EBN диких видов. Гибриды на основе S_vS_v -линий более удобны для последующего использования в селекции, чем гибриды с *S. verrucosum*. Высокая мужская фертильность отдельных межвидовых гибридов расширяет возможности их беккроссирования культурным картофелем. Такие гибриды можно использовать в качестве опылителей в скрещиваниях с акцепторными генотипами дигаплоидов *S. tuberosum* или S_vS_v -линиями, появляется возможность перевода беккроссов на тетраплоидный уровень с помощью мейотического удвоения хромосом (при условии образования $2n$ гамет). Они несут больше признаков культурного картофеля, в частности обладают более высокой способностью к клубнеобразованию. Следовательно, требуется меньше поколений беккрасса культурным картофелем, чтобы получить продвинутый селекционный материал на их основе. Благодаря лучшей приспособленности к условиям длинного дня можно проводить полевую оценку межвидовых гибридов на основе S_vS_v -линий по продуктивности, устойчивости к фитофторозу, другим признакам, не опасаясь утратить их из-за пониженного клубнеобразования. Помимо возможности использовать S_vS_v -линии в качестве посредников для вовлечения в селекцию 1 EBN диких видов картофеля, их создание имеет большое самостоятельное значение, поскольку они представляют собой исходный материал, несущий гены ценного мексиканского диплоидного вида *S. verrucosum*, редко используемого в селекции из-за односторонней несовместимости и цитоплазматической мужской стерильности.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abdalla M.M., Hermesen J.G.Th. Plasmons and male sterility types in *Solanum verrucosum* and its interspecific hybrid derivatives. *Euphytica*. 1972;21:209-220.
- Abdalla M.M., Hermesen J.G.Th. An evaluation of *Solanum verrucosum* Schlecht. for its possible use in potato breeding. *Euphytica*. 1973;22:19-27.
- Bamberg J.B. A practical method for making wild potato germplasm from Mexico accessible for evaluation and utilization. *Am. Potato J.* 1990;67:539.
- Cardi T., D'Ambrosio F., Consoli D., Puite K.J., Ramulu K.S. Production of somatic hybrids between frost resistant *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*. *Theor. Appl. Genet.* 1993;87:193-200.
- Carputo D., Barone A., Cardi T., Sebastiano A., Frusciante L., Peloquin S.J. Endosperm Balance Number manipulation for direct *in vivo* germplasm introgression to potato from a sexually isolated relative (*Solanum commersonii* Dun.). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997;94(22):12013-12017.
- Carputo D., Monti L., Werner J.E., Frusciante L. Uses and usefulness of endosperm balance number. *Theor. Appl. Genet.* 1999;98:478-484.
- Dinu I.I., Hayes R.J., Kynast R.G., Phillips R.L., Thill C.A. Novel inter-series hybrids in *Solanum*, section *Petota*. *Theor. Appl. Genet.* 2005;110(3):403-415.
- Eijlander R. Mechanisms of self-incompatibility and unilateral incompatibility in diploid potato (*Solanum tuberosum* L.). NL: Wageningen Agricult. Univ., 1998.
- Hanneman R.E., Jr. The reproductive biology of the potato and its implication for breeding. *Potato Res.* 1999;42:283-312.
- Hawkes J.C. The Potato. Evolution, Biodiversity and Genetic Resources. London: Belhaven Press, 1990.
- Helgeson J.P., Pohlman J.D., Austin S., Haberland G.T., Wielgus S.M., Ronis D., Zambolin L., Tooley P., McGrath J.M., James R.V., Stevenson W.R. Somatic hybrids between *Solanum bulbocastanum* and potato: a new source of resistance to late blight. *Theor. Appl. Genet.* 1998;96:738-742.
- Hermesen J.G.Th., Ramanna M.S. Double-bridge hybrids of *Solanum bulbocastanum* and cultivars of *Solanum tuberosum*. *Euphytica*. 1973;22:457-466.
- Hermesen J.G.Th., Ramanna M.S. Barriers to hybridization of *Solanum bulbocastanum* Dun. and *Solanum verrucosum* Schlecht. and structural hybridity in their F1 plants. *Euphytica*. 1976;25:1-10.
- Jansky S.H., Hamernik A.J. The introgression of 2x 1 EBN *Solanum* species into the cultivated potato using *Solanum verrucosum* as a bridge. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2009;56:1107-1115.
- Jansky S.H., Peloquin S.J., Yerk G.L. Use of potato haploids to put 2x wild species germplasm in usable form. *Plant Breeding*. 1990;104:290-294.
- Johnston S.A., Hanneman R.E., Jr. Support of the endosperm balance number hypothesis utilizing some tuber-bearing *Solanum* species. *Am. Potato J.* 1980;57(1):7-14.
- Johnston S.A., Hanneman R.E., Jr. Manipulations of endosperm balance number overcome crossing barriers between diploid *Solanum* species. *Science*. 1982;217:446-448.
- Kameraz A.Ya., Vavilova M.A., Zhitlova N.A. Interspecific hybridization of potatoes with participation of Mexican wild diploid species *S. verrucosum* Schlecht. *Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii* = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding. 1982;73:56-65. (in Russian)
- Luksha V.I., Savchuk A.V., Voronkova E.V., Yermishin A.P. Results of selection on character "high functional pollen fertility" and a set of breeding indexes in populations of *Solanum tuberosum* L. dihaploids. *Kartofelevodstvo* = Potato Growing (Minsk). 2010;17:137-148. (in Russian)
- Makhan'ko O.V. Interspecific incompatibility in potato diploid breeding. *Zemlyarobstva i akhova raslin*=Agriculture and Plant Protection. 2008;1:11-14. (in Russian)
- Nyman M., Waara S. Characterization of somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and its frost-tolerant relative *Solanum commersonii*. *Theor. Appl. Genet.* 1997;95:1127-1132.
- Pallais N., Fong N., Berrios D. Research on the physiology of potato sexual seed production. Innovative Methods for Propagating Potatoes. CIP Rep. 28th Planning Conf. CIP, Lima, 1984;149-168.
- Pankin A., Sokolova E., Rogozina E., Kuznetsova M., Deal K., Jones R., Khavkin E. Allele mining in the gene pool of wild *Solanum* species for homologues of late blight resistance gene *RB/Rpi-blb1*. *Plant Genet. Resources*. 2011;9(2):305-308.
- Polyukhovich Yu.V., Makhan'ko O.V., Savchuk A.V., Voronkova E.V., Yermishin A.P. Development of bridge lines for overcoming interspecific incompatibility in potatoes. *Vestsi NAN Belarusi. Ser. biyal. navuk* = Proc. Nat. Acad. Sci. Belarus. Ser. Biol. Sci. 2010;2:51-58. (in Russian)
- Polyukhovich Yu.V., Savchuk A.V., Voronkova E.V., Yermishin A.P. The efficacy of hybridization between *Solanum verrucosum* Schltdl and 1 EBN wild diploid potato species with use of rescue pollination by *S. phureja* IvP 35. *Doklady NAN Belarusi* = Reports Nat. Acad. Sci. Belarus. 2011;55(3):88-92. (in Russian)
- Polyukhovich Yu.V., Voronkova E.V., Savchuk A.V., Yermishin A.P. Use of *Solanum verrucosum* for overcoming unilateral incompatibility in crosses with allotetraploid wild potato species. *Kartofelevodstvo* = Potato Growing (Minsk). 2013;21(1):136-145. (in Russian)
- Sokolova E.A., Fadina O.V., Khavkin E.E. Metodicheskie ukazaniya: molekulyarnye markery genov ustoychivosti i genomov-donorov ustoychivosti kartofelya k fitoflorozu [Methodology guidelines: molecular markers of resistance genes and genomes that are donors of resistance of potatoes to late blight]. Moscow, All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology Publ., 2013. (in Russian)
- Thieme R., Darsow U., Gavrilenko T., Dorokhov D., Tiemann H. Production of somatic hybrids between *S. tuberosum* L. and late blight resistant Mexican wild potato species. *Euphytica*. 1997;97:189-200.
- Voronkova E.V., Polyukhovich Yu.V., Savchuk A.V., Gukasyan O.N., Yermishin A.P. Field resistance to late blight of hybrids produced by pollination of bridge species *Solanum verrucosum* and SvSv-lines derived from it by diploid 1 EBN potato species. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika* = Molecular and Applied Genetics (Minsk). 2013;15:104-110. (in Russian)
- Yermishin A.P. Incompatibility in interspecific and intraspecific hybridization of diploid potatoes and the approaches to its overcoming. *Vestsi NAN Belarusi. Ser. biyal. navuk* = Proc. Nat. Acad. Sci. Belarus. Ser. Biol. Sci. 2001;3:105-118. (in Russian)
- Yermishin A.P., Makhan'ko O.V., Voronkova E.V. Application of somatic hybrids between dihaploids of potato *Solanum tuberosum* L. and wild diploid species from Mexico in breeding: generation and backcrossing of dihaploids of somatic hybrids. *Genetika* = Genetics (Moscow). 2006;42(12):1414-1421. (in Russian)
- Yermishin A.P., Polyukhovich Yu.V., Savchuk A.V., Voronkova E.V. A new look at the problem of inter-EBN interspecific crosses in potato. *EAPR 2011: Abstracts of the 18th Triennial Conf. of the Eur. Assoc. for Potato Research*, July 24-29, 2011, Oulu, Finland. Eds. J. Santala, J.P.T. Valkonen. Helsinki, Finland, 2011;71.
- Yermishin A.P., Polyukhovich Yu.V., Voronkova E.V., Savchuk A.V. Production of hybrids between 2 EBN bridge species *Solanum verrucosum* and 1 EBN diploid potato species. *Am. J. Potato Res.* 2014;91:610-617. DOI 10.1007/s12230-014-9385-9.
- Yermishin A.P., Teltsova Yu.V., Savchuk A.V., Makhan'ko O.V. Development of the bridge lines with the sc-system from *Solanum verrucosum* for overcoming interspecific incompatibility in potatoes. *Materialy mezhdunarodnoi konferentsii "Otdalennaya gibrizatsiya. Sovremennoe sostoyanie i perspektivy razvitiya"* [Proc. Intern. Conf. "Distant hybridization: State of the art and prospects of development", Moscow 16-17 December 2003]. M.: MSKha Publ., 2003;96-100. (in Russian)



Устойчивость картофеля к карантинным болезням

А.В. Хютти^{1, 2}✉, О.Ю. Антонова^{2, 3}, Н.В. Мироненко^{1, 2}, Т.А. Гавриленко^{3, 4}, О.С. Афанасенко^{1, 2}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений», Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова» (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Возбудитель рака картофеля *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. и золотистая картофельная нематода (ЗКН) *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens – карантинные виды, распространенные на территории Российской Федерации и в большинстве стран мира. Бледная картофельная нематода *G. pallida* (Stone) Behrens на территории РФ не выявлена, хотя в странах Европейского союза встречается повсеместно. В обзоре приведены сведения о вредоносности *S. endobioticum* и ЗКН. В настоящее время в мире выявлено 43 патотипа *S. endobioticum* и 5 патотипов ЗКН. На территории РФ обнаружен только первый (D1) патотип возбудителя рака и Ro1 патотип ЗКН. Представлены современные наборы сорто-дифференциаторов для *S. endobioticum* и ЗКН и рассмотрены методы определения патотипного состава, в том числе попытки разработать молекулярные маркеры для определения расовой принадлежности *S. endobioticum*. Приведены данные по устойчивости современного сортимента картофеля к этим карантинным заболеваниям и методы определения устойчивости. Рассмотрены современные данные по генетике устойчивости картофеля к *S. endobioticum*, *G. rostochiensis* и *G. pallida*, включая картирование и клонирование R-генов. Рассмотрены результаты оценки эффективности использования молекулярных маркеров в маркер-вспомогательном отборе (MAS) устойчивых генотипов. Приведены результаты использования мультиплексных систем, позволяющих одновременно выявлять аллельный состав нескольких генов устойчивости к одному или к разным патогенам у образцов картофеля. Рассмотрены механизмы количественной устойчивости картофеля к *S. endobioticum* и ЗКН и адаптационных процессов в популяциях возбудителей, позволяющие преодолевать устойчивость растения-хозяина. Возделывание в производстве слабо повреждаемых ЗКН сортов может стимулировать адаптационную изменчивость возбудителя и приводить к отбору вирулентных патотипов в течение двух-трех генераций патогена.

Ключевые слова: картофель; карантинные объекты; устойчивость растений; *Synchytrium endobioticum*; *Globodera rostochiensis*; *Globodera pallida*.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Хютти А.В., Антонова О.Ю., Мироненко Н.В., Гавриленко Т.А., Афанасенко О.С. Устойчивость картофеля к карантинным болезням. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(1):51-61. DOI 10.18699/VJ17.223

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Khiutti A.V., Antonova O.Yu., Mironenko N.V., Gavrilenko T.A., Afanasenko O.S. Potato resistance to quarantine diseases. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):51-61. DOI 10.18699/VJ17.223

Potato resistance to quarantine diseases

A.V. Khiutti^{1, 2}✉, O.Yu. Antonova^{2, 3}, N.V. Mironenko^{1, 2}, T.A. Gavrilenko^{3, 4}, O.S. Afanasenko^{1, 2}

¹ All-Russian Research Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Pushkin, Russia

² Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

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

The casual agent of potato wart *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. and potato golden nematode (PGN) *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens are the quarantine species causing the most widespread and destructive diseases of potato in the Russian Federation and other countries of the world. The potato pale nematode *Globodera pallida* (Stone) Behrens is not found in Russia, although in the European Union it is found everywhere. The review provides information on the harmfulness of *S. endobioticum* and PGN. To date, 43 pathotypes of *S. endobioticum* and 5 pathotypes of PGN have been revealed in the world. In the Russian Federation, only the first (D1) pathotype of potato wart and pathotype Ro1 of PGN have been found. Modern sets of differentials for *S. endobioticum* and PGN and methods of pathotype composition determination, including efforts to develop molecular markers (SSR) to determine the race of *S. endobioticum*, are presented. Data on the resistance of commercial potato cultivars to these quarantine diseases and methods for resistance determination are reviewed. Modern data on the genetics of potato resistance to *S. endobioticum*, *G. rostochiensis* and *G. pallida*, including mapping and cloning of R-genes, are presented. Available literature data on molecular markers of R-genes for marker assisted selection and the evaluation of their effectiveness are presented. The use of multiplex systems allows the presence of several genes for resistance to one or more pathogens to be analyzed at once. Mechanisms of potato quantitative resistance to *S. endobioticum* and PGN and adaptation processes in pathogens populations resulting in overcoming resistance of host are discussed. Cultivation of cultivars poorly susceptible to PGN can stimulate the adaptive variability of the pathogen and induce virulent pathotypes for 2–3 pathogen generations.

Key words: potato; quarantine species; plant resistance; *Synchytrium endobioticum*; *Globodera rostochiensis*; *Globodera pallida*.

Received 09.11.2016

Accepted for publication 18.12.2016

© AUTHORS, 2017

✉ e-mail: alexanderkhiutti@mail.ru

На территории Российской Федерации к объектам внутреннего и внешнего карантина относятся только два возбудителя заболеваний картофеля – *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. и *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens. (золотистая картофельная нематода). Вызываемые ими рак картофеля и глободероз распространены в большинстве стран мира (EPPO, 2003, 2014; CABI/EPPO, 2011, 2015). В цикле своего развития оба патогена имеют покоящуюся стадию: зооспорангии у *S. endobioticum* и цисты у *G. rostochiensis*, благодаря которой они могут сохраняться в течение многих лет. Химических средств борьбы против этих возбудителей нет, в связи с чем основным способом защиты является возделывание устойчивых сортов картофеля.

Бледная картофельная нематода *Globodera pallida* (Stone) Behrens на территории РФ не выявлена, хотя в странах Европейского союза она встречается повсеместно (EPPO, 2003, 2014; CABI/EPPO, 2011, 2015).

Распространение, вредоносность и диагностика патотипного состава возбудителей

Рак картофеля. Возбудитель – облигатный внутриклеточный паразит *S. endobioticum*, поражающий все органы растения-хозяина, кроме корней. Заболевание проявляется в виде наростов различной формы на клубнях, корневой шейке, столонах и ростках. Иногда признаки заболевания можно обнаружить на стеблях, листьях и цветках. *S. endobioticum* сохраняется в почве в виде покоящихся толстостенных зооспорангиев, которые к осени образуются в наростах. Заражение восприимчивых сортов картофеля может происходить при наличии одного зооспорангия в 1 г почвы. Есть данные о заражении картофеля при наличии одного зооспорангия в 25 г почвы (Hampson, 1992; OEPP/EPPO, 2004). Покоящиеся зооспорангии *S. endobioticum* могут сохранять свою жизнеспособность более 40 лет (Laidlaw, 1985). При выращивании восприимчивых сортов картофеля в очагах с *S. endobioticum* потери урожая могут достигать 50–100 % (Hampson, 1993; Melnik, 1998).

На территории РФ первые очаги *S. endobioticum* были зарегистрированы в Ленинградской области в 1940 г. Общая площадь заражения составляла 1,4 га (Галанова, 1964). Сравнительно широкое распространение болезнь получила во время Великой Отечественной войны и в послевоенные годы. На 2014 г. *S. endobioticum* зарегистрирован в 13 субъектах РФ, включающих 34 административных района. Площадь заражения, по данным Россельхознадзора, составила 1217,9 га.

В очагах рака должны выращиваться только высокоустойчивые к *S. endobioticum* сорта картофеля, которые способствуют очищению почвы от патогена. Однако вывоз выращиваемой сельскохозяйственной продукции, а также картофеля из очагов заболевания должным образом не контролируется и, более того, неизвестно, какие сорта (по степени устойчивости) выращиваются на карантинных участках.

В настоящее время известно не менее 43 патотипов *S. endobioticum* (Ваауен et al., 2006). На территории РФ обнаружен только первый (D1) патотип, однако выявлена различная агрессивность географических популяций по

отношению к восприимчивым сортам картофеля (Мироненко и др., 2009).

Для идентификации агрессивных патотипов существуют наборы сортов-дифференциаторов. В разных странах тест-сортимент был неодинаковым и различался по номенклатурному коду. В начале 2000-х гг. Европейской и Средиземноморской организацией по защите растений была предпринята попытка унифицировать набор сортов-дифференциаторов для применения на территории Европейского союза (OEPP/EPPO, 2004). Однако отсутствие координации, связанной с обменом патотипами для определения дифференцирующей способности сортов, не позволило рекомендовать данный набор как стандартный для международного использования. В 2012 г. рабочая группа в составе проекта SENDO EUPHRESKO (European phytosanitary research programme collaboration) поставила перед собой цель создать новый набор сортов-дифференциаторов европейской селекции, разработать и усовершенствовать методы молекулярной диагностики *S. endobioticum* для идентификации патотипного состава (Афанасенко и др., 2013). Для этого всем странам-участницам (Германия, Нидерланды, Россия, Польша, Болгария, Великобритания, Ирландия, Литва, Бельгия) были разосланы единые наборы сортов-дифференциаторов, состав которых в процессе работы изменялся (Flath et al., 2014). К настоящему времени в набор входят 10 сортов: Tomensa, Deodara, Producent, Combi, Saphir, Delcora, Miriam, Karolina, Ulme и Belita, на которых можно определить наиболее распространенные в Европе патотипы *S. endobioticum*: 1 или D1 (восприимчивые сорта Tomensa, Deodara, остальные устойчивые); 2 или G1 (восприимчивые сорта Tomensa, Deodara, Producent, Combi, Saphir, остальные устойчивые); 6 или O1 (восприимчивые сорта Tomensa, Deodara, Producent, Combi, остальные устойчивые); 8 или F1 (восприимчивые сорта Tomensa, Deodara, Producent, Combi, Delcora, остальные устойчивые); 18 или T1 (восприимчивые сорта Tomensa, Deodara, Producent, Combi, Delcora, Miriam, остальные устойчивые). При этом в наборе есть три группы взаимозаменяемых сортов, т. е. в анализе можно использовать одного из представителей каждой группы: 1) Tomensa и Deodara, восприимчивые ко всем патотипам; 2) Producent, Combi – устойчивые к патотипу 1 и восприимчивые к патотипам 2, 6, 8 и 18; и 3) Karolina, Ulme и Belita, устойчивые ко всем патотипам (Obidiegwu et al., 2014).

В нашей стране набор европейских сортов-дифференциаторов пока не опробовался в связи с отсутствием этих сортов в Госреестре селекционных достижений, разрешенных к использованию на территории РФ. Определение патотипного состава на широком наборе сортов, применяемых для дифференциации популяций *S. endobioticum* в разных странах до 2008 г., позволило сделать вывод, что образцы популяции из Ленинградской и Московской областей представлены только первым (D1) патотипом (Мироненко и др., 2009).

Трудоемкость исследований расового состава популяций возбудителя рака картофеля, сильная зависимость от условий результатов искусственной инокуляции привели к необходимости разработки молекулярных маркеров вирулентности.

При изучении 22 изолятов различного географического происхождения (Канада и Европа) с использованием 21 SSR-маркера не выявлено ассоциации между генотипами и патотипами: изоляты одного и того же патотипа относились к разным генотипам (Gagnon et al., 2016). Большинство изолятов из Канады были сгруппированы в один кластер, тогда как изоляты из Европы не группировались по стране происхождения. Разработанные SSR-маркеры, по мнению авторов, могут быть использованы для выявления внутривидового генетического разнообразия популяций *S. endobioticum*, но не патотипного состава (Gagnon et al., 2016).

Золотистая картофельная нематода (ЗКН) – облигатный специализированный седентарный паразит, для которого характерно наличие в жизненном цикле цист на корнях растения-хозяина – особого образования из отмершего тела самки, где яйца и инвазионные личинки в течение многих лет сохраняют свою жизнеспособность. При созревании цисты приобретают золотистый оттенок. Потери урожая от *G. rostochiensis* проявляются при наличии 1000 яиц и личинок в 100 см³ почвы; при наличии 15000 яиц и личинок в 100 см³ почвы потери урожая могут составлять более 80–90 %. Покоящиеся цисты *G. rostochiensis* сохраняют свою жизнеспособность до 30 лет (Winslow, Willis, 1972).

На территории РФ *G. rostochiensis* впервые была обнаружена в 1948 г. в Калининградской области. В настоящее время она широко распространена в европейской части РФ, на юге Сибири и Дальнем Востоке (Гуськова, 2005; Limantseva et al., 2014). По данным Россельхознадзора за 2014 г., *G. rostochiensis* зарегистрирована в 61 субъекте РФ, включающем 861 административный район на территории общей площадью 1794442.63 га. В настоящее время известны пять патотипов ЗКН: Ro1, Ro2, Ro3, Ro4 и Ro5, различающихся по способности поражать растения-дифференциаторы. В РФ встречается только первый патотип (Ro1) *G. rostochiensis* и до настоящего времени не обнаружена бледная картофельная нематода – *G. pallida* (Limantseva et al., 2014). Главным диагностическим признаком *G. pallida* является окраска цист: в конце созревания они не приобретают золотистого цвета, как у *G. rostochiensis*, а остаются бледными. Вид широко распространен и имеет три патотипа: Pa1, Pa2 и Pa3. Основная опасность *G. pallida* заключается в способности преодолевать доминантный ген устойчивости, который большинство современных нематодоустойчивых сортов картофеля получили от *Solanum tuberosum* ssp. *andigenum* (Phillips, Trudgill, 1998).

В РФ работы по выявлению и определению *G. rostochiensis* и *G. pallida*, изучению популяций ЗКН проводились более 30 лет назад. В Северо-Западном регионе РФ такие исследования выполнены Л.А. Лиманцевой в 2005–2010 гг. (Limantseva et al., 2014), однако потенциальная опасность обнаружения новых патотипов и видов картофельных нематод обуславливают необходимость постоянного мониторинга.

До 1977 г. единого набора дифференциаторов для определения патотипного состава *G. rostochiensis* не существовало. Международный тест-набор, который применяется до настоящего времени в РФ, состоит из семи клонов

культурных видов картофеля: *S. tuberosum* ssp. *andigenum* C.P.C. 1673, *S. kurtzianum* KTT 60.21.19, *S. vernei* G-LKS 58.1642/4, *S. vernei* (VTn) 2 62.33.3, *S. vernei* 65.346/19, *S. multidissectum* P 55/7, *S. vernei* 69.1377/94 и восприимчивых образцов *S. tuberosum* (Kort et al., 1977).

Устойчивость современного сортимента картофеля: методы определения и источники устойчивости

Рак картофеля. Современная селекция картофеля ориентирована на получение сортов, сочетающих высокую продуктивность с устойчивостью к наиболее опасным патогенам. Обязательное требование для включения в реестр селекционных достижений новых сортов картофеля – устойчивость к возбудителю рака.

Проведенный анализ данных по устойчивости к *S. endobioticum* районированных сортов в СССР и РФ (1964–2015 гг.) показал, что в 1964 г. возделывалось 43 восприимчивых сорта и 81 устойчивый, а в 2016 г. – 4 и 406 сортов соответственно (рис. 1).

Почти все сорта, внесенные в Госреестр в 2016 г., устойчивы к *S. endobioticum*. Исключение составляют сорта, внесенные в него ранее: Лорх (1931 г.), Волжанин (1950), Приобский (1972), Ермак улучшенный (1978 г.).

Очень важный момент при выявлении источников устойчивости – использование надежных методов оценки. Устойчивость растений к почвенным патогенам в сильной степени зависит от условий внешней среды, качественного и количественного состава инокулюма.

Разработка лабораторных методов оценки ракоустойчивости картофеля была начата еще в 1920-х гг. А. Spieskermann и Р. Kothoff (1924) предложили проводить заражение клубней возбудителем рака в специально приготовленном компосте, содержащем зимние зооспорангии патогена. В 1925 г. M.D. Glynn впервые использовала

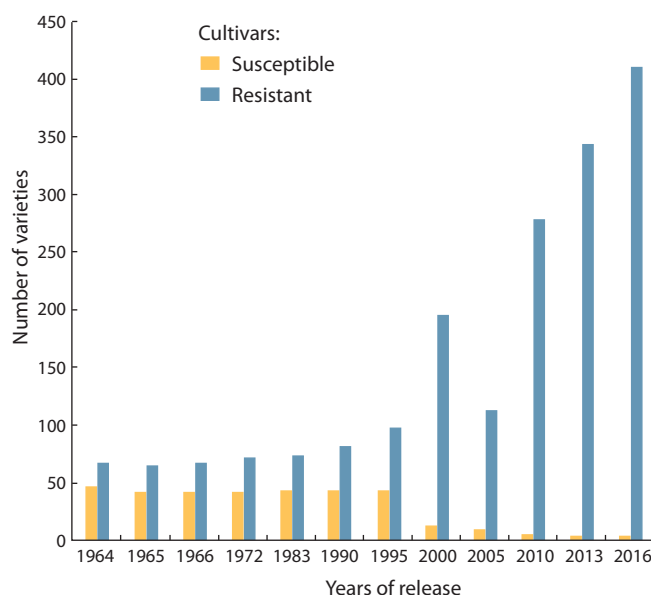


Fig. 1. The numbers of potato cultivars resistant and susceptible to *S. endobioticum* (pathotype 1) that were released from 1964 to 2016 according to the State Register of Selection Achievements.

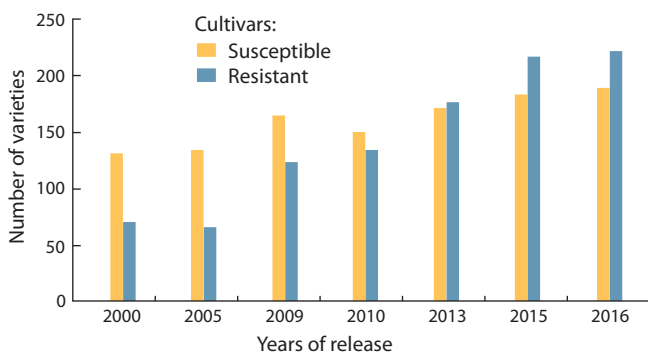


Fig. 2. The numbers of potato cultivars resistant and susceptible to *G. rostochiensis* (pathotype Ro 1) that were released from 2000 to 2016 according to the State Register of Selection Achievements.

свежие раковые наросты для определения ракоустойчивости картофеля. В последующем этот метод, суть которого состоит в инокуляции ростков картофеля гаплоидными зооспорами, вышедшими из летних зооспорангиев, содержащихся в молодых раковых наростах, был усовершенствован (Köhler, 1927; Lemmerz, 1930, 1931; Noble, Glynne, 1970). В соответствии с унифицированной шкалой (Langerfeld, Stachewicz, 1994), принятой в настоящее время в ОЕПР/ЕРРО (2004), типы реакции определяют по наличию и скорости образования защитного некроза по пятибалльной шкале, в которой высокая устойчивость (ранний защитный некроз) соответствует баллу 1, а восприимчивость (отсутствие некроза) – баллу 5.

В РФ используется шкала, включающая три градации: 1 – устойчивые (некроз); 2 – слабовосприимчивые (не более 5 зооспорангиев без некроза); 3 – восприимчивые (более 5 зооспорангиев без некроза, образование наростов) (Лабораторная диагностика..., 1979).

Устойчивостью к различным патотипам *S. endobioticum* характеризуются многочисленные образцы диких видов, относящихся к самым разнообразным сериям, причем устойчивость к *S. endobioticum* присуща не виду в целом, а лишь отдельным гибридам и образцам того или иного вида. Наиболее перспективен в этом отношении дикий вид *S. chacoense*, различные формы которого устойчивы к разным патотипам *S. endobioticum* (Яковлева, 1964). Ценные образцы, обладающие устойчивостью к *S. endobioticum*, выявлены среди культурных видов *S. phureja*, *S. stenotomum*, *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* и *S. tuberosum* ssp. *andigenum* (Khiutti et al., 2012) и диких видов *S. cardiophyllum* (Яковлева, Салтыкова, 1966), *S. wittmackii* и *S. polyadenium* (Яковлева, 1964). Названия видов указаны согласно (Hawkes, 1990).

Не обнаружено узкой географической и видовой приуроченности устойчивости к раку: она встречается у образцов разных культурных видов из разных стран Латинской Америки (Khiutti et al., 2012).

До 1941 г., когда был известен только первый патотип *S. endobioticum*, селекция на ракоустойчивость шла достаточно успешно. Однако с появлением в Европе агрессивных патотипов (Braun, 1942) ситуация существенно изменилась. Поскольку в РФ пока распространен только патотип 1, успешная селекция на устойчивость обуслов-

лена использованием гена *Sen1*, которым защищены практически все возделываемые сорта картофеля.

Золотистая картофельная нематода. Соотношение зарегистрированных с 2000 по 2016 г. в Госреестре устойчивых к ЗКН и восприимчивых сортов картофеля представлено на рис. 2. В 2000 г. возделывались 131 восприимчивый сорт и 70 устойчивых к *G. rostochiensis*, а в 2016 г. – 189 и 221 сорт соответственно.

Признак нематодоустойчивости не является обязательным для внесения сорта в Госреестр, однако конкурентоспособность сортов картофеля в современных условиях связана в первую очередь с устойчивостью к ЗКН.

Для лабораторной диагностики нематодоустойчивости в России в качестве инокулята используют цисты ЗКН, сохраняющиеся в почве (инфекционная нагрузка 3 500 яиц и личинок в 100 см³ почвы) (Положение..., 1993).

В Евросоюзе используют методику заражения яйцами и личинками, полученными из раздавленных цист. Исследуемые образцы высаживаются в почву, куда вносится инокулюм из раздавленных цист *G. rostochiensis* из расчета 1 500 яиц и личинок в 100 см³ почвы. Учет результатов проводят через 2.5–3 месяца – период, достаточный для развития цист *G. rostochiensis*.

Оба метода довольно эффективны, но первый менее трудоемкий, более приближен к естественным условиям и создает жесткий инфекционный фон, позволяющий с большей степенью вероятности выбраковывать восприимчивые образцы.

В настоящее время существует три шкалы для оценки нематодоустойчивости растительного материала: две из них используются в РФ и одна – в Европейском союзе. При использовании разных шкал нет возможности сравнения полученных результатов при разных оценках.

При государственном испытании сортов картофеля применяется двухбалльная шкала с подразделением на группы: устойчивые и поражаемые. К группе устойчивых относят растения, на корнях которых цисты отсутствуют или присутствует не более 5 пустых цист (без яиц и личинок); все остальные считаются поражаемыми (Положение..., 1993).

Вторая шкала включает три градации и применяется в основном в научно-исследовательской работе: первая группа – нет цист на корнях – устойчивые; вторая группа – 1–5 цист на корнях – слабоустойчивые (слабопоражаемые); третья группа – более 6 цист – поражаемые (Понин, 1974).

В Европейском союзе применяется девятибалльная шкала (ОЕПР/ЕРРО, 2006), где балл 9 означает максимальный уровень устойчивости.

Очевидно, что необходима унификация отечественной методики оценки на устойчивость к *G. rostochiensis* в соответствии с международной.

Впервые нематодоустойчивые клоны были отобраны английским исследователем С. Ellenby (1952) среди образцов двух южноамериканских видов – культурного *S. tuberosum* ssp. *andigenum* и дикорастущего *S. vernei*. С этого времени селекция нематодоустойчивых сортов основывалась на использовании устойчивых образцов *S. tuberosum* ssp. *andigenum*, которые передавали доминантный аллель гена устойчивости *H1* при скрещивании

с сортами и селекционными клонами. Среди образцов других культурных видов *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*, *S. phureja*, *S. stenotomum*, а также родственных диких видов *S. gourlayi*, *S. hondelmannii*, *S. brevicaula*, *S. canasense*, *S. spgazzinii*, *S. sparsipilum* (названия видов указаны по системе (Hawkes, 1990)) тоже были выявлены клоны, обладающие устойчивостью к ЗКН (Limantseva et al., 2014).

Первые нематодоустойчивые сорта картофеля были получены в 1960 г. в Нидерландах от скрещивания устойчивых образцов диких видов *S. kurtzianum* и *S. vernei* с образцами культурных видов и селекционными клонами (Kubich, 1963).

Устойчивость зарубежных селекционных сортов картофеля к *G. rostochiensis* (патотип Ro1) обусловлена интрогрессией доминантных аллелей генов: *H1* от устойчивых образцов *S. tuberosum* ssp. *andigenum*, *GroVI* – от *S. vernei* и *GroI-4* – от *S. spgazzinii* (Gebhardt et al., 1993; Pineda et al., 1993; Jacobs et al., 1996).

При создании российских сортов картофеля в качестве источников устойчивости к *G. rostochiensis* активно использовались зарубежные нематодоустойчивые селекционные сорта, а также образцы диких видов *S. chacoense* и *S. vernei* (Бирюкова и др., 2015).

Генетика устойчивости и молекулярные маркеры генов устойчивости

Рак картофеля. Устойчивость к патотипу 1 возбудителя рака картофеля детерминирована доминантными аллелями генов *Sen1* (синоним *Sen1-XI*) (Hehl et al., 1999) и *Sen1-4* (Brugmans et al., 2006). Ген *Sen1-4* картирован на длинном плече хромосомы IV на расстоянии 5 см от центромера (Brugmans et al., 2006). Ген *Sen1* локализован на дистальном конце длинного плеча хромосомы XI в мегакластере последовательностей, кодирующих белки с NBS-LRR доменами, в том числе *R*-гены и QTLs, детерминирующие устойчивость к Y-вирусу картофеля, вирусу аукуба мозаики картофеля, вирусу скручивания листьев картофеля и *G. pallida* (Obidiegwu et al., 2014). Для выявления доминантного аллеля гена *Sen1* был разработан SCAR-маркер NL25₁₄₀₀, который у поражаемых форм амплифицирует фрагмент 1200 п. о., а у устойчивых – дополнительный фрагмент 1400, являющийся диагностическим (Gebhardt et al., 2006). При проведении молекулярного скрининга селекционных сортов было установлено хорошее совпадение наличия маркера и устойчивости к возбудителю рака картофеля (Gebhardt et al., 2006; Антонова и др., 2016). Однако при анализе выборки образцов культурных видов картофеля, представленных диплоидными и тетраплоидными местными южноамериканскими сортами, какая-либо связь между устойчивостью и наличием данного маркера гена *Sen1* не выявлена (Khiutti et al., 2012). Авторы предположили возможное наличие у культурных видов других, отличных от *Sen1*, генов устойчивости к возбудителю рака картофеля и/или рекомбинации между геном *Sen1* и маркером NL25₁₄₀₀ (Khiutti et al., 2012).

По результатам анализа расщепляющихся популяций были разработаны новые маркеры гена *Sen1*, в том числе SSR-маркер Sti046 и три SNP-маркера в локусах St_At5g16710, GP125 и GP259 (Ballvora et al., 2011). Однако при апробации маркера Sti046 на выборке из

113 сортов преимущественно российской селекции не выявлено связи между аллельным составом SSR-локуса Sti046 и устойчивостью сортов к патотипу 1 возбудителя рака картофеля (Антонова и др., 2016).

Помимо гена *Sen1* идентифицированы другие гены, детерминирующие устойчивость к различным патотипам *S. endobioticum*, отличным от патотипа 1. Так, ген *Sen18-IX* (локализован на хромосоме IX) определяет устойчивость к патотипу 18, ген *Sen2/6/18-I* (хромосома I) – к патотипам 2, 6 и 18. По данным (Ballvora et al., 2011), признаки устойчивости растений к патотипам 2, 6 и 18 коррелируют друг с другом, но наследуются независимо от признака устойчивости к патотипу 1. Для диагностирования указанных выше генов были разработаны SSR-маркер STM2030, а также различные SNP-маркеры в локусах GP192, GP124, GP194 и SC176 (Ballvora et al., 2011).

Дальнейшие исследования генетического контроля устойчивости к возбудителю рака картофеля проводились с использованием современных подходов микропипирования и пиросеквенирования. Для нескольких расщепляющихся популяций была изучена совместная сегрегация признака устойчивости к *S. endobioticum* (патотипы 1, 2, 6 и 18) и 8303 SNP-маркеров. Родительские линии и контрастные по устойчивости к возбудителю рака гибриды F₁ были генотипированы с использованием SNP-микрочипа 8.3k SolCAP (Hamilton et al., 2011), в результате отобраны точечные мутации, ассоциированные с наличием устойчивости (Obidiegwu et al., 2014). Эти же популяции были проанализированы с использованием 193 микросателлитных маркеров. Для каждой популяции были выделены SNP- и SSR-маркеры, ассоциированные с устойчивостью к *S. endobioticum*. Оказалось, что для разных популяций результаты картирования не совпадают. Например, по результатам анализа популяций BNA1 и SaKa1 на хромосоме I был картирован локус, детерминирующий устойчивость к патотипам 2, 6 и 18, в то время как по данным анализа популяции BNA2 этот же локус определял устойчивость только к патотипу 1. Авторы сделали вывод о наличии в идентифицированном ими локусе множественных аллелей генов устойчивости (Obidiegwu et al., 2014). Одновременно были выявлены определенные сочетания аллелей, с высокой вероятностью определяющие устойчивость к *S. endobioticum*, однако ни один из аллелей не ассоциировался с ракоустойчивостью. Более того, при апробации предложенных маркеров на выборке устойчивых и поражаемых *S. endobioticum* сортов корреляция между присутствием маркера и устойчивостью не была обнаружена (Obidiegwu et al., 2014). Эти данные указывают на необходимость дальнейших исследований, направленных на разработку маркеров устойчивости к различным патотипам возбудителя рака картофеля.

На сегодняшний день в практически ориентированных исследованиях наиболее используемым остается маркер NL25₁₄₀₀. Этот маркер выявлен почти у всех изученных в молекулярном скрининге ракоустойчивых отечественных сортов (Лукша и др., 2012; Бирюкова и др., 2015; Антонова и др., 2016). Отметим, что доминантный аллель гена *Sen1* полностью блокирует развитие и репродукционные способности *S. endobioticum* (патотип 1) (Lellbach, Effmert, 1990).

Золотистая картофельная нематода. В настоящее время идентифицирован целый ряд генов и QTLs, контролирующих устойчивость к различным патотипам *G. rostochiensis* и *G. pallida* (Gebhardt, 2013; Ramakrishnan et al., 2015). Однако только четыре из них – *H1*, *GroVI*, *GroI* и *Gpa2* – обеспечивают эффективную защиту растений от наиболее распространенных патотипов цистообразующих нематод; остальные гены и QTLs определяют частичную устойчивость. Согласно литературным данным, доминантный аллель гена *H1* интрогрессирован в селекционные сорта от единичных нематодоустойчивых образцов *S. tuberosum* ssp. *andigenum* и *S. vernei* (Тохореус, Huijsman, 1953), а ген *GroI-4* – от образцов *S. spegazzinii* (Barone et al., 1990). Поскольку гены устойчивости к нематодам активно вовлекаются в селекционные программы, проблема разработки надежных молекулярных маркеров для их идентификации не теряет своей актуальности уже более двух десятилетий.

Ген *H1*, детерминирующий устойчивость к патотипам Ro1 и Ro4 *G. rostochiensis*, локализован на хромосоме V, при этом было установлено его тесное сцепление с маркерами: CP113 (1 cM) (Gebhardt et al., 1993; Niewöhner et al., 1995), 239E4left/AluI (0.8 cM) (Bakker et al., 2004) и CD78 (2.7 cM) (Pineda et al., 1993). Маркер CP113 позднее был использован для отбора ВАС-клонов при клонировании локуса *H1* (Finkers-Tomczak et al., 2011).

Не все сцепленные с геном *H1* маркеры оказались одинаково эффективны при проведении молекулярного скрининга. Так, маркер CP113 амплифицируется как у устойчивых, так и у поражаемых сортов (Milczarek et al., 2011). Маркер 239E4left/AluI у поражаемых сортов выявлен не был, однако у устойчивых сортов он встречается гораздо реже остальных маркеров гена *H1*, используемых в маркер-вспомогательной селекции (marker assisted selection – MAS) (Milczarek et al., 2011; Антонова и др., 2016).

Наиболее часто в MAS на устойчивость к *G. rostochiensis* используется SCAR-маркер TG689 гена *H1*, генерирующий у устойчивых генотипов диагностический фрагмент 141 п.о. (Milczarek et al., 2011). Этот маркер часто применяется в зарубежных и отечественных исследованиях (Бирюкова и др., 2008, 2015; Galek et al., 2011; Milczarek et al., 2011, 2014; Shultz et al., 2012; Lopez-Pardo et al., 2013; Кузьминова и др., 2015; Антонова и др., 2016). При этом ряд авторов (Milczarek et al., 2011; Shultz et al., 2012; Limantseva et al., 2014) отмечали недостаточную связь между наличием данного маркера и устойчивостью, определенной фитопатологическими методами, в частности наличие некоторого числа ложнопозитивных результатов. Группа японских исследователей разработала маркеры N146 и N195, тесно сцепленные с локусом *H1* (частота рекомбинации 0.109 и 0.207 % соответственно), и продемонстрировала эффективность их использования при скрининге японских сортов и селекционных клонов (Takeuchi et al., 2008; Asano et al., 2012). По результатам анализа последовательности локуса *H1* был предложен маркер 57R, локализованный внутри области «341 k.b.», которую авторы считали определяющей в детерминации признака устойчивости к нематоде (Finkers-Tomczak et al., 2011). При апробации маркера 57R было показано, что его ассоциация с устойчивостью тестируемых генотипов

к нематоде более тесная по сравнению с TG689 (Shultz et al., 2012; Milczarek et al., 2014). В настоящее время маркер 57R активно используется в молекулярном скрининге (Milczarek et al., 2014), в том числе в отечественных исследованиях (Бирюкова и др., 2015; Антонова и др., 2016).

Другим геном, имеющим большое практическое значение для селекции на устойчивость к *G. rostochiensis*, является *GroI-4*, интрогрессированный от дикого вида *S. spegazzinii* (Barone et al., 1990). Ген *GroI-4* входит в состав локуса *GroI*, картированного на хромосоме VII (Barone et al., 1990; Paal et al., 2004), содержащего также несколько псевдогенов. Отметим, что кодируемый геном *GroI-4* белок относится к классу TIR-NB-LRR (Paal et al., 2004), в то время как белки остальных секвенированных генов устойчивости к цистообразующим нематодам (*Gpa2* и *H1*) не имеют TIR домена (van der Vossen et al., 2000; Finkers-Tomczak et al., 2011). Не исключено, что механизмы взаимодействия с патогеном в случае *GroI-4* отличаются от других генов, что повышает его селекционную ценность.

Для идентификации гена *GroI-4* был разработан одноименный внутригенный SCAR-маркер GroI-4 (Gebhardt et al., 2006), амплифицирующий у устойчивых генотипов фрагмент 602 п.о. Маркер был широко использован в MAS (Бирюкова и др., 2008; Milczarek et al., 2011; Лукша и др., 2012; Кузьминова и др., 2015; Антонова и др., 2016) и показал хорошую корреляцию с наличием устойчивости к ЗКН. В то же время встречаемость у устойчивых к ЗКН генотипов маркерных фрагментов гена *GroI-4* во всех исследованиях была значительно ниже, чем маркеров гена *H1* (Milczarek et al., 2011; Milczarek, 2012; Антонова и др., 2016), а у изученного японского сортигента маркер *GroI-4* полностью отсутствовал (Asano et al., 2012).

Необходимо отметить, что в первых работах по изучению локуса *GroI* отмечалось, что данный локус определяет устойчивость ко всем пяти патотипам *G. rostochiensis*, в то время как ген *GroI-4* – устойчивость только к патотипу Ro1 (Paal et al., 2004). Однако в дальнейшем при проведении молекулярного скрининга диагностический фрагмент *GroI-4*₆₀₂ был обнаружен у сортов Fox, Hilda и Ute, устойчивых одновременно к четырем патотипам ЗКН; при этом маркеры других генов устойчивости у этих сортов отсутствовали (Milczarek et al., 2011). Можно предположить, что разработанные в (Gebhardt et al., 2006) праймеры наряду с последовательностью гена *GroI-4* амплифицируют еще какой-то ген из семейства *GroI*.

Относительно недавно путем выравнивания последовательностей генов семейства *GroI* (*GroI-1*, *GroI-2*, *GroI-3*, *GroI-5*, *GroI-6*, *GroI-8*, *GroI-10*, *GroI-11*, *GroI-12* и *GroI-14*) был разработан дополнительный, более специфичный маркер *GroI-4-1* (Asano et al., 2012).

Бледная картофельная нематода. «Главным» геном, обеспечивающим у селекционных сортов устойчивость к бледной картофельной нематоде (патотипы Pa2 и Pa3), является ген *Gpa2*, картированный на хромосоме XII в непосредственной близости (0.8 cM) от маркера GP34 (van der Voort et al., 1997; van der Vossen et al., 2000). Ген *Gpa2* локализован в составе общего кластера вместе с генами устойчивости к другим патогенам, в частности геном *Rx*, детерминирующим устойчивость к вирусу X

картофеля. Первичные последовательности генов *Rx* и *Gpa2* также сходны – гомология аминокислотных последовательностей достигает 88 %. Оба гена кодируют белки, относящиеся к классу CC-NBS-LRR (van der Vossen et al., 2000).

Для детекции генотипов с геном *Gpa2* первоначально использовали тесно сцепленные с ним CAPS-маркеры – 77R/HaeIII₇₅₀ и GP34/TaqI₄₉₅. Была показана хорошая связь маркерных фрагментов с устойчивостью к *G. pallida*, ложноположительные ответы (амплификация у восприимчивых генотипов) в пределах изученной выборки отсутствовали (Milczarek et al., 2011). Однако более перспективными представляются внутригенные маркеры *Gpa2-1* и *Gpa2-2*, разработанные на основе выравнивания последовательностей гена *Gpa2* и его гомологов *RGC1*, *RGC3*, *PSH-RGH6*, *PHS-RGH7* и др. (Asano et al., 2012). Эти маркеры начинают применять и в отечественной практике, что позволяет проводить упреждающий отбор устойчивых форм к карантинному объекту *G. pallida*, который в настоящее время отсутствует на территории РФ (Бирюкова и др., 2015, 2016).

Известны также маркеры некоторых других генов и QTLs устойчивости к нематоде. В частности, разработан ряд маркеров гена *Grp1*, контролирующего одновременно устойчивость к обоим патогенам – *G. rostochiensis* и *G. pallida*: CAPS-маркер TG432/RsaI (Finkers-Tomeczak et al., 2009), SNP-маркер HC (Sattarzadeh et al., 2006) и SCAR-маркер SPUD1636 (Bryan et al., 2002). Из них наибольшую диагностическую ценность имеет маркер HC, демонстрирующий 96 % корреляцию (Sattarzadeh et al., 2006) между наличием диагностического аллеля и устойчивостью тестируемых генотипов.

Современные тенденции применения ДНК-маркеров в практической селекции связаны с разработкой мультиплексных систем, позволяющих одновременно выявлять аллельный состав нескольких генов устойчивости, в том числе к разным патогенам, у тестируемых образцов картофеля. Такой подход не только во много раз увеличивает результативность MAS, но и повышает надежность тестирования, поскольку в число амплифицируемых фрагментов обычно входит контрольный ПЦР-продукт, присутствующий у всех образцов. Это сводит к минимуму ложноотрицательные результаты. Наиболее интересны системы, предложенные японскими исследователями. Первая (Mori et al., 2011) предназначена для выявления маркеров ряда *R*-генов, определяющих устойчивость к основным патогенам картофеля: вирусам X и Y картофеля (маркеры PVX и Ry186 соответственно), к ЗКН (маркер N146) и расе 1 *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (маркер R1). Вторая система (Asano et al., 2012) включает маркеры N146, N195, *Gpa2-2* и *Gro1-4-1* и позволяет одновременно проводить скрининг на присутствие всех основных генов устойчивости к цистообразующим нематодам. В качестве контроля эффективности ПЦР в обеих системах проводится амплификация с праймерами GBSS1. Мультиплексные системы с успехом используются и в исследованиях российского селекционного материала (Бирюкова и др., 2016).

Мультиплексные системы могут быть адаптированы для капиллярного электрофореза с применением авто-

матизированных систем выделения ДНК и постановки реакции, что сводит к минимуму ошибки, обусловленные человеческим фактором.

Адаптация возбудителей карантинных болезней картофеля к устойчивым сортам

«Главные» гены устойчивости к *G. rostochiensis*, обеспечивающие реакцию сверхчувствительности (HR), широко используются селекционерами при создании устойчивых сортов. Например, доминантный аллель гена *H1* *S. tuberosum* spp. *andigenum* детерминирует устойчивость к патотипам Ro1 и Ro4 *G. rostochiensis* (Bakker et al., 2004). Феномен HR описывается как инкапсуляция питательной клетки растения, в которую внедрилась личинка нематоды, слоем некротических клеток с последующей дегенерацией питающего синтиция в течение недели (Rice et al., 1985). Большинство известных QTL локусов устойчивости к цистообразующим нематодам детерминируют частичную устойчивость к одному или более патотипам (Kreike et al., 1993, 1996; Caromel et al., 2005).

Взаимодействие QTLs и соответствующих им минорных генов вирулентности проявляется в снижении фитности (жизнеспособности) паразита. В отличие от HR, этот тип устойчивости основан на снижении репродуктивной способности нематод и называется не некрогенным (Dale, Phillips, 1985).

Известна частичная устойчивость сортов и гибридов картофеля к обоим видам цистообразующих нематод; более детально она исследована у *G. pallida*, при взаимодействии с генотипами, происходящими от *S. vernei* (Stone, 1985). Эта устойчивость описывается как длительная олиго- или полигенная, однако часто преодолевается нематодами. Для изучения длительности устойчивости проводился отбор популяций *G. pallida* на устойчивых *ex vernei* гибридах картофеля (Parlevliet, Zadoks, 1977). Показано, что значительное увеличение вирулентности популяции могло произойти за 6 генераций патогена. В другом исследовании отбор вирулентных изолятов в популяции *G. pallida* к устойчивым образцам диких видов картофеля – *S. vernei*, *S. multidissectum*, *S. sanctae-rosae* и *S. tuberosum* ssp. *andigenum* произошел в результате последовательного перезаражения образцов в течение 11 генераций патогена (Turner, Fleming, 2002). В работе (Whitehead, 1991) показано, что отбор вирулентных популяций *G. pallida* происходит в течение одного года культивирования на растениях устойчивых сортов Glena или Morag, в родословных которых участвовал *S. vernei*.

Опыты по экспериментальной эволюции, т. е. культивированию с последующим отбором популяции *G. pallida* на устойчивых сортах картофеля с разной генетической основой в течение 8 генераций, показали, что длительность сохранения устойчивости у разных генотипов картофеля зависит не только от наличия конкретных генов устойчивости, но и от генетического фона (Fournet et al., 2013).

Различные фенотипические эффекты взаимодействия слабоустойчивых к патотипу Ro1 *G. rostochiensis* клонов межвидовых гибридов культурного картофеля, созданных на основе многоэтапных скрещиваний с дикими видами *S. incamayoense*, *S. alandiae*, *S. doddssii*, *S. cardiophyllum*, *S. hondelmannii*, в результате пассивирования популяции

нематод на одном генотипе растения описаны в работе (Мироненко и др., 2013).

Результаты взаимодействия патогена и хозяина фенотипически выражаются в увеличении агрессивности отселектированных особей патогена. Количественные аспекты взаимодействия грибов и оомицетов с растениями, характеризующие эрозию частичной устойчивости растения-хозяина и увеличение агрессивности патогена, отражены в обзорах (Pariaud et al., 2009; Mundt, 2014). В работе (Delmas et al., 2016) изучено влияние частичной устойчивости хозяина на фенотипические признаки, особенно на агрессивность, возбудителя милдью (*Plasmopara viticola*) винограда. Показано, что изоляты этого патогена, выделенные из устойчивых хозяев, были более агрессивны (имели более короткий латентный период и более интенсивное спорообразование) по сравнению с изолятами, выделенными из восприимчивых образцов. Нами проведен анализ генетической изменчивости популяций *S. endobioticum* с использованием ДНК-маркеров и показано, что, несмотря на отсутствие различий вирулентности к набору сортов-дифференциаторов, образцы популяций из Московской области, Белоруссии и Украины различались по агрессивности к шести восприимчивым сортам картофеля и имели существенные различия по генотипическому составу (Мироненко и др., 2009).

Результаты генотипирования исходной и отселектированных на слабоустойчивых гибридных клонах популяций *G. rostochiensis* подтвердили гипотезу адаптивного отбора вирулентных особей *G. rostochiensis* по механизму «бутылочного горлышка» (bottleneck) (Мироненко и др., 2015). Ранее такой механизм отбора был описан для бледной нематоды *G. pallida* (Whitehead, 1991; Turner, Fleming, 2002). При этом использовали методологический подход, основанный на концепции сходства генных пулов (gene-pool similarity concept) (Bakker et al., 1993), широко применяемый в популяционных исследованиях цистообразующих нематод. Подобный принцип анализа был предложен для генотипирования популяций *G. rostochiensis* методом секвенирования (genotyping-by-sequencing) (Mimee et al., 2015).

Полученные результаты позволяют утверждать, что возделывание в производстве слабо повреждаемых нематодой сортов может стимулировать адаптационную изменчивость возбудителя глободероза картофеля и приводить к отбору вирулентных патотипов в течение 2–3 генераций патогена (Мироненко и др., 2015).

Адаптивная эволюция нематоды в процессе преодоления устойчивости хозяина стала предметом активных исследований с использованием новейших достижений популяционной геномики. Результаты полногеномного секвенирования *G. rostochiensis* (Eves-van den Akker et al., 2016) показали, что у нее, как у других эукариотических фитопатогенов, например *Phytophthora infestans* (Rafaele, Kamoun, 2012), гены-эффекторы не случайным образом распределены в геноме паразита, а локализованы в особых районах генома. Таким образом, на *G. rostochiensis* в полной мере распространяется модель «двухскоростного генома», объясняющая быструю эволюцию фитопатогенов и преодоление ими генов устойчивости растений-хозяев.

Предложенная модель основана на новых данных, полученных в результате расшифровки геномов филamentosных патогенов (оомицетов и мицелиальных грибов). Было показано, что гены, кодирующие эффекторы грибов, ассоциированы с повторяющимися последовательностями ДНК (Dong et al., 2015). Существует теория, что гены, расположенные в районах, богатых повторами, эволюционируют быстрее. Таким образом, в геноме фитопатогенов гены, кодирующие признаки вирулентности и патогенности, эволюционируют быстрее остальных генов, что способствует быстрой изменчивости и адаптации патогенов к новым условиям.

Для патосистемы картофель–*Synchytrium endobioticum* изучена возможность адаптации возбудителя рака картофеля к двум слабоустойчивым (балл 3.5–4) образцам – *S. tuberosum* ssp. *andigenum* к-1741 и к-12892. Экспериментальные данные подтверждают гипотезу, что для среднеустойчивых образцов картофеля с определенным уровнем неспецифической устойчивости к возбудителю рака *S. endobioticum*, выражающейся в снижении продуктивности паразита, создается опасность адаптации паразита. В связи с жесткими карантинными ограничениями, включающими запрет выращивания картофеля в зарегистрированных очагах, адаптационные процессы в популяции паразита вряд ли возможны. По-видимому, этим объясняется распространение на территории России только одной расы 1 возбудителя рака (Мироненко и др., 2009).

Таким образом, в связи с широким распространением и высокой вредоносностью в РФ карантинных болезней картофеля, таких как рак и ЗКН, и отсутствием химических средств борьбы основным способом защиты является возделывание устойчивых сортов картофеля. Для практической селекции устойчивых сортов необходимы сведения о патотипном составе возбудителей, эффективных методах определения устойчивости, генетическом разнообразии устойчивости картофеля к этим патогенам. При выборе источников устойчивости для селекции следует учитывать возможность адаптации патогенов к слабоустойчивым сортам.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Science Foundation, project 16-16-04073.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Afanasenko O.S., Mironenko N.V., Khiutti A.V. Meeting of the Euphrates expert group (European phytosanitary research cooperation) to improve the analysis methods of the potato wart populations (*Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc.). Vestnik zashchity rasteniy = Plant Protection News. 2013;4:77. (in Russian)
- 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 based on polymorphism of SSR loci and markers associated with *R*-genes of resistance. Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):596-606. (in Russian)
- Asano K., Kobayashi A., Tsuda S., Nishinaka M., Tamiya S. DNA marker-assisted evaluation of potato genotypes for potential re-

- sistance to potato cyst nematode pathotypes not yet invading into Japan. *Breed. Sci.* 2012;62(2):142-150. DOI 10.1270/jsbbs.62.142.
- Baayen R.P., Cochius G., Hendriks H., Meffert J.P., Bakker J., Bekker M., van den Boogert P.H.J.F., Stachewicz H., van Leeuwen G.C.M. History of potato wart disease in Europe – a proposal for harmonisation in defining pathotypes. *Eur. J. Plant Pathology.* 2006; 116:21-31. DOI 10.1007/s10658-006-9039-y.
- Bakker J., Achenbach U., Bakker J., van Vliet J., Peleman J., Segers B., van der Heijden S., van der Linde P., Graveland R., Hutten R., van Eck H., Coppoolse E., van der Vossen E., Bakker J., Govers A. A high-resolution map of the *H1* locus harboring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Theor. Appl. Genet.* 2004;109(1):146-152. DOI 10.1007/s00122-004-1606-z.
- Bakker J., Folkertsma R.T., van der Voort R., Boer J.M., Gommers F.J. Changing concepts and molecular approaches in the management of virulence genes in potato cyst nematodes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1993;31:169-190. DOI 10.1146/annurev.py.31.090193.001125.
- Ballvora A., Flath K., Lubeck J., Strahwald J., Tacke E., Hoffert H.-R., Gebhardt C. Multiple alleles for resistance and susceptibility modulate the defense response in the interaction of tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) with *Synchytrium endobioticum* pathotypes 1, 2, 6 and 18. *Theor. Appl. Genet.* 2011;123:1281-1292.
- Barone A., Ritter E., Schachtshabel U., Debener T., Salamini F., Gebhardt C. Localization by restriction fragment length polymorphism mapping in potato of a major dominant gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol. Gen. Genet.* 1990;224(2):177-82. DOI 10.1007/BF00271550.
- Biryukova V.A., Shmyglya I.V., Abrosimov S.B., Zapekina T.I., Melshin A.A., Mityushkin A.V., Manankov V.V. The search for sources of resistance genes to pathogens among the samples of plant breeding and genetics collections of the All-Russia Research Institute of Potato Farming using molecular markers. *Zashhita kartofelya = Potato Protection.* 2015;1:3-7. (in Russian)
- Biryukova V.A., Shmyglya I.V., Melshin A.A., Mityushkin A.V., Manankov V.V., Abrosimova S.B. Examination of genetic collections of the All-Russia Research Institute of Potato Farming using molecular markers. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC.* 2016;30(10):22-26. (in Russian)
- Biryukova V.A., Zhuravlev A.A., Abrosimova S.B., Kostina L.I., Khromov L.M., Shmyglya I.V., Morozova N.N., Kirsanova S.N. The use of molecular markers of *H1* and *Gro1* genes of resistance to golden potato cyst nematode. *Doklady Rossiyskoy Akademii Selskokhozyaystvennykh Nauk = Proceedings of the Russian Academy of Agricultural Sciences.* 2008;6:3-6. (in Russian)
- Braun H. Biologische Spezialisierung bei *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. *Zeitschr. Pflanzenkrankh. u. Pflanzenschutz.* 1942; 52(11):481-486.
- Brugmans B., Hutten R.G.B., Rookmaker N., Visser R.G.F., van Eck H.J. Exploitation of a marker dense linkage map of potato for positional cloning of a wart disease resistance gene. *Theor. Appl. Genet.* 2006;112(2):269-277. DOI 10.1007/s00122-005-0125-x.
- Bryan G.J., McLean K., Bradshaw J.E., De Jong W.S., Phillips M., Castelli L., Waugh R. Mapping QTLs for resistance to the cyst nematode *Globodera pallida* derived from the wild potato species *Solanum vernei*. *Theor. Appl. Genet.* 2002;105(1):68-77. DOI 10.1007/s00122-002-0873-9.
- CABI/EPPO. *Globodera rostochiensis*. Distribution maps of plant diseases. (2011). Available at <http://www.cabi.org>.
- CABI/EPPO. *Synchytrium endobioticum*. Distribution maps of plant diseases. (2015). Available at <http://www.cabi.org>.
- Caromel B., Mugniery D., Kerlan M.-C., Andrzejewski S., Palloix A., Ellissèche D., Rousselle-Bourgeois F., Lefebvre V. Resistance quantitative trait loci originating from *Solanum sparsipilum* act independently on the sex ratio of *Globodera pallida* and together for developing a necrotic reaction. *Mol. Plant-Microbe Interactions.* 2005; 18(11):1186-1194.
- Dale M.F.B., Phillips M.S. Variation for the degree of susceptibility to the potato cyst nematode (*Globodera pallida*) within *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*. *Potato Res.* 1985;28(1):55-64. DOI 10.1007/BF02357570.
- Delmas C.E.L., Fabre F., Jolivet J., Mazet I.D., Cervera S.R., Deliere L., Delmotte F. Adaptation of a plant pathogen to partial host resistance: selection for greater aggressiveness in grapevine downy mildew. *Evol. Applications.* 2016;9(5):709-725. DOI 10.1111/eva.12368.
- Dong S., Raffaele S., Kamoun S. The two-speed genomes of filamentous pathogens: waltz with plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2015;35: 57-65. DOI 10.1016/j.gde.2015.09.001.
- Ellenby C. Resistance to the potato-root eelworm *Heterodera rostochiensis* Wollenweber. 1952;170(4337):1016.
- EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests. 2003. <https://www.eppo.int/>.
- EPPO. Pest quarantine database. Paris, France. 2014. <http://www.eppo.int/>.
- Eves-van den Akker S., Laetsch D.R., Thorpe P., Lilley C.J., Danchin E.G.J., Da Rocha M., Rancure C., Holroyd N.E., Cotton J.A., Sztienberg A., Grenier E., Montarry J., Mimeo B., Duceppe M.-O., Boyes I., Marvin J.M.C., Jones L.M., Yusup H.B., Lafond-Lapalme J., Esquibet M., Sabeh M., Rott M., Overmars H., Finkers-Tomczak A., Smant G., Koutsovoulos G., Blok V., Mantelin S., Cock P.J.A., Phillips W., Henrissat B., Urwin P.E., Blaxter M., Jones J.T. The genome of the yellow potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, reveals insights into the basis of parasitism and virulence. *Genome Biology.* 2016;17:124. DOI 10.1186/s13059-016-0985-1.
- Finkers-Tomczak A., Bakker E., Boer J., Vossen E., Achenbach U., Golas T., Suryaningrat S., Smant G., Bakker J., Govers A. Comparative sequence analysis of the potato cyst nematode resistance locus *H1* reveals a major lack of co-linearity between three haplotypes in potato (*Solanum tuberosum* ssp.) *Theor. Appl. Genet.* 2011;122:595-608. DOI 10.1007/s00122-010-1472-9.
- 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(1):165-173. DOI 10.1007/s00122-009-1026-1.
- Flath K., Przetakiewicz J., van Rijswijk P.C.J., Ristau V., van Leeuwen G.C.M. Interlaboratory tests for resistance to *Synchytrium endobioticum* in potato by the Glynne-Lemmerzähl method. *EPPO Bull.* 2014;44(3):510-517. DOI 10.1111/epp.12167.
- Fournet S., Kerlan M.C., Renault L., Dantec J.P., Rouaux C., Montarry J. Selection of nematodes by resistant plants has implications for local adaptation and cross-virulence. *Plant Pathology.* 2013;62(1): 184-193. DOI 10.1111/j.1365-3059.2012.02617.x.
- Gagnon M.C., van der Lee T.A., Bonants P.J., Smith D.S., Li X., Lévesque C.A., Bilodeau G.J. Development of polymorphic microsatellite loci for potato wart from next-generation sequence data. *Phytopathology.* 2016;106(6):636-644. DOI 10.1094/PHYTO-12-15-0317-R.
- Galanova C.S. Rasprostraneniye i vredonosnost' vozbuditelya raka kartofelya [The prevalence and harmfulness of the potato wart pathogen]. *Rak kartofelya i mery bor'by s nim* [Potato wart and control measures]. Leningrad, Kolos Publ., 1964;5-22. (in Russian)
- Galek R., Rurek M., De Jong W.S., Pietkiewicz G., Augustyniak H., Sawicka-Sienkiewicz E. Application of DNA markers linked to the potato *H1* gene conferring resistance to pathotype Ro1 of *Globodera rostochiensis*. *J. Appl. Genetics.* 2011;52(4):407-411. DOI 10.1007/s13353-011-0056-y.
- Gebhardt C. Bridging the gap between genome analysis and precision breeding in potato. *Trends in Genetics.* 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.
- Gebhardt C., Mugniery D., Ritter E., Salamini F., Bonnel E. Identification of RFLP markers closely linked to the *H1* gene conferring

- resistance to *Globodera rostochiensis* in potato. Theor. Appl. Genet. 1993;85:541-544. DOI 10.1007/BF00220911.
- Glynn M.D. Infection experiments with wart disease of potatoes *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. Annals Appl. Biology. 1925; 12:34-60.
- Guskova A.A. Diseases caused by nematodes. Diseases of cultivated plants. St.-Petersburg, 2005;204-215. (in Russian)
- Hamilton J., Hansey C., Whitty B., Stoffel K., Massa A., Van Deynze A., De Jong W., Douches D., Buell C.R. Single nucleotide polymorphism discovery in elite North American potato germplasm. BMC Genom. 2011;12(1):302. DOI 10.1186/1471-2164-12-302.
- Hampson M.C. A bioassay for *Synchytrium endobioticum* using micro-propagated potato plantlets. Can. J. Plant Pathol. 1992;14:289-292.
- Hampson M.C. History, biology and control of potato wart disease in Canada. Can. J. Plant Pathol. 1993;15:223-244.
- Hawkes J.G. The Potato, Evolution, Biodiversity and Genetic Resources. Oxford, UK: Belhaven Press, 1990.
- Hehl R., Faurie E., Hesselbach J., Salamini F., Witham S., Baker B., Gebhardt C. TMV resistance gene *N* homologues are linked to *Synchytrium endobioticum* resistance in potato. Theor. Appl. Genet. 1999;98:379-386. DOI 10.1007/s001220051083.
- Jacobs J.M.E., van Eck H.J., Horsman K., Arens P.F.P., Verkerk-Bakker B., Jacobsen E., Pereira A., Stiekema W.J. Mapping of resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* from the wild potato species *Solanum vernei*. Mol. Breeding. 1996;2:51-60. DOI 10.1007/BF0017135.
- Khiutti A., Afanasenko O., Antonova O., Shuvalov O., Novikova L., Krylova E., Chalaya N., Mironenko N., Spooner D., Gavrilenko T. Characterization of resistance to *Synchytrium endobioticum* in cultivated potato accessions from the collection of Vavilov Institute of Plant Industry. Plant Breeding. 2012;131(6):744-750. DOI 10.1111/j.1439-0523.2012.02005.x.
- Köhler E. Methodische Bemerkungen zum Infektionsverfahren nach Spieckermann. Fortschritte der Landwirtschaft. 1927;2:115-118.
- Kort J., Ross H., Rumpfenhorst R.J., Stone A.R. An International scheme for identifying and classifying pathotypes of potato cyst-nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. Nematologica. 1977;23(3):333-339.
- Kreike C.M., de Koning J.R.A., Vinke J.H., van Ooijen J.W., Gebhardt C., Stiekema W.J. Mapping of loci involved in quantitatively inherited resistance to the potato cyst-nematode *Globodera rostochiensis* pathotype Ro1. Theor. Appl. Genet. 1993;87:464-470.
- Kreike C.M., Kok-Westeneng A.A., Vinke J.H., Stiekema W.J. Mapping of QTLs involved in nematode resistance, tuber yield and root development in *Solanum* sp. Theor. Appl. Genet. 1996;92:463-470.
- Kubich A. Pytanie matwiku ziemniaczanum w Hollandui. Ochrona Roslin. 1963;4:11-13.
- Kuzminova O.A., Staszewski Z., Vologin S.G., Gimaeva E.A. The study of potato breeding material using a molecular genetic analysis for the presence of genes for resistance to *Globodera rostochiensis*. Materialy Vseross. zaochnoj nauchno-prakt. konferencii molodyh uchenyh, posvjashhennoj pamjati R.G. Gareeva "Sovremennye tehnologii vyrashhivaniya s/h kul'tur". Kazan' [Proceedings of the scientific-practical conference of young scientists dedicated to the memory of R.G. Gareev "Modern technologies of growing crops"], Kazan. 2015;88-97.
- Laidlaw W.M.R. A method for the detection of the resting sporangia of potato wart disease (*Synchytrium endobioticum*) in the soil of old outbreak sites. Potato Res. 1985;28:223-232.
- Langerfeld E., Stachewicz H. Assessment of varietal reactions to potato wart (*Synchytrium endobioticum*) in Germany. Bull. OEPP/EPPO Bull. 1994;24:793-798.
- Lellbach H., Effmert M. Ergebnisse einer Diallelanalyse zur Vererbung der Resistenz gegen *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc., pathotyp 1 (D1) bei Kartoffeln (*Solanum tuberosum* L.). Potato Res. 1990;33(2):251-256.
- Lemmerz J. Neues vereinfachtes infektionsverfahren zur Prüfung von Kartoffelsorten auf Krebsfestigkeit. J. Lemmerz. Züchter. 1930;2:288-297.
- Lemmerz J. Zur Methodik der Krebsprüfung von Kartoffelstämmen. Züchter. 1931;3:138-152.
- Limantseva L., Mironenko N., Shuvalov 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 from the Vavilov Institute of Plant Industry. Plant Breeding. 2014;133(5):660-665.
- Lopez-Pardo R., Barandalla L., Ritter E., Ruiz de Galarreta J.I. Validation of molecular markers for pathogen resistance in potato. Plant Breeding. 2013;132(3):246-251. DOI 10.1111/pbr.12062.
- Luksha V.I., Voronkova E.V., Gukasjan O.N., Ermishin A.P. Otsenka pervichnykh digaploidov *S. tuberosum* na nalichie genov ustoychivosti k bolezniam i vreditelyam metodom PTsR-analiza [Evaluation of primary dihaploids *S. tuberosum* for the presence of genes for resistance to diseases and pests by PCR analysis]. Molekulyarnaya i prikladnaya genetika. Sbornik nauchnyh trudov Instituta genetiki i citologii nacional'noj akademii nauk Belarusi. [Molecular and Applied Genetics. Bulletin of the Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus]. Minsk, 2012;13:82-87.
- Melnik P.A. Wart disease of potato, *Synchytrium endobioticum* (Schilbersky) Percival. 1998; EPPO Tech. Docum. No. 1032.
- Milczarek D. A multiplex PCR method of detecting markers linked to genes conferring resistance to *Globodera rostochiensis*. Am. J. Potato Res. 2012;89(2):169-171. DOI 10.1007/s12230-011-9227-y.
- 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.
- Milczarek D., Przetakiewicz A., Kaminski P., Flis B. Early selection of potato clones with the *H1* resistance gene – the relation of nematode resistance to quality characteristics. Czech J. Genet. Plant Breeding. 2014;50(4):278-284.
- Mimee B., Duceppe M.-O., Véronneau P.-Y., Lafond-Lapalme J., Jean M., Belzile F., Bélair G. A new method for studying population genetics of cyst nematodes based on Pool-Seq and genomewide allele frequency analysis. Mol. Ecol. Res. 2015; DOI 10.1111/1755-0998.12412.
- Mironenko N.V., Afanasenko O.S., Rogozina E.V. Variability of gene pool of *Globodera rostochiensis* Woll. population as a result of selection on weakly resistant potato hybrid clones. Vestnik zashchity rasteniy = Plant Protection News. 2015;2(84):24-28.
- Mironenko N.V., Afanasenko O.S., Rogozina E.V., Limantseva L.A., Khiutti A.V., Antonova O.Yu., Shuvalov O.Yu., Novikova L.Yu., Gavrilenko T.A. Mechanisms of interaction of *Globodera rostochiensis* with the partially resistant interspecific potato hybrids. Vestnik zashchity rasteniy = Plant Protection News. 2013;4:37-42.
- Mironenko N.V., Khiutti A.V., Afanasenko O.S. Characteristics of *Synchytrium endobioticum* populations on virulence, aggressiveness and DNA-markers. Mikologiya i fitopatologiya = Mycology and Phytopathology. 2009;43(5):460-469.
- 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.
- Mundt C.C. Durable resistance: a key to sustainable management of pathogens and pests. Infection, Genet. Evolution. 2014;27:446-455. DOI 10.1016/j.meegid.2014.01.011.
- Niewöhner J., Salamini F., Gebhardt C. Development of PCR assays diagnostic for RFLP marker alleles closely linked to alleles *Gro1* and *H1*, conferring resistance to the root cyst nematode *Globodera rostochiensis* in potato. Mol. Breeding. 1995;1(1):65-78.
- Noble M., Glynn M.D. Wart disease of potatoes. FAO Plant Protection Bull. 1970;18(6):125-135.
- Obidiegwu J.E., Flath K., Gebhardt C. Managing potato wart: a review of present research status and future perspective. Theor. Appl. Genet. 2014;127(4):763-780.
- OEPP/EPPO. EPPO Standards PM 7/28. Diagnostic protocols for regulated pests: *Synchytrium endobioticum*. Bull. OEPP/EPPO Bull. 2004;34:213-218.

- OEPP/EPPO. Testing of potato varieties to assess resistance to *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. Bull. OEPP/EPPO Bull. 2006;36:419-420.
- Paal J., Henselewski H., Muth J., Meksem K., Menéndez C.M., Salamini F., Ballvora A., Gebhardt C. Molecular cloning of the potato *Gro1-4* gene conferring resistance to pathotype RoI of the root cyst nematode *Globodera rostochiensis*, based on a candidate gene approach. Plant J. 2004;38(2):285-297.
- Pariaud B., Ravigné V., Halkett F., Goyeau H., Carlier J., Lannou C. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. Plant Pathol. 2009;58(3):409-424. DOI 10.1111/j.1365-3059.2009.02039.x.
- Parlevliet J.E., Zadoks J.C. The integrated concept of disease resistance: a new view including horizontal and vertical resistance in plants. Euphytica. 1977;26(1):5-21. DOI 10.1007/BF00032062.
- Phillips M.S., Trudgill D.L. Variation in virulence, in terms of quantitative reproduction of *Globodera pallida* populations, from Europe and South America, in relation to resistance from *Solanum vernei* and *S. tuberosum* ssp. *andigena* CPC 2802. Nematologica. 1998;44:409-423.
- Pineda O., Bonierbale M.W., Plaisted R.L., Brodie B.B., Tanksley S.D. Identification of RFLP markers linked to the *H1* gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. Genome. 1993;36(1):152-156.
- Pinin I.Ya. K metodike ispytaniya sortov i seyantsev kartofelya na ustoychivost' k kartofel'noy nematode [A method of testing varieties and potato seedlings for resistance to potato cyst nematode]. Materialy I Resp. konf. molodykh uchenykh [Proceedings of the First Republican Conference of Young Scientists]. Minsk, 1974;141-146.
- Raffaele S., Kamoun S. Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better. Nature Reviews. Microbiology. 2012;10(6):417-430. DOI 10.1038/nrmicro2790.
- Ramakrishnan A.P., Ritland C.E., 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.
- Rice S.L., Leadbeater B.S.C., Stone A.R. Changes in cell structure in roots of resistant potatoes parasitized by potato cyst-nematodes. I. Potatoes with resistance gene *H1* derived from *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. Physiol. Plant Pathol. 1985;27(2):219-234. DOI 10.1016/0048-4059(85)90069-4.
- Sattarzadeh A., Achenbach U., Lübeck J., Strahwald J., Tacke E., Hofferbert H.-R., Rothsteyn T., Gebhardt C. Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping as basis for developing a PCR based marker highly diagnostic for potato varieties with high resistance to *Globodera pallida* pathotype Pa2/3. Mol. Breeding. 2006;18(4):301-312. DOI 10.1007/s11032-006-9026-1.
- Schultz L., Cogan N.O.I., McLean K., Dale M.F.B., Bryan G.J., Forster J.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 Breeding. 2012;131:315-321. DOI 10.1111/j.1439-0523.2012.01949.x.
- Spieckermann A., Kothoff P. Die Prüfung von Kartoffeln auf Krebsfestigkeit. Deutsche Landwirtschaftliche Presse. 1924;51:114-115.
- Stone A.R. Co-evolution of potato cyst nematodes and their hosts: implications for pathotypes and resistance. Bull. OEPP/EPPO Bull. 1985;15:131-131. DOI 10.1111/j.1365-2338.1985.tb00212.x.
- Takeuchi T., Sasaki J., Suzuki T., Horita H., Iketani S. High-resolution maps and DNA markers of the *Potato virus Y* resistance gene *Ry^{ych}* and the potato cyst nematode resistance gene *H1*. Breed. Res. 2008;10(1):148.
- Toxopeus H.J., Huijsman C.A. Breeding for resistance to potato root eelworm. I. Preliminary data concerning the inheritance and the nature of resistance. Euphytica. 1953;2(3):180-186. DOI 10.1007/BF00053725.
- Turner S.J., Fleming C.C. Multiple selection of potato cyst nematode *Globodera pallida* virulence on a range of potato species. I. Serial selection on *Solanum*-hybrids. Eur. J. Plant Pathol. 2002;108(5):461-467. DOI 10.1023/A:1016018002152.
- Van der Voort J.R., Wolters P., Folkertsma R., Hutten R., van Zandvoort P., Vinke H., Kanyuka K., Bendahmane A., Jacobsen E., Janssen R., Bakker J. Mapping of the cyst nematode resistance locus *Gpa2* in potato using a strategy based on comigrating AFLP markers. Theor. Appl. Genet. 1997;95(5):874-880. DOI 10.1007/s001220050638.
- Van der Vossen E.A.G., van der Voort J.R., Kanyuka K., Bendahmane A., Sandbrink H., Baulcombe D.C., Bakker J., Stiekema W.J., Klein-Lankhorst R.M. Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. Plant J. 2000;23(5):567-576. DOI 10.1046/j.1365-3113x.2000.00814.x.
- Whitehead A.G. Selection for virulence in the potato cyst-nematode, *Globodera pallida*. Annals Appl. Biology. 1991;118(2):395-402. DOI 10.1111/j.1744-7348.1991.tb05639.x.
- Winslow R.D., Willis R.J. Nematode diseases of potatoes. II. Potato cyst nematode, *Heterodera rostochiensis*. Economic Nematology. Ed. J. Webster. N.Y.: Acad. Press, 1972;18-34.
- Yakovleva V.I. Ispol'zovanie dikikh i kul'turnykh vidov pri vyvedenii rakoustoychivyykh sortov kartofelya [The use of wild and cultivated species in breeding resistant potato varieties]. Rak kartofelya i mery bor'by s nim [Potato wart and control measures]. Leningrad, Kolos, 1964;62-77.
- Yakovleva V.A., Dolyagin A.B. (Eds.). Polozhenie o poryadke ispytaniya sortov i gibridov kartofelya na ustoychivost' k vozbuditelyu raka kartofelya (patotip I) i zolotistoy kartofel'noy nematode (patotip RoI) [Regulations on the testing of varieties and hybrids of potatoes for resistance to the agent of potato wart (pathotype I) and golden potato cyst nematode (pathotype Ro I)]. Moscow, 1993.
- Yakovleva V.I., Saltykova L.P. The aggressiveness of the potato wart agent. Zashita rasteniy = Plant Protection. 1966;7:51.
- Yakovleva V.I., Saltykova L.P. (Eds.). Laboratornaya diagnostika rakoustoychivosti kartofelya metodom zarazheniya rostkov ot svezhikh rakovykh narostov (metodicheskie ukazaniya) [Laboratory diagnostics of wart resistance in potato by inoculation of sprouts with fresh wart material: guidelines]. Moscow, VASKhNIL Publ., 1979.

Устойчивость картофеля к вирусам: современное состояние и перспективы

С.С. Макарова^{1, 2}, В.В. Макаров^{1, 3}, М.Э. Тальянский^{1, 4}✉, Н.О. Калинина^{1, 3}

¹ ООО «Дока-Генные Технологии», Московская область, Дмитровский район, Рогачево, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», биологический факультет, Москва, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, Россия

⁴ Институт Джеймса Хаттона, Инверговри, Данди, Шотландия, Великобритания

Одна из важнейших продовольственных культур в мире, картофель (*Solanum tuberosum*) заражается многими вирусами, девять из которых имеют важное экономическое значение, вызывая существенные потери урожая и заметное снижение качества продукции. Для минимизации последствий вирусных инфекций в странах с высоким уровнем развития сельского хозяйства поддерживаются и совершенствуются санитарные меры, предусматривающие постоянный мониторинг распространения вирусов и сертификацию посадочного материала на основе диагностики и оздоровления сортов картофеля. Однако в долгосрочной перспективе предпочтительным является создание устойчивых к вирусам сортов картофеля. Методами традиционной селекции и генно-инженерными методами с использованием генов природной устойчивости, источником которых, как правило, служат дикорастущие виды *Solanum*, или с помощью вирус-специфических последовательностей к настоящему времени получен ряд сортов/линий картофеля, устойчивых к большинству вирусов. Однако названные подходы имеют существенные ограничения, обусловленные, в частности, тем, что приобретаемая устойчивость специфична (против отдельных вирусов), недолговременна и способна преодолеваться вирусом, а также наличием регуляторных запретов на использование генно-модифицированных растений. На современном этапе новые технологии редактирования генома с целью дизайна генов открывают широкие возможности для создания новой генерации генов устойчивости. Наиболее перспективными представляются: направленный мутагенез генов специфической устойчивости для придания им более широкого спектра действия; использование генов неспецифической или «нехозяйской» устойчивости (non-host resistance), что позволяет получать растения, устойчивые к неродственным вирусам, а в некоторых случаях и к другим патогенам и даже абиотическим стрессам. Идентификация генов, вовлеченных в механизмы «нехозяйской» устойчивости, только начинается. Новым источником неизвестных до настоящего времени факторов, вовлеченных в разнообразие сигнальные пути защитного ответа растения на вирусную инфекцию, является клеточное ядро. Описанию подходов и проблем, связанных с получением устойчивых к вирусным инфекциям растений картофеля, посвящен настоящий обзор.

Ключевые слова: картофель; вирусы картофеля; гены устойчивости; защитный ответ; факторы клеточного ядра.

Resistance to viruses of potato: current status and prospects

S.S. Makarova^{1, 2}, V.V. Makarov^{1, 3},
M.E. Taliansky^{1, 4}✉, N.O. Kalinina^{1, 3}

¹ "DokaGene Technologies" Company Ltd, Moscow region, Dmitrov district, Rogachevo, Russia

² Department of Biology Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁴ The James Hutton Institute, Invergowrie, DD2 5DA, Dundee, UK

The potato (*Solanum tuberosum*), one of the most important food crops in the world, is infected by various viruses, nine of which have great economic significance, causing substantial losses in the yield and quality of the crop. To minimize consequences of virus infections, in developed countries specific phytosanitary measures have been established and are being improved to monitor the spread of viruses and certify seed potato material using virus diagnostics and production of virus-free potato cultivars. However, in the longer-term, the development and deployment of potato cultivars resistant to viruses would be a priority. Some new potato cultivars and lines resistant to many viruses have already been generated using either traditional breeding methods or genetic engineering. For this purpose, natural resistance genes, primarily from wild *Solanum* species, or virus derived nucleotide sequences have been used as sources of resistance. However, these approaches have essential limitations because the acquired resistance is highly specific (against individual viruses only), is not durable, can be overcome by viruses and, finally due to regulatory bans on genetically modified organisms. Recently developed new genome editing technologies with the potential to be a powerful tool for gene design open up broad opportunities for development of next-generation resistance genes. The most promising approaches are (1) site-directed mutagenesis of the genes conferring specific resistance to make their action much broader and (2) the use of non-specific (non-host) resistance to generate plants resistant to unrelated viruses and, in some cases, to other pathogens and even abiotic stresses. Identification of genes involved in mechanisms of non-host resistance is just beginning. The cell nucleus is a new source of novel

factors involved in various signaling pathways resulting in defence response to virus infection. This review focuses on the approaches and challenges related to the development of potato plants resistant to virus infections.

Keywords: potato; potato viruses; resistance genes; defense response; factors of cell nucleus.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Макарова С.С., Макаров В.В., Тальянский М.Э., Калинина Н.О. Устойчивость картофеля к вирусам: современное состояние и перспективы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(1):62-73. DOI 10.18699/VJ17.224

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Makarova S.S., Makarov V.V., Taliansky M.E., Kalinina N.O. Resistance to viruses of potato: current status and prospects. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):62-73. DOI 10.18699/VJ17.224

Картофель (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* L.) – четвертая по значению продовольственная культура в мире (после риса, пшеницы и кукурузы) и первая незерновая. Его суммарная продукция в 2012 г. составила 365 млн т, из них 29.5 млн т было произведено в Российской Федерации (<http://faostat.fao.org>). Для РФ картофель является одной из основных сельскохозяйственных культур.

Урожайность и качество картофеля зависят от степени его зараженности рядом патогенов, включая бактерии, грибы, вирусы и виоиды. Вирусная инфекция способна наносить этой продовольственной культуре значительный ущерб. Несмотря на то что описано более 40 вирусов, заражающих картофель в естественных условиях, только девять из них имеют важное экономическое значение для мирового картофелеводства. Это вирус скручивания листьев картофеля (potato leafroll virus – PLRV), вирусы картофеля A, M, S, V, X и Y (potato viruses A, M, S, V, X, Y – PVA, PVM, PVS, PVV, PVX и PVY), вирус метельчатости верхушек картофеля (potato mop-top virus – PMTV) и вирус погребковости табака (tobacco rattle virus – TRV). Для РФ карантинными объектами, на которые проводится диагностика элиты и семенного картофеля высоких репродукций, являются восемь вирусов картофеля: PLRV, PVA, PVM, PVS, PVX и PVY (включая некротические штаммы PVY), PMTV и TRV. Следует отметить, что экономический ущерб от перечисленных вирусов варьирует в зависимости от региона (географической территории), штамма вируса, наличия смешанных инфекций, активности переносчиков (векторов), климатических условий и в целом от уровня развития сельского хозяйства.

Современный картофель (*S. tuberosum* ssp. *tuberosum*) представляет собой тетраплоид, полученный путем продолжительной селекции интродуцированного в Европе культивируемого картофеля *Andigena* (*S. tuberosum* ssp. *andigena*), привезенного в конце XVI в. из Южной Америки. К началу XX в. остро встала проблема прогрессирующего ухудшения/дегенерации культуры картофеля, которая выражалась в значительном снижении его урожайности, качества и сроков хранения и была обусловлена в том числе и вирусными инфекциями (Salaman, Pethybridge, 1921). Для решения этой проблемы были разработаны схемы сертификации посадочного материала, и началась селекция картофеля на устойчивость к вирусным инфекциям. В настоящее время предпочтительным направлением развития высокоэффективного картофе-

ледства (по сравнению с применяемыми санитарными мерами, которые требуют интенсивной работы специализированных лабораторий по диагностике и оздоровлению сортов и являются затратными и трудно поддерживаемыми) стало создание устойчивых к вирусным инфекциям линий/сортов картофеля с помощью технологий биоинженерии.

В обзоре кратко охарактеризованы наиболее важные вирусы, поражающие картофель, и приведены современные данные о механизмах устойчивости растений к вирусным инфекциям и достижениях по созданию вирусоустойчивых линий/сортов картофеля. Обсуждаются перспективы использования генов неспецифической устойчивости, особое внимание уделено функциям ядра как нового важного источника для идентификации неизвестных ранее ядерных факторов, способных активировать широкий спектр механизмов устойчивости растений к вирусам картофеля и различным патогенам в целом.

Экономически важные вирусы, поражающие картофель: краткая молекулярная характеристика, симптомы инфекции и способы распространения

Наиболее опасными вирусами в настоящее время считаются PLRV и PVY. Они распространены повсеместно и способны вызывать до 80 % потери урожая картофеля в зависимости от региона, сорта и различных факторов окружающей среды (Solomon-Blackburn, Barker, 2001). PLRV – типовой представитель рода *Polerovirus* семейства Luteoviridae. Основным хозяином вируса является картофель, хотя PLRV может заражать и другие виды семейства пасленовых. PLRV относится к флоэмоограниченным вирусам: его инфекционный цикл проходит только в клетках проводящей системы растения (Peter et al., 2008). Вирусные частицы имеют икосаэдрическую форму с диаметром 24 нм. Геном представлен одноцепочечной РНК (оцРНК) положительной полярности длиной около 6 тыс. нуклеотидов (Tacke et al., 1991; Brault et al., 2000). 5'-конец РНК ковалентно связан с небольшим белком VPg, 3'-конец не несет полиА последовательности. В геноме закодировано восемь открытых рамок трансляции (ОРТ), организованных в два генных кластера, разделенных небольшим межгенным участком. Экспрессия генов 5'-кластера происходит с геномной РНК, тогда как экспрессия генов 3'-кластера – с двух субгеномных РНК

(вирус-специфических РНК, считываемых с минус-цепи вирусной РНК для экспрессии генов (ОРТ), дистальных к 5'-концу геномной РНК) (Jaag et al., 2003; Łoniewska-Lwowska et al., 2009). Капсид преимущественно образован белком оболочки (БО) с молекулярной массой 23 кДа, который транслируется с ОРТ3, и белком с молекулярной массой 80 кДа (белок RT – readthrough), образованным в результате проскока слабого стоп-кодона при трансляции гена БО. Домен БО непосредственно участвует в формировании вириона, в то время как домен RT с молекулярной массой 57 кДа, входящий в состав полноразмерного белка RT, находится на поверхности вирусной частицы и необходим для переноса и заражения тлями (Lee et al., 2005; Peter et al., 2008).

У первично зараженных растений обычно наблюдается побледнение и покраснение кончиков верхних молодых листьев, которые скручиваются и становятся твердыми. Растения, выросшие из зараженных клубней (вторично зараженные), отличаются укороченными побегами и скрученными не только верхними, но и нижними листьями. И у первично, и у вторично зараженных растений может развиваться некроз клубней (Schmitz et al., 1997; Warren et al., 2005). Перенос PLRV от зараженного растения к незараженному осуществляется тлями (обычно *Myzus persicae*). Вирус проникает в ткани тлей при кормлении на зараженных растениях, циркулирует в их тканях (хотя и не реплицируется в них), попадает из пищеварительного тракта в слюнные железы и сохраняет способность к переносу в здоровые растения в течение всего оставшегося жизненного цикла тлей (Warren et al., 2005). Считается, что PLRV (наряду с PVY) – наиболее важный и опасный вирус картофеля, который обнаруживается во всех регионах его выращивания. В разных странах ежегодные потери урожая картофеля от PLRV варьируют от 20 до 90 %. Потери зависят от количества зараженных растений на поле, периода заражения и ряда других факторов (Rahman, Akanda, 2010). По некоторым оценкам, PLRV является причиной снижения урожая картофеля во всем мире на 20 млн т ежегодно (Wales et al., 2008).

PVY – типовой представитель рода *Potyvirus* семейства Potyviridae, представлен гибкими нитевидными вирионами со спиральной симметрией длиной 730 нм и диаметром 11 нм. Геном вируса представлен оцРНК положительной полярности длиной около 10 тыс. нуклеотидов. 5'-конец РНК ковалентно связан с белком VPg, на 3'-конец расположена полиА последовательность. Вирусные белки транслируются в виде единого полипротеина-предшественника, который затем процессируется тремя вирусными протеазами с образованием десяти зрелых белков (Karasev, Gray, 2013; Ivanov et al., 2014). Вирус существует как комплекс штаммов, которые индуцируют значительное разнообразие симптомов на листьях и клубнях картофеля, зависящих от сорта растения, штамма/штаммов вируса, времени инфицирования и факторов окружающей среды (Warren et al., 2005; Karasev, Gray, 2013). При заражении растений картофеля PVY снижаются урожайность и качество клубней. При адаптации к новым сортам картофеля в различных экологических условиях PVY способен эволюционировать как медленно – путем накопления мутаций в геноме, так и быстро – через рекомбинации

между различными штаммами. Номенклатура штаммов, циркулирующих в картофеле, и их свойства приведены в обзоре (Karasev, Gray, 2013).

PVY^O («обыкновенный» штамм) встречается повсеместно, вызывает слабую мозаичность листьев и задержку роста. В 1950-е гг. был обнаружен новый штамм – PVY^N, заражение которым приводит к некрозу жилок табака и последующей гибели листа. Интересно, что на картофеле, инфицированном этим штаммом, симптомы практически отсутствовали или наблюдалась слабая мозаичность листьев. В Европе штаммы PVY^O и PVY^N рекомбинировали с образованием штамма PVY^{NTN}, который на данный момент считается одним из самых опасных, поскольку вызывает кольцевую гниль клубней картофеля, что в итоге приводит к массовым потерям урожая. Кольцевая гниль клубней была впервые зафиксирована в 1980 г. в Венгрии, а к концу XX в. наблюдалась уже повсеместно. Наличие инфицированных растений в поле может привести даже к полной потере урожая. Кроме гнили клубней, у зараженных растений наблюдаются хлорозы и некрозы листьев уже через несколько дней после механической инокуляции растений вирусом. На вновь образованных (молодых) системно-зараженных листьях появляется морщинистость и развиваются хлорозы (Piche et al., 2004; Baldauf et al., 2006; Kogovšek et al., 2011). В настоящее время рекомбинантные штаммы PVY – PVY^N и PVY^{NTN} – по всему миру стали или становятся основными в регионах, производящих картофель. Вирус распространяется клубнями и с помощью тлей. Он не реплицируется и не циркулирует в тлях, а переносится на поверхности стилета. Заражение происходит в момент прокалывания стилетом тли здорового растения непосредственно после контакта с зараженным растением. Таким образом, инфицирование возможно только в очень короткий период времени (несколько минут). Поскольку стадии репликации и циркуляции вируса в организме тли отсутствуют, то отсутствует и специфическое узнавание вируса его переносчиком через взаимодействие белок-белок. Следствием этого является видонеспецифическое распространение PVY: более 50 видов тлей могут служить переносчиками этого вируса (Warren et al., 2005). Другой важный вирус картофеля, относящийся к роду *Potyvirus*, – PVA. Этот вирус, близкородственный PVY, распространен повсеместно, однако обычно ассоциирован с менее серьезными поражениями картофеля, чем PVY.

PVX является представителем рода *Potexvirus* семейства Alfaflexiviridae. Вирусные частицы гибкие нитевидные со спиральной симметрией, 515 нм длиной и 13 нм в диаметре. Геном представлен оцРНК положительной полярности длиной около 6.5 тыс. нуклеотидов. На 5'-конец РНК находится кэп, 3'-конец полиаденилирован. В геноме закодированы пять открытых рамок трансляции, первая из которых, кодирующая РНК-репликазу, экспрессируется с геномной РНК, остальные, кодирующие три транспортных белка и БО, – с субгеномных РНК (Morozov et al., 1983; Verchot-Lubicz et al., 2007; Scholthof et al., 2011; Massumi et al., 2014). PVX широко распространен в районах выращивания картофеля. Чаще инфекция протекает бессимптомно, но иногда на листьях появляется слабая пятнистость. Вместе с тем вирус может

вызывать заметное снижение в выходе клубней: инфицирование растений в поле в среднем приводит к 15–30 % потерям урожая (Senanayake, Mandal, 2014). Степень развития симптомов зависит от стадии роста растения, штамма вируса и условий окружающей среды (Massumi et al., 2014; Senanayake, Mandal, 2014). Несмотря на относительно слабые симптомы инфекции растений PVX при индивидуальном заражении, его патогенность для картофеля особенно сильно проявляется при совместной инфекции с неродственными вирусами, как правило, с представителями рода потивирусов. Наблюдаемый в этих случаях синергизм приводит к значительно большему накоплению каждого отдельного вируса в растениях и развитию сильных симптомов инфекции, что влечет за собой серьезные потери урожая (Aguilar et al., 2015; Lico et al., 2015). Для PVX не обнаружены насекомые-переносчики, он распространяется только механическим путем через сельскохозяйственные орудия при обработке полей и сборе урожая (Lico et al., 2015).

Вирус PVM входит в состав рода *Carlavirus* семейства Betaflexiviridae. Вирусные частицы представляют собой прямые, слегка изогнутые нити со спиральной симметрией (610–700 нм в длину и 12–15 нм в диаметре) (Brandes et al., 1959). Геном представлен оцРНК положительной полярности длиной около 8,5 тыс. нуклеотидов. РНК вируса полиаденилирована. В геноме закодированы шесть ОРТ, при трансляции которых образуются РНК-репликаза, три транспортных белка, БО и цистеин-богатый белок (Senshu et al., 2011). PVM считается одним из самых распространенных вирусов картофеля на планете. Встречается повсеместно. В некоторых местах зараженность картофеля достигает 100 %. Инфицирование PVM приводит к потерям урожая от 15 до 45 %. Заражение происходит при механической обработке картофеля на полях и с помощью тлей. Выраженность симптомов зависит от сорта картофеля и штамма вируса. Инфицированные растения отличаются укороченными побегами, искривленными скрученными листьями с мозаичной окраской (Xu et al., 2010).

PMTV является представителем рода *Potomovirus* семейства Virgaviridae. Вирионы жесткие палочковидные со спиральной симметрией, включают три молекулы оцРНК положительной полярности (Cеровска et al., 2007). Диаметр вирионов составляет 17 нм, а длина определяется размером молекулы РНК. РНК1 длиной около 6,5 тыс. нуклеотидов кодирует РНК-репликазу. РНК2 длиной около 3 тыс. нуклеотидов кодирует БО с молекулярной массой 20 кДа. При трансляции РНК2 при проскоке слабого стоп-кодона образуется белок с молекулярной массой около 67 кДа. Этот дополнительный домен (молекулярная масса 47 кДа) необходим для распространения вируса грибом *Spongospora subterranean* (Arif et al., 1995). РНК3 длиной около 3 тыс. нуклеотидов кодирует тройной блок транспортных генов и цистеин-богатый белок (Reavy et al., 1998; Latvala-Kilby et al., 2009). В природе вирус распространяется с помощью подвижных зооспор гриба *S. subterranean*, который вызывает мучнистую паршу клубней (Arif et al., 1995). Чаще всего заражение происходит при прорастании клубней, формировании столонов и корней в течение первых трех-четырех недель. Высокая влажность почвы и относительно низкие тем-

пературы (до 20 °C) способствуют прорастанию зооспор гриба и заражению корней, клубней и столонов молодых растений. Вирус распространяется также благодаря его свойству сохранять инфекционность в покоящихся спорах *S. subterranean* в почве на протяжении достаточно длительного времени (Latvala-Kilby et al., 2009; Canadian Food Inspection Agency, PMTV). На надземной части зараженного растения симптомы появляются при температуре окружающей среды от 5 до 15 °C: на стеблях и листьях появляются ярко-желтые пятна, кольца, линии; реже наблюдаются хлорозы на верхних молодых листьях; у отдельных растений отмечается укорочение междоузлий, скученность листьев, искривление листовой пластинки, что в итоге приводит к метельчатому фенотипу. Внутри клубней зараженных растений обнаруживаются полые некротические пятна или дуги. Причем при сборе урожая выраженность симптомов может быть минимальна, а при хранении клубней некрозы могут увеличиваться в размерах (Canadian Food Inspection Agency, PMTV).

TRV – типовой представитель рода *Tobravirus* семейства Virgaviridae. Геном вируса представлен двумя оцРНК положительной полярности. Каждая молекула РНК отдельно упакована в вирион, имеющий жесткую палочковидную структуру диаметром 22 нм. Длина вириона определяется размером молекулы РНК. Длина РНК1 составляет около 7 тыс. нуклеотидов. В РНК1 закодированы РНК-репликаза, транспортный белок и цистеин-богатый белок. Для РНК2 характерна высокая вариабельность между изолятами вируса как по нуклеотидной последовательности, так и по длине. РНК2 кодирует БО и один или несколько неструктурных белков, которые отвечают за распространение вируса нематодами (Visser et al., 1999; MacFarlane, 2010). TRV впервые был открыт на растениях табака, однако в дальнейшем было обнаружено, что он заражает важные сельскохозяйственные культуры, такие как свекла, бобы, шпинат, перец, а также картофель (MacFarlane, 1999; Robinson et al., 2004). Заражение TRV картофеля в природе происходит с помощью почвенных нематод *Trichodorus* и *Paratrichodorus*, причем разные виды нематод распространяют разные изоляты вируса. Повышенная влажность почвы способствует распространению нематод, а вместе с ними и вируса (Ploeg et al., 1993). На инфицированных растениях появляются хлорозы, некротические поражения листьев, системный некроз. Выраженность симптомов зависит от вида растения, изолята вируса, условий окружающей среды (Robinson et al., 2004). Снижение урожайности картофеля, вызванное заражением TRV, может достигать 55 %. Например, на северо-западном тихоокеанском побережье США TRV является причиной снижения урожая картофеля на 6–55 % (Hafez, Sundararaj, 2009).

Специфическая устойчивость растений к вирусам

Растения обладают динамичной иммунной системой, включающей разные механизмы защиты в ответ на проникновение патогенов, в том числе вирусов (Jones, Dangl, 2006). Различают две основные врожденные системы защиты растения: узнавание рецепторами растения молекулярных паттернов, ассоциированных с патогеном (recognition of pathogen associated molecular patterns –

PAMPs или MAMPs), и индуцированный эффектором иммунитет (effector-triggered immunity – ETI) (Muthamilarasan, Prasad, 2013). PAMPs (MAMPs) представляют собой высококонсервативные молекулы, характерные для целых классов патогенов и узнаваемые врожденной иммунной системой растения. Базовый защитный ответ инициируется на ранних стадиях взаимодействия патогена и растения через узнавание PAMP и определяется как иммунитет, индуцированный PAMP (PAMP-triggered immunity – PTI). Однако многие адаптированные патогены способны избегать узнавания растительными рецепторами и заражать растение. В свою очередь, на этой стадии растения способны узнавать инфицирующие их патогены с помощью белков R (белков устойчивости, или резистентности), взаимодействующих непосредственно или опосредованно с эффекторами патогенов, которые, в отличие от PAMP, являются видо- или штаммоспецифичными. Такое взаимодействие индуцирует ETI – сильный специфический защитный ответ растения, который часто ассоциирован с локальной программируемой клеточной смертью (гиперчувствительным ответом, HR) для ограничения размножения и распространения патогена (Deslandes, Rivas, 2012). Большинство белков R содержат нуклеотид-связывающий сайт и богатые лейцином повторы и обозначаются как белки NBS-LRR. Они участвуют в запуске сигнальных каскадов, приводящих к развитию HR через генерацию активных форм кислорода (ROS). Этот тип хозяйской устойчивости достаточно хорошо изучен, часто рассматривается как устойчивость «ген против гена» и обычно весьма специфичен в отношении определенного генотипа/сорта растения и конкретного патогена (Flog, 1971). Именно гены *NBS-LRR*, кодирующие белки R, на протяжении длительного времени были мишенью для создания сельскохозяйственных культур, устойчивых к болезням, как методами традиционной селекции, так и с применением трансгенных подходов.

Н. Barker, M.F.B. Dale (2006) выделили семь основных типов устойчивости к различным вирусам картофеля. К их числу относятся: 1) устойчивость к инфекции (заражению), также известная как горизонтальная или полевая устойчивость; 2) устойчивость к накоплению вируса; 3) ограничение транспорта вируса в растении; 4) устойчивость зрелых растений; 5) толерантность; 6) устойчивость к переносчикам вирусов; 7) гиперчувствительный ответ (HR – см. выше) и сверхустойчивость (ER). Устойчивость к заражению (полевая устойчивость) – это уменьшение числа растений, которые заражаются в полевых условиях. В случае устойчивости к накоплению вируса растения заражаются, но уровень накопления вируса в растениях остается низким. При устойчивости к транспорту блокируется распространение вируса по растению, включая клубни. Устойчивость зрелых растений определяется тем фактом, что на более поздних стадиях развития растения картофеля становятся менее восприимчивыми к широкому спектру вирусов, включая PLRV, PVM, PVX и PVY. В этом случае репликация вирусов в инфицированном участке и распространение по растению, в том числе в клубни, значительно замедляется. Толерантность – это устойчивость, при которой вирус накапливается, но практически не вызывает образования симптомов. Следует отметить, что,

хотя толерантность иногда рассматривается как полезный признак и используется в ряде селекционных программ, толерантные сорта картофеля могут быть резервуарами вирусов. Устойчивость картофеля к тлям-переносчикам вирусов – весьма перспективный признак для селекции и семеноводства картофеля, поскольку препятствует переносу вирусов от растения к растению. Кроме того, и тля, свободная от вирусов, вызывает серьезные потери урожая картофеля. Наконец, в основе механизмов действия большинства специфических генов устойчивости, обнаруженных в растениях картофеля и определяющих устойчивость к вирусам, лежит индукция сигнальных каскадов. Последние приводят либо к отсутствию накопления вируса в инфицированном растении (сверхустойчивость, ER), либо к гиперчувствительному ответу (HR), при котором некроз, развивающийся в инокулированном участке листа, блокирует дальнейшее размножение и распространение вируса (Solomon-Blackburn, Barker, 2001).

Далеко не для всех экономически важных вирусов картофеля идентифицированы конкретные гены, отвечающие за устойчивость растений к этим вирусам. Так, создание толерантных и устойчивых к инфицированию PLRV сортов было ограничено в основном нехваткой источников с полной устойчивостью и процедур отбора в поле устойчивых сортов. И хотя позднее источники устойчивости к PLRV были найдены, удалось получить всего несколько сортов, резистентных к данной инфекции. Таким сортом является, например, Pentland Crown, выращиваемый в Великобритании, который проявляет устойчивость как к заражению, так и к накоплению вируса (Palukaitis, 2012). К настоящему времени устойчивость к накоплению PLRV описана для ряда селекционных линий *S. tuberosum*, а полезные для практического применения источники устойчивости выявлены в дикорастущих видах *Solanum*. Однако их использование для создания коммерческих сортов картофеля пока ограничивается лишь несколькими примерами. В целом ряде работ показано, что устойчивость к накоплению PLRV контролируется одним доминантным геном (см. обзор (Palukaitis, 2012)). Устойчивость, контролируемая геном *Rlr_{etb}* из *S. tuberosum*, была внедрена в культивируемый сорт картофеля, снизив уровень накопления вируса (Novy et al., 2007; Kelly et al., 2009). Устойчивость к инфекции PLRV в некоторых немецких сортах картофеля получена путем интрогрессии генов из *S. demissum* (Ross, 1966; Davidson, 1980). В то же время показано, что иммунитет к PLRV, выявленный в *S. chacoense*, имеет полигенную природу (Marczewski et al., 2001).

Значительное число генов устойчивости к PVY также было идентифицировано в диких разновидностях картофеля (Valkonen, 2015). Эти гены путем селекции переносились в различные культуры картофеля, результатом чего стало появление множества резистентных к PVY сортов. Основными разновидностями устойчивых к PVY генотипов являются генотипы, несущие гены *Ny*, *Nc* и *Nz*, которые отвечают за развитие HR, и ген *Ry*, отвечающий за возникновение ER (Valkonen, 2015). В зависимости от варианта гена, ответственного за HR, который активируется в ответ на инфекцию PVY, выделяют следующие штаммы: PVY^O (распознается геном

Ny), PVY^c (распознается геном *Nc*), PVY^z (распознается геном *Nz*) (Singh et al., 2008). Основными вирусными детерминантами, элиситорами защитного ответа растения на заражение потивирусами, являются БО и протеаза HC-Pro, выполняющая самые разные функции – от супрессии РНК-интерференции до участия в переносе вируса тлями. При этом ген, распознающий штамм PVY^O (*Ny*), активируется БО, а гены, узнающие штаммы PVY^c (*Nc*) и PVY^z (*Nz*), активируются HC-Pro, но «не узнают» БО. Наиболее проблемные изоляты PVY – те, которые способны преодолевать устойчивость, сформированную всеми тремя вышеупомянутыми генами. Большинство из них относятся к штамму PVY^N и рекомбинантным штаммам PVY^{NTN}. В последнее время описано большое число новых рекомбинантных штаммов PVY, в том числе штаммы, способные преодолевать эффект всех трех генов, отвечающих за HR картофеля и, в отличие от PVY^N, не вызывающие некрозы жилок в табаке. Они объединены в новую группу штаммов, называемую PVY^E (Singh et al., 2008; Galvino-Costa et al., 2012; Karasev, Gray, 2013).

Доминантные вирус-специфичные гены *R*, вызывающие ER, ингибируют развитие вирусной инфекции и эффективно защищают растения картофеля. Гены, обозначенные как *Ry*, отвечают за развитие ER в ответ на инфекцию PVY (Ross, 1986). Именно ER является наиболее эффективным типом устойчивости против опасных рекомбинантных штаммов PVY. В растениях, которые содержат ген, отвечающий за ER, PVY реплицируется только в первично инфицированных клетках, вызывая ограниченную некротическую реакцию и полностью блокируя дальнейшее распространение инфекции. Следует отметить, что сверхустойчивость, развивающаяся в ответ на инфекцию PVY, является доминантным или эпистатическим ответом по отношению к HR (Valkonen et al., 1994). В результате в картофеле с генотипом, несущим и ген *Ry* (ER), и ген *Ny* (HR), при инокуляции PVY^O проявляется только ER, а классические некротические симптомы не обнаруживаются. Эти наблюдения говорят о том, что гены, вовлеченные в ER, действуют на более ранней стадии и эффективнее, чем гены, отвечающие за развитие HR, что и было показано в сравнительных исследованиях генов *Rx* картофеля и *N* табака (Valkonen, 2015).

Ген картофеля *Rx*, кодирующий белок семейства NBS-LRR, хорошо охарактеризован и участвует в развитии устойчивости к заражению PVX, распознавая БО PVX в качестве элиситора (Bendahmane et al., 1995, 1999). Ген *Rx* обеспечивает развитие ER-устойчивости, эффективно подавляя накопление вируса, но не вызывая некротизации. Тем не менее избыточная экспрессия БО сопровождается проявлением HR (Bendahmane et al., 1999). Таким образом, предполагается, что механизм действия белка *Rx* сходен с механизмом, свойственным другим белкам из семейства NBS-LRR, которые запускают процесс, приводящий к HR. Действительно, для развития защитного ответа, опосредованного белком *Rx*, необходимы белки SGT1 и Hsp90, которые связаны с устойчивостью HR-типа (Boter et al., 2007; Mayor et al., 2007). Однако не так давно был выявлен специфический белок RanGAP2, ассоциированный с белком *Rx*, для которого показано, что снижение его экспрессии приводит к подавлению

устойчивости, опосредованной геном *Rx* (Tameling, Baulcombe, 2007). Эти данные свидетельствуют о том, что активация устойчивости, опосредованной белком *Rx*, связана с нуклеоцитоплазматическим транспортом, поскольку эукариотические белки RanGAP играют важную регуляторную роль в транспорте через ядерные поры (Meier, 2007). Интересно, что ген *Rx* обеспечивает устойчивость не только против PVX, но и против ряда других потексвирусов через узнавание БО. Предполагается, что белок *Rx* узнает консервативные структурные элементы БО потексвирусов, а не консервативные аминокислотные мотивы, поскольку аминокислотные последовательности этих вирусов гомологичны не более чем на 40 % (Baures et al., 2008; Candresse et al., 2010).

PVS и PVM часто обнаруживаются в картофеле, но в большинстве культурных сортов инфекции бессимптомны. В связи с этим предпринимается гораздо меньше попыток по созданию устойчивых к PVS и PVM сортов картофеля, чем в случае потивирусов, PLRV или PVX. Основной доминантный ген (*Nm*), определяющий развитие гиперчувствительной реакции (HR) в ответ на инфекцию PVM, был идентифицирован в *S. megistacrolobum* (Ross, 1986), в то время как другой доминантный ген (*Gm*), определяющий устойчивость к PVM, был обнаружен в *S. gurlayi* (Dziewonska, Ostrowska, 1978). С развитием HR при инфекции PVS связан также доминантный ген *Ns*, первоначально обнаруженный в *S. tuberosum* ssp. *andigena*. В результате получено несколько сортов картофеля, содержащих ген *Ns*. Так, данный ген был введен в сорта Ssignal и Fantasia, созданные в Венгрии и Германии соответственно (Ross, 1986).

Известны несколько сортов картофеля, устойчивых к инфекции TRV. Некоторые из них (например, Record) полностью иммунны к TRV. У других сортов резистентность обусловлена защитным ответом, подобным HR. К таким сортам относятся Pentland Dell и Russet Burbank. Защитный ответ сорта Pentland Dell на инфекцию TRV хотя и напоминает HR, все же отличается от классического HR, вызванного заражением потекс- и потивирусами, когда HR обеспечивает достаточно высокий уровень устойчивости. После инфицирования картофеля TRV некрозы в листьях не возникают, а появляются в клубнях, что является крайне нежелательной формой проявления устойчивости, поскольку вызывает снижение урожайности и качества продукции картофеля, а следовательно, и экономической прибыли. Однако подобная устойчивость в определенной степени препятствует дальнейшему распространению вируса по растению. Очевидно, что устойчивость сорта Pentland Dell и иммунитет сорта Record к TRV контролируются совершенно разными механизмами и, соответственно, определяются различными генами (Palukaitis, 2012). Поиск удобных маркеров, ассоциированных с этими генами, в дальнейшем значительно облегчит создание устойчивых к TRV сортов картофеля.

Устойчивость к PMTV пока не введена в селекционные программы, поскольку до недавнего времени не существовало надежного метода для поиска толерантных или устойчивых видов картофеля в поле (Solomon, Wastie, 1988). Разные сорта картофеля проявляют разную степень восприимчивости к PMTV. К примеру, сорт Saturna,

широко распространенный в Скандинавии, крайне чувствителен к PMTV, в то время как сорта Appell и Desirée более устойчивы. Также разные сорта показывают разную степень восприимчивости и развития симптомов (Palukaitis, 2012).

Последние 20–25 лет было популярным создание трансгенных растений, экспрессирующих отдельные вирусные белки или их домены, а также некодирующие вирусные нуклеотидные последовательности (так называемая трансгенная устойчивость). Индивидуальная устойчивость к большинству основных вирусов, заражающих картофель, получена в модельных растениях табака при гетерологичной экспрессии различных вирусных генов, включая гены БО, РНК-репликазы, транспортных белков и протеиназ, или последовательностей генов, кодирующих отдельные домены этих белков. Однако есть только несколько примеров, когда такие последовательности были перенесены в геном картофеля, а полученные трансгенные растения демонстрировали высокую устойчивость к соответствующим вирусам. Созданы трансгенные растения картофеля с разной степенью устойчивости к вирусам PLRV, PVY, PVA, комбинации PVA и PVY, PVX, комбинации PVY и PVX и TRV (Palukaitis, 2012). Не так давно появилась информация о придании растениям картофеля множественной трансгенной устойчивости против трех основных вирусов (PVY, PVX и PLRV) при одновременном использовании их специфических последовательностей (Arif et al., 2012).

РНК-интерференция, или посттранскрипционное умалчение генов, – один из механизмов врожденной защиты растений от патогенов. Механизмы блокирования размножения вирусов с помощью РНК-интерференции основаны на элиминации вирусной РНК через узнавание ее двуцепочечных форм белком DCL с последующим ее нарезанием на короткие РНК, названные малыми интерферирующими РНК (миРНК/siRNA). Этот процесс обеспечивает активацию индуцированного РНК комплекса RISC, осуществляющего деградацию вирусной РНК при участии миРНК (Aguilar et al., 2016). Предполагается, что такой защитный ответ является одним из важных механизмов, обеспечивающих трансгенную устойчивость, даже если трансгеном была последовательность, кодирующая вирус-специфические белки (Sudarshana et al., 2007; Reddy et al., 2009).

Другой подход состоит в придании растениям устойчивости путем трансгенной экспрессии модифицированного фактора трансляции eIF4E. Так, в случае экспрессии в растениях *S. tuberosum* гена фактора eIF4E, который содержит замены, совпадающие с таковыми в гене *pvr12* стручкового перца, устойчивого к PVY, полученные трансгенные растения также демонстрировали устойчивость к данному вирусу (Cavatorta et al., 2011).

Перспективы использования генов устойчивости для создания растений, резистентных к множественным вирусным инфекциям

Как очевидно из предыдущего раздела, основной подход для создания устойчивых к вирусным инфекциям растений картофеля – использование в селекционных

программах растительных генов устойчивости. К сожалению, гены *R* выявлены не для всех экономически важных вирусов, а при их наличии процесс введения генов в высокоурожайные сорта малоэффективен и занимает много времени. К числу очевидных препятствий успешной селекции можно отнести трудности скрещивания элитных линий с дикими видами растений, которые, как правило, являются носителями соответствующих генов устойчивости, длительность процесса и вероятность одновременного внесения нежелательных локусов, снижающих продовольственную ценность культуры. Кроме того, этот тип устойчивости не является долговременным, так как вирусы способны преодолевать устойчивость, обусловленную генами *R*. Существенным ограничением подхода является то, что интродукция отдельных генов *R* в растение делает его устойчивым только к определенному вирусу (штамму вируса). В связи с этим предприняты попытки переноса нескольких генов *R* (пирамидирование – pyramiding). Известно, что гены *R* в хромосомах растений встречаются в виде кластеров крайне похожих генов. Такой кластер генов *R* содержит различные гены-гомологи, сочетание которых определяет тип защитного ответа по отношению к различным вариантам патогенов (Hämäläinen et al., 1998, 2000).

Другой подход заключается в мутагенезе (искусственной эволюции) генов *R*, кодирующих белки NBS-LRR. Однако исследования в этом направлении носят пока единичный характер и проведены на модельных системах. В качестве примера можно привести пионерные работы по мутагенезу генов *Rx* модельных растений *Nicotiana benthamiana* и *N. tabacum*. Мутации в нуклеотид-связывающей области белка *Rx* позволили получить линии растений, устойчивые к нескольким вирусам: различным штаммам PVX и отдаленно родственному карловирусу мозаики тополя (Farnham, Baulcombe, 2006; Harris et al., 2013).

Весьма перспективным представляется подход, состоящий в использовании генов растения, вовлеченных в неспецифическую устойчивость («нехозяйская» устойчивость – non-host resistance, NHR), механизмы которой начинают активно исследоваться. Для практического использования механизма/механизмов «нехозяйской» устойчивости необходимо идентифицировать вовлеченные в эти процессы гены. Некоторые из этих генов были выявлены при инфекциях бактериями и грибами. Многие из идентифицированных генов, вовлеченных в NHR, являются многофункциональными, а кодируемые ими белки участвуют в развитии растения, регуляции работы устьиц, проницаемости плазмодесм и вовлечены не только в сигнальные пути NHR, но и в основной метаболизм растения. Например, гликолат-оксидаза и пролин-дегидрогеназа модулируют пути передачи сигнала, опосредованного ROS, в ответ на различные экзогенные стрессы, и эти же ферменты вовлечены в NHR против бактериальных патогенов. Различают «нехозяйскую» устойчивость двух типов по наличию или отсутствию визуальной гибели клеток. Тип I не демонстрирует симптомов видимой гибели клеток, в то время как для типа II характерен локальный гиперчувствительный ответ на нехозяйский патоген. Гибель клеток опосредована генерацией ROS

и сходна с защитным ответом растения, запускаемым эффектором, основным механизмом специфической хозяйской устойчивости (ETI). Гены растения, отвечающие за первоначальный защитный ответ, сходным образом экспрессируются и при NHR типа II, и при специфической устойчивости в растениях табака (Oh et al., 2006), свидетельствуя о том, что сигнальные пути этих защитных систем перекрываются. NHR против патогенов отдаленно родственных хозяев обычно включает комплексные, многослойные, количественно наследуемые механизмы. Однако NHR против близкородственных видов патогенов может включать механизмы, сходные с механизмами специфической устойчивости. В последнее время растет число данных, свидетельствующих, что кластеризованные гены *R*, особенно гены, кодирующие белки NB-LRR типа, могут приобретать «нехозяйский» статус, т.е. наблюдается опосредованная этими генами устойчивость в отношении неродственных патогенов (Gill et al., 2015; Lee et al., 2016).

Роль ядра и ядерных белков в устойчивости растений к вирусам

Исследования последних лет показали, что клеточное ядро находится на «переднем крае» во взаимодействиях между растениями и патогенами, включая вирусы. Динамичный транспорт ключевых компонентов защитного ответа из цитоплазмы в ядро критичен для иммунного ответа растения на патогены. Такими компонентами являются белки «устойчивости», транскрипционные факторы (ДНК-связывающие белки, которые взаимодействуют со специфическими участками ДНК, стимулируя (активаторы) или ингибируя (репрессоры) транскрипцию), регуляторы транскрипции (другие белки, регулирующие экспрессию генов, но лишённые ДНК-связывающих доменов, например модуляторы структуры хроматина, такие как гистоновые ацетилтрансферазы, киназы и метилазы) и некоторые другие компоненты иммунного ответа. Как правило, эти компоненты находятся в цитоплазме в неактивном состоянии, но в ответ на соответствующие сигналы, узнаваемые иммунной системой растения как чужеродные, активируются и перемещаются в ядро с целью репрограммирования генов растения и активации систем защитного ответа. Существенно, что значительное число белков эффекторов патогенов, в том числе вирусные белки, имеют собственный сигнал ядерной локализации и могут быть непосредственно нацелены на ядерные компоненты или функции растения, участвующие в защитном ответе (Deslandes, Rivas, 2011).

Активное изучение роли ядра и субъядерных структур в вирусной инфекции началось около 15 лет тому назад. Исследования, проведенные на вирусах животных и человека, показали, что не только вирусы, репликационный цикл которых проходит в ядре, но и все изученные так называемые цитоплазматические вирусы (репликационный цикл которых проходит в цитоплазме клетки) активно взаимодействуют с ядром, его компартментами и отдельными ядерными белками, и это взаимодействие является необходимым этапом в цикле вирусной инфекции (Hiscox, 2007; Greco, 2009). Позднее сходные исследования были проведены на вирусах растений. Несмотря на отсутствие очевидных ассоциаций между репликацией

РНК-содержащих вирусов растений (содержащих оцРНК положительной полярности) и известных функций клеточного ядра, целый ряд вирусных белков был обнаружен в ядре или субъядерных компартментах (Talianky et al., 2010; Solovyev, Savenkov, 2014). Первое функциональное доказательство того, что субъядерные домены – ядрышко и тельца Кахаля (ТК) – играют важную роль в инфекционном цикле вирусов растений, было получено М. Тальянским с соавт. (Kim et al., 2007a, b; Canetta et al., 2008). Показано, что способность транспортного белка ORF3 умбравируса транспортировать вирусную РНК на дальние расстояния через флоэму строго зависит от транспорта этого вирусного белка через ТК-подобные структуры в ядрышко и его взаимодействия с фибрилларин, одним из основных белков ядрышка, нормальная функция которого заключается в метилировании и процессинге прерибосомальных РНК. Это взаимодействие сопровождается частичной релокализацией фибрилларина в цитоплазму и сборкой цитоплазматических рибонуклеопротеидных (РНП) частиц умбравируса, компетентных для системной вирусной инфекции, с участием фибрилларина, вирусного белка ORF3 и вирусной РНК (Kim et al., 2007a, b). Интересно, что частичное выключение гена фибрилларина с помощью вирус-индуцированного умолкания генов (РНК-интерференции) сопровождалось угнетением не только умбравиральной инфекции, но и угнетением инфекции растений PLRV (Kim et al., 2007a).

Другой пример взаимодействия вирусного белка с ядрышком и фибрилларин был описан для PVA. Показано, что VPg домен белка NIa, связывающийся с РНК-геномом вируса, также взаимодействует с фибрилларин, и это взаимодействие играет существенную роль в развитии инфекции PVA (Rajamäki, Valkonen, 2009). Тем не менее механизм участия фибрилларина в данной инфекции не связан с системным распространением инфекции, как в предыдущих случаях, а, вероятно, обусловлен взаимодействием с системой РНК-интерференции. Все эти данные позволили предположить, что ядрышко и один из его основных компонентов, фибрилларин, помимо своих основных функций в биосинтезе рибосомальных РНК и сборке рибосом также выполняют важные функции во взаимодействии с вирусами, в том числе вирусами картофеля, и таким образом могут контролировать устойчивость растений к вирусам (Talianky et al., 2010).

Тельца Кахаля – это субъядерные структуры, функционально и физически связанные с ядрышком. Основная роль ТК заключается в метаболизме РНК и формировании рибонуклеопротеидных частиц, участвующих в транскрипции, сплайсинге и биогенезе рибосом. Главным структурным (маркерным) белком ТК, абсолютно необходимым для их сборки, является коилин (Love et al., 2016). Для того чтобы понять роль ТК в заражении растений вирусами, были получены трансгенные растения *Nicotiana* с нокдауном (knockdown) гена коилина (TP-kd), что позволило показать, что этот ядерный белок влияет на ответ растения на вирусную инфекцию, но различно для представителей разных таксономических групп вирусов (Shaw et al., 2014). Это открытие свидетельствовало о новых функциях коилина, который может непосредственно быть вовлечен в инфекционный процесс или опосредо-

ванно участвовать в защитных механизмах растения, подавляя или, напротив, усиливая восприимчивость растения-хозяина к вирусам. В частности, было показано, что коилин усиливает патогенность некоторых вирусов, к числу которых относится потивирин PVY. Так, симптомы просветления жилок и некрозы в системных листьях растений табака дикого типа (ДТ) при инфекции PVY были значительно сильнее, чем в TP-kd. Скорость репликации (накопления вируса) в протопластах из TP-kd, как и уровень накопления PVY в инокулированных листьях TP-kd, были существенно ниже, чем в протопластах и растениях ДТ. Дефицит коилина не влиял на системный транспорт PVY в верхние неинокулированные листья, хотя дальнейшее накопление вируса в системных листьях было также снижено в TP-kd по сравнению с растениями ДТ (Shaw et al., 2014). Можно предположить, что коилин подавляет процесс РНК-интерференции и таким образом усиливает инфекцию. Для проверки этого предположения были использованы три экспериментальных подхода и показано, что (1) в TP-kd не наблюдается увеличения (по сравнению с растениями ДТ) специфичных к PVY миРНК, главного маркера процесса РНК-интерференции; (2) в опытах по агроинфильтрации транзientное умолкание гена зеленого флуоресцентного белка (ЗФБ) сохраняется в TP-kd на уровне растений ДТ; (3) уровень супрессии РНК-интерференции гена ЗФБ, осуществляемой белком HC-Pro (супрессор, кодируемый PVY), был одинаков в растениях TP-kd и ДТ (Shaw et al., 2014). Таким образом, механизм РНК-интерференции, по-видимому, не затрагивается при инфекции TP-kd PVY. Предполагается, что коилин обеспечивает эффективную продукцию вируса, непосредственно участвуя в процессе репликации вирусной РНК. Однако весьма вероятно, что опосредованный коилином механизм может интерферировать с некоторыми другими путями защиты растения против PVY или с модификацией генов, вовлеченных в механизмы неспецифической защиты растений, например влияя на активность, связанную с комплексом RISC, или на общие механизмы защиты, опосредованные салициловой кислотой.

Напротив, отсутствие коилина в TP-kd значительно усиливало патогенность другого важного вируса, поражающего картофель, – тобравируса TRV (Shaw et al., 2014). TRV заражает растения с высокой эффективностью, однако на поздних стадиях инфекции в зараженных растениях наблюдается так называемый феномен оздоровления: симптомы на вновь образующихся (молодых) системно инфицированных листьях проявляются как более мягкие, а репликация вируса поддерживается на низком уровне (Ratcliff et al., 2001). В отличие от растений *Nicotiana* (*N. tabacum* и *N. benthamiana*) ДТ, инфицированных TRV, TP-kd растения «не выздоравливали» и демонстрировали персистентные суровые симптомы инфекции. Полученные результаты свидетельствовали о том, что только растения ДТ способны входить в фазу «оздоровления» на поздних стадиях инфекции TRV, подавляя размножение вируса во вновь образованных листьях, хотя на ранних стадиях растения ДТ и TP-kd (с дефицитом коилина/отсутствием ТК) были одинаково чувствительны к инфекции (Shaw et al., 2014). Снижение накопления вируса при «оздоровлении» системных листьев ранее было объясне-

но феноменом РНК-интерференции (Ratcliff et al., 1997). Наши данные (Shaw et al., 2014) показали, что механизм РНК-интерференции функционирует сходным образом в TP-kd в отсутствие коилина и в растениях ДТ. Вместе с тем наблюдаемая разница в симптомах вирусной инфекции говорила об участии коилина в ранее неизвестном защитном механизме, который повышает устойчивость растения к вирусной инфекции. Отсутствие коилина, напротив, сопровождается ослаблением/выключением этого механизма, способствуя накоплению вирусной РНК до уровней, которые могут потенциально насытить механизм РНК-интерференции, что позволяет преодолевать его действие в системных листьях TP-kd. Согласно нашим данным, ядерным белком, вовлеченным в коилин-зависимый ответ на вирусную инфекцию, может быть поли(АДФ-рибозо) полимераза (PARP1), выполняющая важную роль в толерантности организма к генотоксическому стрессу, репарации ДНК, транскрипции, контроле клеточного цикла и клеточных ответах на биотический и абиотический стрессы, включая процессы, относящиеся к механизму программируемой клеточной смерти (Kotova et al., 2009; Briggs, Bent, 2011; Bassett, 2012; Luo, Kraus, 2012; Ji, Tulin, 2013; Schulz et al., 2014). Этот белок осуществляет свои регуляторные функции путем специфической модификации (АДФ-рибозилирования) отдельных белков и аутомодификации. Вероятно, сходный механизм устойчивости может запускаться и при инфекции растений другими РНК- и ДНК-содержащими вирусами, в частности вирусом шероховатой мозаики ячменя (barley stripe mosaic virus – BSMV; РНК-геном), вирусом черных колец томатов (tomato black ring virus – TBRV; РНК-геном) и вирусом золотистой мозаики томатов (tomato golden mosaic virus – TGMV; ДНК-геном) (Shaw et al., 2014).

Полученные нами данные позволяют предположить, что ядерные белки, коилин и фибрилларин, имеют новые, ранее неизвестные функции, являясь важными регуляторами/сенсорами, контролирующими вирусный патогенез в растениях, причем эти функции могут быть использованы как для «пользы» вирусов, так и в защитных реакциях растения-хозяина, направленных против вирусов. Поскольку коилин/фибрилларин вовлечены в устойчивость/восприимчивость растений к различным вирусам и даже абиотическим факторам (Love et al., 2016), очевидно, что эти ядерные белки являются компонентами сигнального пути/путей, обеспечивающих общие защитные механизмы растения. Таким образом, клеточное ядро – центральный узел координации ответов на биотические и абиотические стрессы. Это открывает широкие возможности для его использования в качестве нового источника факторов, активирующих широкий спектр механизмов устойчивости растений к вирусам, в частности к вирусам картофеля, и в целом к различным патогенам.

Закключение

В настоящее время становится возможным использовать новые технологии редактирования генома с целью дизайна генов устойчивости против вирусов. Развитие таких технологий, как TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) и CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), открывает широкие возмож-

ности для создания новой генерации генов устойчивости и получения культур, не содержащих вставок гетерологичных последовательностей ДНК, что существенно для стран, в которых использование ГМО законодательно ограничено или запрещено. Детальное знание механизмов защитного ответа растения на вирусную инфекцию и особенностей взаимодействия вируса с клеточными факторами позволит идентифицировать как новые белки растения, вовлеченные в сигнальные пути защиты растений от атаки вирусов, так и ключевые домены взаимодействующих с ними вирусных белков, которые не подвергаются быстрой модификации/эволюции. Предполагается, что модификация известных генов специфической устойчивости или генов, вовлеченных в механизмы неспецифической защиты растений, позволит растению-хозяину «узнавать» новые варианты вируса и уничтожать его при участии иммунной системы. При альтернативном подходе индуцированная в гене растения мутация не будет влиять на рост растения, а хозяйский белок не будет узнавать компоненты вируса и способствовать его размножению. Несмотря на уже сделанные значимые открытия, сложные сети биологических процессов в ядре, определяющие кардинальные изменения в «защитном» ядерном интерактоме, еще предстоит исследовать. Принципиально важными в этой связи являются хорошая изученность генетических ресурсов видов *Solanum* и ставшая недавно доступной полная последовательность генома картофеля, опубликованная международным Консорциумом секвенирования генома картофеля (www.potatogenome.net).

В долгосрочной перспективе эти подходы позволят разработать стратегии создания новых стабильных сортов/линий картофеля, устойчивых к вирусным и бактериальным инфекциям и способных преодолевать экологические стрессы. Успехи в этом направлении с большой вероятностью приведут к высокому уровню защиты растения, поскольку будут основаны на собственном арсенале защиты растения, что сделает устойчивость более эффективной и долговечной.

Acknowledgments

The authors are grateful to Drs. A.M. Chuenko and A.N. Ignatov for the attention to the work and valuable advice. The study was supported by the Russian Science Foundation, project 16-16-04019.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Reference

- Aguiar E.R., Olmo R.P., Marques J.T. Virus-derived small RNAs: molecular footprints of host-pathogen interactions. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. 2016;7(6):824-837. DOI 10.1002/wrna.1361.
- Aguiar E., Almendral D., Allende L., Pacheco R., Chung B.N., Canto T., Tenllado F. The P25 protein of Potato virus X (PVX) is the main pathogenicity determinant responsible for systemic necrosis in PVX-associated synergisms. *J. Virol.* 2015;89(4):2090-2103. DOI 10.1128/JVI.02896-14.
- Arif M., Azhar U., Arshad M., Zafar Y., Mansoor S., Asad S. Engineering broad-spectrum resistance against RNA viruses in potato. *Transgenic Res.* 2012;21:303-311. DOI 10.1007/s11248-011-9533-7.
- Arif M., Torrance L., Reavy B. Acquisition and transmission of potato mop-top furovirus by a culture of *Spongospora subterranea* f. sp.

- subterranea* derived from single cystosorus. *Annals Appl. Biology*. 1995;126(3):493-503. DOI 10.1111/j.1744-7348.1995.tb05384.x.
- Baldauf P.M., Gray S.M., Perry K.L. Biological and serological properties of potato virus Y isolates in northeastern United States potato. *Plant Dis.* 2006;90:559-566. DOI 10.1094/PD-90-0559.
- Barker H., Dale M.F.B. Resistance to viruses in potato. *Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses*. Ed. by G. Loebeinstein, J.P. Carr. Netherlands: Springer, Dordrecht, 2006;341-366.
- Bassett C.L. Cajal bodies and plant RNA metabolism. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2012;31(3):258-270. DOI 10.1080/07352689.2011.645431.
- Baures I., Candresse T., Leveau A., Bendahmane A., Sturbois B. The *Rx* gene confers resistance to a range of *Potexviruses* in transgenic *Nicotiana* plants. *Mol. Plant-Microbe Interactions*. 2008;21(9):1154-1164. DOI 10.1094/MPMI-21-9-1154.
- Bendahmane A., Kanyuka K., Baulcombe D.C. The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell*. 1999;11(5):781-792. DOI 10.1105/tpc.11.5.781.
- Bendahmane A., Kohn B.A., Dedi C., Baulcombe D.C. The coat protein of potato virus X is a strain-specific elicitor of Rx1-mediated virus resistance in potato. *Plant J.* 1995;8:933-941.
- Botër M., Amigues B., Peart J., Breuer C., Kadota Y., Casais C., Moore G., Kleanthous C., Ochsenbein F., Shirasu K., Guerois R. Structural and functional analysis of SGT1 reveals that its interaction with HSP90 is required for the accumulation of Rx, an R protein involved in plant immunity. *Plant Cell*. 2007;19:3791-3804. DOI 10.1105/tpc.107.050427.
- Brandes J., Wetter C., Bagnall R.H., Larson R.H. Size and shape of the particles of Potato virus S, Potato virus M, and Carnation latent virus. *Phytopathol.* 1959;49(7):443-446.
- Brault V., Muttterer J., Scheidecker D., Simonis M.T., Herrbach E., Richards K., Ziegler-Graff V. Effects of point mutations in the readthrough domain of the beet western yellows virus minor capsid protein on virus accumulation in planta and on transmission by aphids. *J. Virology*. 2000;74(3):1140-1148. DOI 10.1128/JVI.74.3.1140-1148.2000.
- Briggs A.G., Bent A.F. Poly(ADP-ribosyl)ation in plants. *Trends Plant Sci.* 2011;16:372-380. DOI 10.1016/j.tplants.2011.03.008.
- Canadian Food Inspection Agency, Plant Health Science. Potato mop-top virus PMTV – Fact Sheet. Available at <http://www.inspection.gc.ca/plants/plant-pests-invasive-species/diseases/pmtv/fact-sheet/eng/1327452784025/1327452899956>.
- Candresse T., Marais A., Faure C., Dubrana M.P., Gombert J., Bendahmane A. Multiple coat protein mutations abolish recognition of *Pepino mosaic potexvirus* (PepMV) by the Potato *Rx* resistance gene in transgenic tomatoes. *Mol. Plant-Microbe Interactions*. 2010;23(4):376-383. DOI 10.1094/MPMI-23-4-0376.
- Canetta E., Kim S.H., Kalinina N.O., Shaw J., Adya A.K., Gillespie T., Brown J.W., Talianky M. A plant virus movement protein forms ring-like complexes with the major nucleolar protein, fibrillarin, *in vitro*. *J. Mol. Biol.* 2008;376(4):932-937. DOI 10.1016/j.jmb.2007.12.039.
- Cavatorta J., Perez K.W., Gray S.M., Van Eck J., Yeam I., Jahn M. Engineering virus resistance using a modified potato gene. *Plant Biotechnol. J.* 2011;9(9):1014-1021. DOI 10.1111/j.1467-7652.2011.00622.x.
- Čerovská N., Pečenkova T., Filigarová M., Dědič P. Sequence analysis of the Czech potato mop-top virus (PMTV) isolate Korneta-Nemilkov. *Folia Microbiol.* 2007;52(1):61-64.
- Davidson T.M.W. Breeding for resistance to virus disease of the potato (*Solanum tuberosum*) at the Scottish Plant Breeding Station. *Scottish Plant Breed. Station 59th Annu. Rep.* 1980;100-108.
- Deslandes L., Rivas S. The plant cell nucleus: a true arena for the fight between plants and pathogens. *Plant Signal Behav.* 2011;6(1):42-48. DOI 10.4161/psb.6.1.13978.
- Deslandes L., Rivas S. Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends Plant Sci.* 2012;17(11):644-655. DOI 10.1016/j.tplants.2012.06.011.
- Dziewonska M.A., Ostrowska K. Resistance to Potato virus M in certain wild potato species. *Potato Res.* 1978;21:129-131. DOI 10.1007/BF02361611.

- Farnham G., Baulcombe D.C. Artificial evolution extends the spectrum of viruses that are targeted by a disease-resistance gene from potato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006;103(49):18828-18833. DOI 10.1073/pnas.0605777103.
- Flor H.H. Current status of the gene-for-gene concept. *Ann. Rev. Phytopathol.* 1971;9:275-296. DOI 10.1146/annurev.py.09.090171.001423.
- Galvino-Costa S.B.F., Figueira A.D.R., Camargos V.V., Geraldino P.S., Hu X.J., Nikolaeva O.V., Kerlan C., Karasev A.V. A novel type of Potato virus Y recombinant genome, determined for the genetic strain PVY^E. *Plant Path.* 2012;61:388-398. DOI 10.1111/j.1365-3059.2011.02495.x.
- Gill U.S., Lee S., Mysore K.S. Host versus nonhost resistance: distinct wars with similar arsenals. *Phytopathol.* 2015;105(5):580-587. DOI 10.1094/PHYTO-11-14-0298-RVW.
- Greco A. Involvement of the nucleolus in replication of human viruses. *Rev. Med. Virol.* 2009;19(4):201-214. DOI 10.1002/rmv.614.
- Hafez S.L., Sundararaj P. Management of Corky Ringspot Disease of Potatoes in the Pacific Northwest. University of Idaho. Extension. 2009;1-6.
- Hämäläinen J.H., Kekarainen T., Gebhardt C., Watanabe K.N., Valkonen J.P.T. Recessive and dominant genes interfere with the vascular transport of Potato virus A in diploid potatoes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2000;13:402-412. DOI 10.1094/MPMI.2000.13.4.402.
- Hämäläinen J.H., Sorri V.A., Watanabe K.N., Gebhardt C., Valkonen J.P.T. Molecular examination of a chromosome region that controls resistance to potato Y and A potyviruses in potato. *Theor. Appl. Genet.* 1998;96:1036-1043. DOI 10.1007/s001220050836.
- Harris C.J., Slootweg E.J., Goverse A., Baulcombe D.C. Stepwise artificial evolution of a plant disease resistance gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013;110(52):21189-21194. DOI 10.1073/pnas.1311134110.
- Hiscox J.A. RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nat. Rev. Microbiol.* 2007;5(2):119-127. DOI 10.1038/nrmicro1597.
- Ivanov K.I., Eskelin K., Lohmus A., Makinen K. Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection. *J. General Virol.* 2014;95:1415-1429. DOI 10.1099/vir.0.064220-0.
- Jaag H.M., Kawchuk L., Rohde W., Fischer R., Emans N., Prüfer D. An unusual internal ribosomal entry site of inverted symmetry directs expression of a potato leafroll polerovirus replication-associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003;100(15):8939-8944. DOI 10.1073/pnas.1332697100.
- Ji Y., Tulin A.V. Post-transcriptional regulation by poly(ADP-ribosylation) of the RNA-binding proteins. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14:16168-16183. DOI 10.3390/ijms140816168.
- Jones J.D., Dangl J.L. The plant immune system. *Nature*. 2006;444(7117):323-329. DOI 10.1038/nature05286.
- Karasev A.V., Gray S.M. Continuous and emerging challenges of Potato virus Y in potato. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2013;51:571-586. DOI 10.1146/annurev-phyto-082712-102332.
- Kelly K.B., Whitworth J.L., Novy R.G. Mapping of the potato leafroll virus resistance gene, *Rlr_{etb}*, from *Solanum tuberosum* identifies interchromosomal translocations among its E-genome chromosomes 4 and 9 relative to the A-genome of *Solanum* L. sect. *Petota*. *Mol. Breeding*. 2009;23:489-500. DOI 10.1007/s11032-008-9251-x.
- Kim S.H., Macfarlane S., Kalinina N.O., Rakitina D.V., Ryabov E.V., Gillespie T., Haupt S., Brown J.W., Taliany M. Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007a;104(26):11115-11120. DOI 10.1073/pnas.0704632104.
- Kim S.H., Ryabov E.V., Kalinina N.O., Rakitina D.V., Gillespie T., MacFarlane S., Haupt S., Brown J.W.S., Taliany M. Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. *EMBO J.* 2007b;26:2169-2179. DOI 10.1038/sj.emboj.7601674.
- Kogovšek P., Kladnik A., Mlakar J., Žnidarič M.T., Dermastia M., Ravnikar M., Pompe-Novak M. Distribution of Potato virus Y in potato plant organs, tissues, and cells. *Phytopathol.* 2011;101:1292-1300. DOI 10.1094/PHYTO-01-11-0020.
- Kotova E., Jarnik M., Tulin A.V. Poly (ADP-ribose) polymerase 1 is required for protein localization to Cajal body. *PLoS Genet.* 2009;5(2):e1000387. DOI 10.1371/journal.pgen.1000387.
- Latvala-Kilby S., Aura J.M., Pupola N., Hannukkala A., Valkonen J.P.T. Detection of *Potato mop-top virus* in potato tubers and sprouts: Combinations of RNA2 and RNA3 variants and incidence of symptomless infections. *Phytopathol.* 2009;99:519-531. DOI 10.1094/PHYTO-99-5-0519.
- Lee L., Kaplan I.B., Ripoll D.R., Liang D., Palukaitis P., Gray S.M. A surface loop of the *Potato leafroll virus* coat protein is involved in virion assembly, systemic movement, and aphid transmission. *J. Virol.* 2005;79(2):1207-1214. DOI 10.1128/JVI.79.2.1207-1214.2005.
- Lee S., Whitaker V.M., Hutton S.F. Mini review: Potential applications of non-host resistance for crop improvement. *Front. Plant Sci.* 2016;7:997. DOI 10.3389/fpls.2016.00997.
- Lico C., Benvenuto E., Baschieri S. The two-faced Potato virus X: from plant pathogen to smart nanoparticle. *Front. Plant Sci.* 2015;6:1009. DOI 10.3389/fpls.2015.01009.
- Łoniewska-Lwowska A., Chelstowska S., Zagórski-Ostojka W., Pałucha A. Elements regulating *Potato leafroll virus* sgRNA1 translation are located within the coding sequences of the coat protein and read-through domain. *Acta Biochim. Polonica*. 2009;56(4):619-625.
- Love A.J., Yu C., Petukhova N.V., Kalinina N.O., Chen J., Taliany M.E. Cajal bodies and their role in plant stress and disease responses. *RNA Biology*. 2016. DOI 10.1080/15476286.2016.1243650.
- Luo X., Kraus W.L. On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP. *Genes Dev.* 2012;26:417-432. DOI 10.1101/gad.183509.111.
- MacFarlane S.A. Molecular biology of the tobnaviruses. *J. Gen. Virol.* 1999;80(11):2799-2807. DOI 10.1099/0022-1317-80-11-2799.
- MacFarlane S.A. Tobnaviruses – plant pathogens and tools for biotechnology. *Mol. Plant Pathol.* 2010;11(4):577-583. DOI 10.1111/j.1364-3703.2010.00617.x.
- Marczewski W., Flis B., Syller J., Schafer-Pregl R., Gebhardt C. A major quantitative trait locus for resistance to *Potato leafroll virus* is located in a resistance hotspot on potato chromosome XI and is tightly linked to *N*-gene-like markers. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2001;14(12):1420-1425. DOI 10.1094/MPMI.2001.14.12.1420.
- Massumi H., Poormohammadi S., Pishyar S., Maddahian M., Heydarnejad J., Hosseini-Pour A., Bysterveldt K., Varsani A. Molecular characterization and field survey of Iranian potato virus X isolates. *Virus Dis.* 2014;25(3):338-344. DOI 10.1007/s13337-014-0222-z.
- Mayor A., Martinon F., DeSmedt T., Petrilli V., Tschopp J. A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses. *Nature Immunol.* 2007;8:497-503. DOI 10.1038/ni1459.
- Meier I. Composition of the plant nuclear envelope: theme and variations. *J. Exp. Botany*. 2007;58:27-34. DOI 10.1093/jxb/erl009.
- Morozov S.Y., Zakhariev V.M., Chernow B.K., Prasolov V.S., Kozlov Y.V., Atabekov J.G. The analysis of the primary structure and localization of the coat protein gene on the genomic RNA of Potato virus X. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*. 1983;271:211-215.
- Muthamilarasan M., Prasad M. Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. *J. Biosci.* 2013;38(2):433-449. DOI 10.1007/s12038-013-9302-2.
- Novy R.G., Gillen A.M., Whitworth J.L. Characterization of the expression and inheritance of potato leafroll virus (PLRV) and potato virus Y (PVY) resistance in three generations of germplasm derived from *Solanum tuberosum*. *Theor. Appl. Genet.* 2007;114:1161-1172. DOI 10.1007/s00122-007-0508-2.
- Oh S.K., Lee S., Chung E., Park J.M., Yu S.H., Ryu C.M., Choi D. Insight into Types I and II nonhost resistance using expression patterns of defense-related genes in tobacco. *Planta*. 2006;223(5):1101-1107. DOI 10.1007/s00425-006-0232-1.
- Palukaitis P. Resistance to viruses of potato and their vectors. *Plant Pathol. J.* 2012;28(3):248-258. DOI 10.1099/vir.0.82477-0.
- Peter K.A., Liang D., Palukaitis P., Gray S.M. Small deletions in the potato leafroll virus readthrough protein affect particle morphology,

- aphid transmission, virus movement and accumulation. *J. General Virol.* 2008;89(8):2037-2045. DOI 10.1099/vir.0.83625-0.
- Piche L.M., Singh R.P., Nie X., Gudmestad N.C. Diversity among *Potato virus Y* isolates obtained from potatoes grown in the United States. *Phytopathol.* 2004;94(12):1368-1375. DOI 10.1094/PHYTO.2004.94.12.1368.
- Ploeg A.T., Robinson D.J., Brown D.J.F. RNA-2 of tobacco rattle virus encodes the determinants of transmissibility by trichodoriid vector nematodes. *J. General Virol.* 1993;74:1463-1466.
- Rahman M.S., Akanda A.M. Effect of PLRV infected seed tuber on disease incidence, plant growth and yield parameters of potato. *Bangladesh J. Agril. Res.* 2010;35(3):359-366.
- Rajamäki M.-L., Valkonen J.P.T. Control of nuclear and nucleolar localization of nuclear inclusion protein a of picorna-like *Potato virus A* in *Nicotiana* species. *Plant Cell.* 2009;21(8):2485-2502. DOI 10.1105/tpc.108.064147.
- Ratcliff F., Harrison B.D., Baulcombe D.C. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science.* 1997;276(5318):1558-1560. DOI 10.1126/science.276.5318.1558.
- Ratcliff F., Martin-Hernandez A.M., Baulcombe D.C. Technical advance: tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J.* 2001;25(2):237-245. DOI 10.1046/j.0960-7412.2000.00942.x.
- Reavy B., Arif M., Cowan G.H., Torrance L. Association of sequences in the coat protein/readthrough domain of potato mop-top virus with transmission by *Spongospora subterranea*. *J. General Virol.* 1998;79:2343-2347.
- Reddy D.V., Sudarshana M.R., Fuchs M., Rao N.C., Thottappilly G. Genetically engineered virus-resistant plants in developing countries: current status and future prospects. *Adv. Virus Res.* 2009;75:185-220. DOI 10.1016/S0065-3527(09)07506-X.
- Robinson D.J., Dale M.F.B., Todd D. Factors affecting the development of disease symptoms in potatoes infected by *Tobacco rattle virus*. *Eur. J. Plant Pathol.* 2004;110:921-928. DOI 10.1007/s10658-004-8950-3.
- Ross H. The use of wild *Solanum* species in German potato breeding of the past and today. *Am. Potato J.* 1966;43:64-80.
- Ross H. *Potato Breeding – Problems and Perspectives*. Berlin: P. Parey, 1986.
- Salaman R.N., Pethybridge G. Some Recent Work on the Potato Blight. *Rep. Intern. Potato Conf. Roy. Hort. Soc.*, 1921;122.
- Schmitz J., Stussi-Garaud C., Tacke E., Prüfer D., Rohde W., Rohfritsch O. *In situ* localization of the putative movement protein (pr17) from potato leafroll luteovirus (PLRV) in infected and transgenic potato plants. *Virol.* 1997;235(2):11-22. DOI 10.1006/viro.1997.8679.
- Scholthof K.-B.G., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C., Foster G.D. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathology.* 2011;12(9):938-954. DOI 10.1111/J.1364-3703.2011.00752.X.
- Schulz P., Jansseune K., Degenkolbe T., Méret M., Claeys H., Skirycz A., Teige M., Willmitzer L., Hannah M.A. Poly(ADP-ribose) polymerase activity controls plant growth by promoting leaf cell number. *PLoS ONE.* 2014;9(2):e90322. DOI 10.1371/journal.pone.0090322.
- Senanayake D.M.J.B., Mandal B. Expression of symptoms, viral coat protein and silencing suppressor gene during mixed infection of a N-Wi strain of potato virus Y and an asymptomatic strain of potato virus X. *Virus Dis.* 2014;25(3):314-321. DOI 10.1007/s13337-014-0204-1.
- Senshu H., Yamaji Y., Minato N., Shiraishi T., Maejima K., Hashimoto M., Miura C., Neriya Y., Namba S. A dual strategy for the suppression of host antiviral silencing: two distinct suppressors for viral replication and viral movement encoded by potato virus M. *J. Virol.* 2011;85(19):10269-10278. DOI 10.1128/JVI.05273-11.
- Shaw J., Love A.J., Makarova S.S., Kalinina N.O., Harrison B.D., Taliansky M.E. Coilin, the signature protein of Cajal bodies, differentially modulates the interactions of plants with viruses in widely different taxa. *Nucleus.* 2014;5(1):85-94. DOI 10.4161/nucl.28315.
- Singh R.P., Valkonen J.P.T., Gray S.M., Boonham N., Jones R.A.C., Kerlan C., Schubert J. Discussion paper: The naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. *Arch. Virol.* 2008;153(1):1-13. DOI 10.1007/s00705-007-1059-1.
- Solomon R.M., Wastie R.L. Management of potato mop-top virus and its vector by breeding and selection. *Developments in Applied Biology II. Viruses with Fungal Vectors*. Ed. by J.I. Cooper, M.J.C. Asher. UK. Wellesbourne: Assoc. Appl. Biol., 1988;271-279.
- Solomon-Blackburn R.M., Barker H. A review of host major-gene resistance to *Potato viruses X, Y, A, and V* in potato: genes, genetics and mapped locations. *Heredity.* 2001;86:8-16.
- Solov'yev A.G., Savenkov E.I. Factors involved in the systemic transport of plant RNA viruses: the emerging role of the nucleus. *J. Exp. Bot.* 2014;65(7):1689-1697. DOI 10.1093/jxb/ert449.
- Sudarshana M.R., Roy G., Falk B.W. Methods for engineering resistance to plant viruses. *Methods Mol. Biol.* 2007;354:183-195. DOI 10.1385/1-59259-966-4:183.
- Tacke E., Priifer D., Schmitz J., Rohde W. The potato leafroll luteovirus 17K protein is a single-stranded nucleic acid-binding protein. *J. General Virol.* 1991;72:2035-2038. DOI 10.1099/0022-1317-72-8-2035.
- Taliansky M.E., Brown J.W., Rajamäki M.L., Valkonen J.P., Kalinina N.O. Involvement of the plant nucleolus in virus and viroid infections: parallels with animal pathosystems. *Adv. Virus Res.* 2010;77:119-158. DOI 10.1016/B978-0-12-385034-8.00005-3.
- Tameling W.I., Baulcombe D.C. Physical association of the NB-LRR resistance protein Rx with a Ran GTPase-activating protein is required for extreme resistance to *Potato virus X*. *Plant Cell.* 2007;19:1682-1694.
- Valkonen J. Virus-host interactions and breeding for resistance in potato. *Breeding Sci.* 2015;65(1):69-76. DOI 10.1270/jsbbs.65.69
- Valkonen J.P.T., Jones R.A.C., Slack S.A., Watanabe K.N. Resistance specificities to viruses in potato: Standardization of nomenclature. *Plant Breed.* 1996;115:433-438.
- Valkonen J.P.T., Slack S.A., Plaisted R.L., Watanabe K.N. Extreme resistance is epistatic to hypersensitive resistance to potato virus Y⁰ in *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*-derived potato genotype. *Plant Disease.* 1994;78(12):1177-1180.
- Verchot-Lubicz J., Ye C.-M., Bamunusinghe D. Molecular biology of potexviruses: recent advances. *J. General Virol.* 2007;88:1643-1655. DOI 10.1099/vir.0.82667-0.
- Visser P.B., Brown D.J.F., Brederode F.Th., Bol J.F. Nematode transmission of tobacco rattle virus serves as a bottleneck to clear the virus population from defective interfering RNAs. *Virol.* 1999;263(1):155-165. DOI 10.1006/viro.1999.9901.
- Wales S., Platt H.W., Cattlin N. *Diseases, Pests and Disorders of Potatoes*. London: Manson Publ. Ltd., 2008;75-76.
- Warren M., Krüger K., Schoeman A.S. *Potato Virus Y (PVY) and Potato Leafroll Virus (PLRV): Literature Review for Potatoes South Africa*. Pretoria: Univ. of Pretoria, Faculty of Nat. and Agricult. Sci., Department of Zool. and Entomol., 2005.
- Xu H., D'Aubin J., Nie J. Genomic variability in *Potato virus M* and the development of RT-PCR and RFLP procedures for the detection of this virus in seed potatoes. *Virol. J.* 2010;7:25. DOI 10.1186/1743-422X-7-25.

Устойчивость картофеля к тлям

Е.Е. Радченко

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова» (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

Обсуждается проблема устойчивости генетических ресурсов картофеля к тлям. Практически во всех литературных источниках анализируется резистентность к персиковой (*Myzus persicae* Sulzer) и большой картофельной (*Macrosiphum euphorbiae* Thomas) тлям. Генофонд *Solanum tuberosum* L. относительно беден устойчивыми формами. Высокоустойчивые к *M. persicae* образцы выявлены среди 36 из 86 изученных диких видов картофеля. Наибольшее число устойчивых форм найдено в пределах видов *S. bulbocastanum* Dun., *S. tarijense* Hawkes, *S. infundibuliforme* Phil., *S. canasense* Hawkes и *S. stoloniferum* Schlecht. et Bché. Высокоустойчивые к *M. euphorbiae* формы относятся к 24 из 85 изученных видов, к 10 из 18 серий; наибольшее число устойчивых форм содержат виды *S. bulbocastanum*, *S. stoloniferum* и *S. demissum* Lindl. Выявлены образцы диких видов со специфической и групповой устойчивостью к тлям. В качестве основного механизма устойчивости к *M. persicae* и *M. euphorbiae* рассматривается железистое опушение листьев и стеблей таких видов, как *S. polyadenium* Greenm., *S. tarijense* и *S. berthaultii* Hawkes. Гибриды от скрещивания *S. tuberosum* с *S. berthaultii* широко использовались в селекционных программах, однако наличие железистых волосков оказалось сцеплено с рядом нежелательных признаков. Ожидается, что с помощью молекулярно-генетических методов удастся преодолеть ассоциацию обусловленную трихомами устойчивости к насекомым *S. berthaultii* с нежелательными агрономическими признаками. При исследовании антифидантной активности содержащихся в картофеле гликоалкалоидов и их аглюконов получены противоречивые результаты. Многочисленные работы связывают устойчивость картофеля к тлям с физиологическим состоянием растений. Выявлены различия между образцами диких видов картофеля по локализации факторов устойчивости (поверхность листа, эпидермис, мезофилл, флоэма), что свидетельствует о различии механизмов резистентности у исследованных форм. Большое теоретическое и практическое значение имеют работы, нацеленные на изучение механизмов индуцируемой устойчивости картофеля к тлям.

Ключевые слова: генетические ресурсы картофеля; большая картофельная тля; персиковая тля; устойчивость; железистое опушение; селекция растений.

Aphid resistance in potato

E.E. Radchenko

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

The problem of aphid resistance of potato genetic resources is discussed. Generally, resistance to the green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer) and the potato aphid (*Macrosiphum euphorbiae* Thomas) is analyzed in all available literature sources. The *Solanum tuberosum* L. gene pool contains very few resistant forms. Accessions highly resistant to *M. persicae* were revealed among 36 of 86 examined wild potato species. The largest number of resistant forms was found among *S. bulbocastanum* Dun., *S. tarijense* Hawkes, *S. infundibuliforme* Phil., *S. canasense* Hawkes and *S. stoloniferum* Schlecht. et Bché. The forms highly resistant to *M. euphorbiae* belong to 24 of 85 studied species, namely to 10 of 18 series; the species *S. bulbocastanum*, *S. stoloniferum* and *S. demissum* Lindl. include the maximum number of resistant forms. Wild species accessions with specific and group resistance to aphids were revealed. Glandular pubescence of leaves and stems in such species as *S. polyadenium* Greenm., *S. tarijense* and *S. berthaultii* Hawkes is considered as the main mechanism of resistance. Hybrids between *S. tuberosum* and *S. berthaultii* were widely used in breeding programs; however, the presence of glandular trichomes was linked to a number of undesirable characters. It is expected that association between the trichome conditioned insect resistance of *S. berthaultii* and undesirable agronomic traits could be overcome with the use of molecular genetic methods. Studies of the antifeedant activity of potato glycoalkaloids and their aglucons produced controversial results. In numerous works the aphid resistance of potato is connected with plant physiological state. Differences among wild potato accessions in the localization of resistance factors (leaf surface, epidermis, mesophyll, floema) were found that were indicative of differences of resistance mechanisms in the studied forms. Works on investigating induced aphid resistance in potato have great theoretical and practical significance.

Key words: genetic resources of potato; potato aphid; green peach aphid; resistance; glandular pubescence; plant breeding.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Радченко Е.Е. Устойчивость картофеля к тлям. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(1):74-82. DOI 10.18699/VJ17.225

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Radchenko E.E. Aphid resistance in potato. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):74-82. DOI 10.18699/VJ17.225

За последние годы на многих культурах, в том числе на картофеле, существенно увеличилась вредоносность тлей. Потери урожая зависят от численности тлей и сроков заселения ими растений, а также от продолжительности питания фитофагов. Однако высокая вредоносность тлей на картофеле обсуждается прежде всего в связи с переносом этими насекомыми вирусных заболеваний.

Видовой состав тлей, питающихся на картофеле, достаточно обширен. В России обычно отмечают следующие виды тлей: бобовая *Aphis fabae* Scop., персиковая *Myzus persicae* Sulzer, большая картофельная *Macrosiphum euphorbiae* Thomas, обыкновенная картофельная *Aulacorthum solani* Kalt., крушинная *Aphis nasturtii* Kalt., крушинниковая *Aphis frangulae* Kalt. (Зыкин, 1970; Берим, 2015). Кроме того, в качестве переносчиков вирусов картофеля в литературе приводится обширный список других видов. Так, вследствие довольно слабой способности злаковых тлей отличать кормовое растение от не кормового, эти вредители могут быть важными переносчиками вирусных заболеваний картофеля (Wikteliuss, 1982; Mondal et al., 2016).

Селекция устойчивых генотипов растений – радикальный и вместе с тем наиболее дешевый и экологически безопасный способ борьбы. По общепринятой классификации Р.Н. Painter (1951), отражающей экологические аспекты взаимоотношений членистоногих с растениями, выделяют три типа (или категории, «механизма») устойчивости: непреподитаемость = антиксеноз (Kogan, Ortman, 1978), т. е. отвергание растения при возможности выбора; антибиоз (неблагоприятное воздействие на жизнеспособность фитофагов при питании) и толерантность (выносливость). Толерантность обычно связывают с быстрым прохождением уязвимых для насекомых этапов органогенеза и высокой компенсаторной реакцией растений (генетическими системами, неспецифичными по отношению к фитофагам).

Исследование типов устойчивости обычно проводят в контролируемых условиях с применением биологически выравненного материала, используя клоны тлей. При оценке антиксеноза насекомым предоставляют свободу выбора растений изучаемых сортов и после подсчета тлей делают вывод о степени привлекательности того или иного сорта. Для тестирования антибиоза используют демографические показатели: продолжительность развития насекомых (общая и по возрастам), плодовитость (общая или за определенный промежуток времени), размеры тела и отдельных его частей, смертность, темпы размножения. При исследовании толерантности растений обычно в течение определенного промежутка времени поддерживают фиксированное количество насекомых, а затем оценивают степень нанесенного вреда. Все три типа устойчивости могут проявляться одновременно у одного растения-хозяина, причем довольно часто бывает трудно отделить, прежде всего, толерантность от антибиоза. Пищевое поведение насекомых (антиксеноз и антибиоз растений) можно изучать с помощью компьютерных технологий: к тлям приклеивают золотые электроды, посредством которых на компьютер поступает информация об их передвижении и продолжительности питания в тканях растения (Alvarez et al., 2006).

Н.И. Вавилов (1986) естественный (врожденный) иммунитет растений к вредным организмам делил на родовой и видовой (обусловлен процессом дивергенции хозяев и паразитов в их эволюции) и сортовой. «Обычный сортовой иммунитет» он подразделял на активный (физиологический), который связан с активной реакцией хозяина, сопровождается физиологическими и химическими реакциями, и пассивный. В свою очередь пассивный иммунитет можно разделить на структурный (механический), который обусловлен морфологическими и анатомическими особенностями сортов, и химический, связанный с наличием в тканях растений определенных химических веществ. Иммунитет по Н.И. Вавилову – это обычно результат взаимодействия многих слагаемых. В литературе обсуждаются механизмы пассивного, а в последнее время и активного иммунитета картофеля к тлям.

Химические соединения, участвующие во взаимодействии растений с фитофагами, делят на аррестанты (вынуждают членистоногих образовывать скопления), аттрактанты (побуждают двигаться к растению), стимуляторы (побуждают к действиям, в том числе к откладке яиц и питанию), детерренты (подавляют питание и откладку яиц), репелленты (заставляют членистоногих двигаться от растения) (Dethier et al., 1960). Одно и то же вещество способно оказывать различное воздействие на фитофагов, и в то же время любое из вышеперечисленных воздействий может быть вызвано несколькими химическими соединениями. Сведения о веществах, вырабатываемых растениями для защиты от фитофагов, чрезвычайно обширны, имеется ряд подробных сводок, например (Reese, Holyoke, 1987). Выявлены растительные белки, обладающие пестицидной активностью; обсуждается роль вторичных метаболитов – терпеноидов, фенолов, флавоноидов, алкалоидов, глюкозинолатов.

Взаимодействие тлей с растениями-хозяевами

Присущая тлям гетерогония (чередование амфимиксиса и партеногенеза) обеспечивает комбинацию преимуществ двух типов размножения. При массовом размножении партеногенетических поколений весной и летом происходит увеличение популяций тлей. Каждая особь воспроизводит себе подобную, что благоприятствует сохранению в популяциях любой вариации кариотипа, все мутации фиксируются. Осеннее амфигонное поколение служит источником генетической изменчивости. Генетическое разнообразие популяций насекомых обеспечивается за счет генных и хромосомных мутаций, рекомбинации и ассимиляции иммигрантов; гетерогенность популяций предоставляет материал для естественного отбора. Для тлей характерно специфическое взаимодействие с кормовыми растениями. Внутривидовые формы (биотипы) различаются по вирулентности, т. е. по способности преодолевать устойчивость хозяина.

Взаимодействие вредных организмов с растениями подчиняется отношениям «ген для гена»: каждому гену устойчивости хозяина соответствует специфичный ему ген вирулентности паразита (Flor, 1956). Мутация вирулентности у паразита обуславливает потерю эффективности гена устойчивости. Считается, что устойчивость и авирулентность имеют «плюс»-функции (взаимодей-

ствующие продукты генов), восприимчивость и вирулентность – «минус»-функции. По результатам изучения генетики вирулентности отношения «ген для гена» продемонстрированы для систем взаимодействия большая малинная тля – малина (Briggs, 1965), обыкновенная злаковая тля – пшеница (Puterka, Peters, 1989) и сорго (Puterka, Peters, 1995).

В результате исследования «флоровских» генов устойчивости растений к патогенам показано, что продукты R-генов имеют в своем составе пять структур; в зависимости от их комбинаций R-белки делят на несколько групп. Самый обширный класс составляют гены, кодирующие белки с сайтом связывания нуклеотидов (NBS) и регионом обогащенных лейцином повторов (LRR) (Bent et al., 1994; и др.). R-гены класса NBS-LRR определяют устойчивость растений к фитопатогенам и вредителям (Timmerman-Vaughan et al., 2000). Клонирован ген *Mi-1.2*, который относится к классу NBS-LRR, контролирует расоспецифическую устойчивость томата к *M. euphorbiae*, нематодам и белокрылке (Kaloshian, 2004), но не к *M. persicae* (Gogglin et al., 2001). Специфичность отношений *M. euphorbiae* и картофеля в литературе не обсуждается.

Персиковая тля – широкий полифаг, повреждающий свыше 400 видов растений, относящихся к 40 семействам (Blackman, Eastop, 1984). При этом для насекомого характерна трофическая специализация. Так, выделяют приуроченный к питанию на табаке подвид *M. persicae* ssp. *nicotianae* Blackman (Margaritopoulos et al., 2003). Вместе с тем биотипы, дифференциально взаимодействующие с генотипами картофеля, у *M. persicae* не описаны, хотя противоречивость сведений об устойчивости одних и тех же образцов картофеля к разным популяциям тли свидетельствует о специфичности взаимоотношений.

Устойчивость генетических ресурсов картофеля к тлям

Устойчивость картофеля к тлям стала предметом достаточно активного обсуждения в литературе с конца 30-х годов прошлого века, причем практически во всех источниках, за единичными исключениями, анализируется резистентность к *M. persicae* и, несколько реже, к *M. euphorbiae*. Первоначально исследовалась устойчивость лишь сортов культурного картофеля *Solanum tuberosum* L. Так, выделены слабо заселявшиеся тлями сорта Arran Banner (Maughan, 1937), Green Mountain, Up-to-Date, President (Burnham, MacLeod, 1942) и ряд других. J.B. Adams (1946) обобщила разрозненные исследования, классифицировав свыше 100 сортов картофеля по устойчивости к *M. persicae*. Были выявлены толерантные (Green Mountain, President, Arran Victory), устойчивые (British Queen, De Soto, Epicure) и высокоустойчивые (Houma, Earline, Sequoia) сорта.

Последующие сведения об устойчивости культурного картофеля довольно фрагментарны. Были отобраны клоны *S. tuberosum* subsp. *andigena* Hawkes, устойчивые к *M. persicae* либо *M. euphorbiae*, а также с групповой устойчивостью к двум видам тлей (Tingey, Plaisted, 1976). Антибиозом к *M. persicae* обладают коммерческие сорта Ulster Tarn, Record и Maris Piper (Bintcliffe, Wratten, 1982). В результате исследования 49 сортов выявлен антибиоз

Russet Norkotah к *M. persicae* и Aracy – к *M. euphorbiae*. Устойчивость картофеля к этим видам тлей специфична (Davis et al., 2007). Существенным антибиозом к *M. persicae* в лабораторных опытах характеризуется сорт Anya, а сравнительно поздняя колонизация этого сорта насекомым в поле свидетельствует об антиксенозе растений (Ali et al., 2016). В Иране у коммерческого сорта Cosmos выявлен антибиоз к *M. persicae*, однако этот образец не обладает антиксенозом к вредителю (Mottaghinia et al., 2011).

В многочисленных работах устойчивость картофеля к тлям связывается с физиологическим состоянием растений. В Кении позднеспелый сорт Roslin Tana слабо заселяется тлями (главным образом бахчевой тлей *Aphis gossypii* Glover), что обусловлено не морфологическими особенностями растений, а физиологическими факторами: тли предпочитают питаться на стареющих листьях раннеспелых сортов (Nderitu, Mueke, 1986). В лабораторных опытах Roslin Tana обладал антибиозом и к *M. persicae*. Большая численность насекомого обычно отмечалась на нижних листьях растений (Nderitu, Mueke, 1989). В других экспериментах, напротив, быстрый рост численности персиковой тли, коррелирующий с содержанием азота в листьях, отмечен на позднеспелых сортах Buckskin и Katahdin (Jansson et al., 1987). В Бразилии выделен сорт Baronesa, слабо заселяемый *M. persicae*. Более многочисленные колонии тлей отмечены в средней и нижней частях растений (Lara et al., 1999).

В опытах (Karley et al., 2002, 2003) тли предпочитали питаться на молодых растениях картофеля (до клубнеобразования), что авторы связывали с изменением аминокислотного состава флоэмы «старых» растений. В то же время С.Е. Taylor (1955) наблюдал явное предпочтение *M. persicae* стареющих листьев, и, соответственно, наибольшая численность насекомого отмечена на самых скороспелых сортах (например, Arran Pilot). Другой вид – *A. nasturtii* – заселял листья картофеля любых возрастов, так что более предпочитаемыми оказывались позднеспелые сорта (King Edward, Majestic).

В связи с относительной бедностью генофонда *S. tuberosum* устойчивыми формами возникает необходимость иммунологического изучения диких видов картофеля, пригодных для интрогрессивной селекции. Еще J.B. Adams (1946) выявила высокий уровень устойчивости к *M. persicae* у *S. polyadenium* Greenm. и несколько меньший – у *S. chacoense* Bitt., *S. commersonii* Dun., *S. jamesii* Torr. и *S. demissum* Lindl. В качестве возможных механизмов устойчивости обсуждались опущение листьев и репеллентная активность летучих масел *S. polyadenium*.

В США, в отличие от полученных J.B. Adams в Канаде данных, *S. polyadenium* оказался одним из наиболее восприимчивых к *M. persicae* видов. Высокая устойчивость характерна для диких видов из Мексики. Самые устойчивые к *M. persicae* виды – *S. stenophyllidium* (Bitt.) Rydb. и *S. trifidum* Cogn. из серии *Pinnatisecta* Rydb. К *M. euphorbiae* наиболее устойчивы *S. hjertingii* Hawkes, *S. polytrichon* Rydb. и *S. stoloniferum* Schlecht. et Bché из серии *Longipedicellata* Buk. Большинство образцов *S. bulbocastanum* Dun. из серии *Bulbocastana* (Rydb.) Hawkes отличается устойчивостью к двум видам тлей. Среди 66 изученных видов картофеля высокая устойчивость

к персиковой тле выявлена у *S. brachistotrichum* (Bitt.) Rydb., *S. chiquidenum* Ochoa, *S. etuberosum* Lindl., *S. gourlayi* Hawkes, *S. huancabambense* Ochoa, *S. michoacanum* (Bitt.) Rydb., *S. sanctae-rosae* Hawkes и *S. stenophyllidium* Bitt.; к картофельной тле устойчивы *S. andreanum* Baker, *S. chiquidenum* Ochoa, *S. gourlayi* Hawkes, *S. hjertingii* Hawkes, *S. infundibuliforme* Phil., *S. multidissectum* Hawkes, *S. polytrichon* и *S. × vallis-mexici* Juz. (Radcliffe, Lauer, 1966).

В следующей серии опытов Е.В. Radcliffe, F.I. Lauer (1968, 1970) обнаружили высокую устойчивость к *M. persicae* у образцов мексиканских видов *S. bulbocastanum*, *S. cardiophyllum* subsp. *ehrenbergii* Bitt., *S. michoacanum* (Bitt.) Rydb., *S. stenophyllidium*, *S. stoloniferum*, *S. brachistotrichum*, *S. gourlayi*, *S. infundibuliforme*, *S. marinasense* Vargas, *S. multidissectum*, *S. bukasovii* Juz., *S. fendleri* A. Gray, *S. megistacrolobum* Bitt., *S. stenophyllidium*, *S. verrucosum* Schlecht. Некоторые устойчивые виды (например, *S. michoacanum*) сильно заселялись *M. euphorbiae*, что свидетельствует о различии механизмов резистентности к насекомым. Картофельной тлей слабо заселялись образцы *S. stoloniferum*, *S. bulbocastanum*, *S. hjertingii*, *S. polytrichon*, *S. verrucosum*, *S. multidissectum*, *S. bukasovii*, *S. chomatophilum* Bitt., *S. hougasii* Corr., *S. medians* Bitt. Групповой устойчивостью обладают преимущественно мексиканские виды.

На северо-западе России устойчивостью к тлям характеризовались отдельные образцы *S. hjertingii*, *S. bulbocastanum*, *S. pinnatisectum* Dunal, *S. jamesii*, *S. megistacrolobum* Bitt., *S. trifidum* и *S. michoacanum*. В лабораторных опытах антибиоз к персиковой тле выявлен у *S. trifidum*, *S. stenophyllidium* и *S. pinnatisectum*, а на *S. jamesii* насекомое вовсе не размножалось (Зыкин, 1970).

Иммунологическое изучение диких видов было продолжено, результаты уточнены и систематизированы (Radcliffe, Lauer, 1971). Устойчивость к *M. persicae* характерна для многих видов из серии *Pinnatisecta*, а также для *S. sanctae-rosae* (серия *Megistacroloba* Card. et Hawkes) и *S. bulbocastanum* (серия *Bulbocastana*). Устойчивые к *M. persicae* виды диплоидны ($2n = 24$) и все, кроме аргентинского вида *S. sanctae-rosae*, происходят из Мексики. Устойчивость к *M. euphorbiae* типична для видов из серии *Longipedicellata*, а также для *S. bulbocastanum*, *S. verrucosum* (серия *Demissa* Buk.) и *S. multidissectum* (серия *Tuberosa* Rydb.). Резистентные к этому фитофагу виды тетраплоидны, за исключением *S. multidissectum* и *S. verrucosum*, и происходят из Мексики, кроме перуанского вида *S. multidissectum*.

В серии из 39 полевых и лабораторных опытов сравнивали устойчивость к персиковой тле 82 образцов 42 диких видов картофеля. Полевые испытания были выполнены в США (штаты Миннесота и Нью-Йорк) и Перу, лабораторные – в США (Миннесота), Англии и Перу. В экспериментах использовали популяции тли из США, Англии, Пуэрто-Рико и Перу. Наиболее устойчивы образцы *S. capsicibaccatum* Card. PI 205560; *S. bulbocastanum* PI 275189, PI 275194, PI 275197, WRF 1565; *S. trifidum* PI 255540; *S. canasense* Hawkes PI 283074; *S. chiquidenum* PI 310989; *S. chomatophilum* PI 243340 и *S. etuberosum* PI 245924. Устойчивость была стабильна, независимо от

места исследований и популяции фитофага. Некоторые различия по устойчивости образцов наблюдали при работе с популяциями тли из Перу и Пуэрто-Рико, однако авторы не склонны классифицировать это как специфическое взаимодействие паразита и хозяина, а резистентные формы могут широко возделываться без риска утраты устойчивости (Radcliffe et al., 1988).

Многолетние исследования устойчивости видового разнообразия картофеля к тлям и другим насекомым подытожены в обзоре (Flanders et al., 1992). Высокоустойчивые к *M. persicae* образцы выявлены для 36 из 86 изученных видов, в 14 из 18 серий. Среди них *S. trifidum*, *S. brachistotrichum*, *S. etuberosum*, *S. bulbocastanum*, *S. canasense*, *S. jamesii*, *S. sanctae-rosae*, *S. marinasense*, *S. lignicaule* Vargas, *S. toralapanum* Card. et Hawkes, *S. hjertingii* и *S. infundibuliforme*. Наибольшее число устойчивых форм найдено в пределах видов *S. bulbocastanum*, *S. tarijense* Hawkes, *S. infundibuliforme*, *S. canasense* и *S. stoloniferum*. Высокоустойчивые формы сосредоточены в пределах серий *Circaeifolia* Hawkes, *Bulbocastana*, *Etuberosa* Juz., *Piurana* Hawkes. Устойчивые к *M. euphorbiae* формы относятся к 24 из 85 изученных видов, к 10 из 18 серий. Среди них *S. multidissectum*, *S. lignicaule*, *S. albicans* Ochoa, *S. hjertingii*, *S. bulbocastanum*, *S. chomatophilum*, *S. bukasovii*, *S. hougasii* Corr., *S. stoloniferum*, *S. verrucosum* и *S. medians*. Наибольшее число устойчивых форм содержат виды *S. bulbocastanum*, *S. stoloniferum* и *S. demissum* Lindl.

В опытах А. Askarianzadeh с соавт. (2013) наиболее высоким антибиозом к *M. persicae* характеризовались *S. trifidum* и *S. palustre* (= *S. etuberosum*), а самым восприимчивым видом оказался *S. sanctae-rosae*.

В работе (Le Roux et al., 2007) проанализирована возрастная устойчивость к тлям 14 образцов пяти диких видов картофеля (*S. chomatophilum*, *S. stoloniferum*, *S. bukasovii*, *S. marinasense*, *S. medians*). Отмечена смертность свыше 90 % личинок *M. persicae* на растениях всех пяти видов. Высокую (свыше 90 %) смертность *M. euphorbiae* наблюдали на всех образцах *S. chomatophilum*, *S. stoloniferum* и *S. medians*, а также на образце PI 414155 *S. bukasovii*, т. е. эти формы обладают групповой устойчивостью к двум видам тлей. Для селекционных программ рекомендуются прежде всего образцы *S. chomatophilum* (PI 310943, PI 310990) и *S. stoloniferum* (PI 195167, PI 201855, PI 275248).

Анализ пищевого поведения насекомых показал, что образцы *S. stoloniferum* характеризуются факторами антиксеноза к двум видам тлей, локализованными во флоэме, а *S. chomatophilum* – к *M. persicae*; *M. euphorbiae* легко проникала во флоэму *S. chomatophilum*. Уровень антиксеноза у молодых и взрослых растений *S. stoloniferum* был сходным. Антибиоз – основной механизм устойчивости *S. chomatophilum* к *M. euphorbiae*, экспрессирующийся только у взрослых растений, на которых наблюдали гибель личинок тли (Le Roux et al., 2008). С помощью молекулярных маркеров выявили высокую гетерогенность образца PI 243340 *S. chomatophilum*, в пределах которого идентифицировали 13 генотипов, существенно различающихся по уровню антибиоза к *M. euphorbiae* (Pompon et al., 2011; Pompon, Pelletier, 2012).

В полевых опытах В. Fréchette с соавт. (2010) показана устойчивость образцов PI 230463 *S. polyadenium* и PI 414150 *S. tarijense* к *M. persicae* и *M. euphorbiae*. Образец *S. pinnatisectum* неустойчив к тлям, что расходится с полученными ранее в лабораторных условиях данными (Pelletier, Clark, 2004). Выявленное противоречие авторы объясняют влиянием условий среды на экспрессию устойчивости.

Устойчивость к *M. persicae* образцов *S. tuberosum* и 13 диких клубненосных видов рассмотрена в работе (Alvarez et al., 2006). В ювенильной фазе образцы *S. capsicibaccatum*, *S. multiinterruptum* Bitt., *S. cardiophyllum* Lindl., *S. berthaultii* Hawkes, *S. stoloniferum*, *S. polyadenium* и *S. tarijense* обладали высокой антибиотической устойчивостью к насекомому, меньший уровень антибиоза выявлен у *S. jamesii*, *S. spgazzinii* Bitt., а также у сортов Mondial и Kardal; в период цветения часть образцов утратила устойчивость. Анализ пищевого поведения тли позволил выявить различия между изученными формами по локализации факторов устойчивости (поверхность листа, эпидермис, мезофилл, флоэма), что свидетельствует о различии механизмов резистентности у образцов. Выраженная «поверхностная» устойчивость характерна для видов, имеющих железистое опушение листьев: *S. berthaultii*, *S. polyadenium* и *S. tarijense*, однако на пищевое поведение тли влияли и факторы устойчивости, локализованные в тканях листа.

Образец GLKS 2870 *S. tarnii* Hawkes et Hjerting, два соматических гибрида *S. tarnii* с сортом Delikat и ряд линий BC₁ обладают антибиозом к персиковой тле, обусловленным присутствием антифидантов во флоэме (Thieme et al., 2009).

В результате изучения не клубненосных видов из серии *Etuberosa* наиболее высокий антибиоз к персиковой тле выявлен у *S. brevidens* Phil. Хорошо развитые листья и верхняя часть растений *S. brevidens*, а также молодые растения *S. etuberosum* устойчивы к *M. persicae*, тогда как стареющие листья и пазушные почки *S. brevidens*, хорошо развитые листья *S. etuberosum* и все листья *S. fernandezianum* Phil. – восприимчивы (Valkonen et al., 1992).

Образец PI 245939 *S. etuberosum* обладает устойчивостью к вирусам Y и скручивания листьев, а также антибиозом к *M. persicae* (у питающихся на этом образце имаго меньше размеры тела, их плодовитость снижается). Получены клубненосные формы BC₂ от скрещивания с сортом Katahdin, на которых выявлена высокая смертность личинок насекомого (Novy et al., 2002).

Анализ соматических гибридов *S. bulbocastanum* (образец PI 243510) с культурным картофелем, а также 63 линий BC₁–BC₃ позволил выявить 9 линий, характеризующихся антибиозом к *M. persicae* и 5 линий – к *M. euphorbiae*, а линия K7G-329 обладала комплексной устойчивостью к тлям, вирусу Y и фитофторозу (Davis et al., 2012).

Механизмы устойчивости картофеля к тлям

Имеется обширная литература о связи железистого опушения растений с устойчивостью к насекомым и клещам, например, (Duffey, 1986). Впервые о воздействии опушения листьев *S. polyadenium* на *M. persicae* сообщила J.B. Adams (1946). Затем A. Stringer (1947) обратил внимание на

иммобилизацию насекомого волосками *S. polyadenium*. Железистое опушение листьев и стеблей как механизм устойчивости *S. polyadenium*, *S. tarijense* и *S. berthaultii* к *M. persicae* и *M. euphorbiae* исследовал R.W. Gibson (1971). При повреждении насекомыми волосков из них выделялось прозрачное водорастворимое вещество, которое быстро темнело, утрачивало способность растворяться в воде и приклеивало тлей к листовой поверхности. В результате иммобилизованные насекомые погибали.

Уровень устойчивости картофеля зависит от густоты волосков. Наиболее устойчив вид *S. polyadenium*, имеющий самое плотное опушение (Gibson, 1976). Железистое опушение *S. berthaultii* снижает также распространение вирусной инфекции за счет ограничения миграции крылатых тлей и резкого снижения темпов размножения бескрылых особей (Gunenc, Gibson, 1980). Антибиоз к *M. persicae*, обусловленный железистыми волосками, выявлен и у боливийского вида *S. neocardenasii* Hawkes et Hjerting (Lapointe, Tingey, 1986).

На листьях картофеля были выявлены два типа железистых волосков: А и В (Gibson, Turner, 1977). Трихомы типа А содержат полифенолоксидазу, пока не идентифицированное вещество, и смесь сесквитерпенов, а сложные эфиры, продуцируемые волосками В, повышают экспрессию устойчивости в присутствии волосков А (Neal et al., 1989). Показано, что волоски типа В содержат феромон тревоги тлей (Е)-β-фарнезен (Gibson, Pickett, 1983). Образцы, защищенные волосками А и В, более устойчивы к *M. persicae* по сравнению с формами, имеющими лишь волоски А (Tingey, Sinden, 1982). Устойчивость *S. berthaultii* к насекомому, обусловленная трихомами, наследуется количественно, при этом каждый из взаимодействующих факторов (например, плотность волосков А и В) контролируется небольшим числом генов (Mehlenbacher et al., 1983).

Уже в 1973 г. были получены гибриды от скрещивания дигаметоидов *S. tuberosum* с *S. berthaultii* и *S. tarijense* (Gibson, 1974); показана высокая устойчивость к тлям F₁ и F₂ гибридов *S. tuberosum* (сорт Pentland Crown) × *S. berthaultii* (Gibson, 1976). Уровень антибиоза гибридных клонов *S. tuberosum* × *S. berthaultii*, имеющих два типа волосков, был схож с устойчивостью *S. berthaultii* (Tingey et al., 1982). Обнадеживающие результаты послужили основанием для разработки программ по селекции устойчивых сортов. Вместе с тем вскоре выяснилось, что наличие волосков типа В сцеплено с рядом нежелательных признаков: позднеспелость, низкая урожайность и др. (Kalazich, Plaisted, 1991). Ожидается, что с помощью молекулярно-генетических методов удастся преодолеть ассоциацию обусловленной трихомами устойчивости к насекомым *S. berthaultii* с отрицательными признаками (Bonierbale et al., 1994).

Механизм воздействия на фитофага железистого опушения довольно хорошо показан в системе взаимодействия картофеля – колорадский жук *Leptinotarsa decemlineata* Say. Были исследованы две рецессивные популяции от скрещивания *S. tuberosum* и *S. berthaultii*. Этот материал метили RFLP-маркерами, расположенными на расстоянии примерно 10 сМ друг от друга. Обнаружены слабо экспрессирующиеся локусы количественных признаков

(quantitative trait loci – QTL), контролирующие антиксеноз и антибиоз к жуку, причем каждый QTL объяснял только 4–12 % варьирования данного признака. Сравнивали локализацию QTL устойчивости и физико-химических свойств опушения (густота, активность энзиматического побурения, активность полифенолоксидазы, продуцирование сложных эфиров). При исследовании первой популяции QTL устойчивости были выявлены в хромосомах 1, 5, 10, а признаков трихом – в хромосомах 1, 2, 4, 5, 6, 10, 11. Локализация QTL устойчивости и признаков трихом в хромосомах 5 и 10 совпадала. Для второй популяции показано, что QTL устойчивости находятся в хромосомах 1 и 8, признаков трихом – в хромосомах 4, 6, 8, причем положение QTL устойчивости и признаков трихом в хромосоме 8 совпадает. Таким образом, подтверждена связь опушения с устойчивостью к насекомому, однако трихомы не обуславливают всю вариацию признака. Так, были выявлены лишь QTL устойчивости с сильным эффектом в хромосоме 1; механизм же действия этих генов остается неизвестным (Bonierbale et al., 1994; Yencho et al., 1996).

В многочисленных публикациях описывается антибиотическое воздействие содержащихся в картофеле гликоалкалоидов на колорадского жука и цикадку *Empoasca fabae* Harris, однако устойчивость к *M. persicae* не связана с присутствием в растениях гликоалкалоидов (Tingey, 1984; Radcliffe et al., 1988). Вместе с тем в опытах (Fragoyiannis et al., 1998) у имаго *M. persicae*, содержащихся на питательных средах с типичной для картофеля концентрацией α -хаконина и α -соланина, снижалась плодовитость и повышалась смертность; выявлено антибиотическое воздействие аналогичной диеты и на личинок. При низких концентрациях гликоалкалоидов отмечено повышение репродукции тли.

При изучении воздействия основных гликоалкалоидов картофеля (α -хаконин, α -соланин), аглюкона (соланидин), а также не содержащегося в картофеле гликоалкалоида (α -томатин) и его аглюкона (томатидин) на *M. euphorbiae* обнаружено, что оба «картофельных» гликоалкалоида не оказывали летального воздействия, а в низких концентрациях α -хаконин стимулировал питание насекомого. Однако аглюконы в высоких концентрациях были детеррентами питания и вызывали смертность тли. Очевидно, насекомое хорошо адаптировано к гликоалкалоидам, присутствующим в их природной диете (Güntner et al., 1997). Противоречивые результаты получены при исследовании воздействия на *M. euphorbiae* ряда других гликоалкалоидов и их аглюконов. Полагают, что важную роль при этом играют структурные особенности стероидных алкалоидов и их аглюконов (Güntner et al., 2000).

Появляется все больше работ, посвященных индуцируемой (активной, по Н.И. Вавилову) устойчивости растений к фитофагам и связывающих механизмы резистентности со сверхчувствительностью – защитной реакцией растения, проявляющейся в быстром локальном отмирании клеток в ответ на проникновение вредного организма и сопровождающейся накоплением в погибших клетках токсических продуктов. Сверхчувствительность типична для устойчивости растений к фитопатогенам и отмечена при заселении различных культур тлями (Smith, Boyko, 2007). «Узнавание» растением питающихся тлей приводит

к активации сигнальных систем, при этом многократно повышается концентрация таких соединений, как жасмоновая и салициловая кислоты, этилен и др. (Smith, Boyko, 2007). Показано, что узнавание картофелем персиковой тли осуществляется с помощью НАДФ-оксидазной и липоксигеназной сигнальных систем (Gosset et al., 2009; Kerchev et al., 2012a, b).

Активную защитную роль выполняют белковые соединения, прежде всего ингибиторы гидролаз фитофагов (протеиназ, α -амилаз и др.) и лектины. Эти вещества присутствуют главным образом в запасающих органах растений, а повреждение насекомыми индуцирует их накопление. Некоторые гены, контролирующие синтез защитных соединений, клонированы и используются для получения устойчивых к членистоногим трансгенных растений.

Неустойчивый к *M. persicae* сорт Désirée трансформировали генами, кодирующими хитиназу фасоли (BCH), лектин подснежника (GNA) и ингибитор α -амилазы пшеницы (WAI). Две линии – PWG6#85 (трансформирована конструкцией WAI/GNA) и PBG6#47 (трансформирована BCH/GNA) – обладали антибиозом к тле (Gatehouse et al., 1996).

Имеются и довольно неожиданные сведения о последствиях генетической трансформации. Для визуализации трансформированных тканей тандемно используют селективный ген *nptII* (неомицин-трансферазы II) и репортерный ген *gus*, кодирующий β -глюкуронидазу (GUS). Экспрессирующийся в трансгенных растениях картофеля белок β -глюкуронидаза повышал репродуктивную активность *M. persicae*, а один из трансформированных клонов был более предпочитает тлей для заселения, чем исходный сорт Désirée (Alla et al., 2003; Cherqui et al., 2003). На трансформированных геном хитиназы жука *Phaedon cochleariae* растениях *M. persicae* развивалась быстрее, а плодовитость оказалась выше, чем при питании на исходном сорте Désirée (Saguez et al., 2005).

Итак, литературные данные свидетельствуют о несомненном генетическом разнообразии рода *Solanum* L. по устойчивости к тлям. Десятки диких видов картофеля обладают эффективными системами защиты от *M. persicae* и *M. euphorbiae*. К сожалению, сведения о физиологических, биохимических и молекулярных механизмах устойчивости растений довольно скудны. Достаточно пристально исследовано лишь железистое опушение картофеля – неспецифический механизм защиты от насекомых. С помощью современных методов удалось быстро получить межвидовые гибриды картофеля, однако широкое использование новых доноров устойчивости в селекционных программах сдерживается тесной ассоциацией железистого опушения с нежелательными агрономическими признаками. Выявлены и другие, еще не идентифицированные факторы устойчивости, локализованные в тканях листа. Для выяснения механизмов резистентности настоятельно необходимы исследования индуцированной устойчивости картофеля к тлям, которые пока находятся на начальной стадии развития.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Adams J.B. Aphid resistance in potatoes. *Am. Potato J.* 1946;23(1): 1-23. DOI 10.1007/BF02883549.
- Ali A., Wright D.J., Tariq K. Resistance to peach-potato aphid, *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae) in potato cultivars. *Gesunde Pflanzen.* 2016;68(4):213-219. DOI 10.1007/s10343-016-0380-6.
- Alla S., Cherqui A., Kaiser L., Azzouz H., Sangwann-Norreel B.S., Giordanengo P. Effects of potato plants expressing the *nptII-gus* fusion marker genes on reproduction, longevity, and host-finding of the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Entomol. Exp. Appl.* 2003; 106(2):95-102. DOI 10.1046/j.1570-7458.2003.00013.x.
- Alvarez A.E., Tjallingii W.F., Garzo E., Vleeshouwers V., Dicke M., Vosman B. Location of resistance factors in the leaves of potato and wild tuber-bearing *Solanum* species to the aphid *Myzus persicae*. *Entomol. Exp. Appl.* 2006;121(2):145-157. DOI 10.1111/j.1570-8703.2006.00464.x
- Askarianzadeh A., Birch A.N.E., Ramsay G., Minaeimoghadam M. Study of wild *Solanum* species to identify sources of resistance against the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Am. J. Potato Res.* 2013;90(1):66-70. DOI 10.1007/s12230-012-9277-9.
- Bent A.F., Kunkel B.N., Dahlbeck D., Brown K.L., Schmidt R., Giraudat J., Leung J., Staskawicz B.J. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science.* 1994;265(5180):1856-1860. DOI 10.1126/science.8091210.
- Berim M.N. Aphids on potato. *Zashhita kartofelya = Potato Protection.* 2015;2:13-15. (in Russian)
- Bintcliffe E.J.B., Wratten S.D. Antibiotic resistance in potato cultivars to the aphid *Myzus persicae*. *Ann. Appl. Biol.* 1982;100(2):383-391. DOI 10.1111/j.1744-7348.1982.tb01952.x.
- Blackman R.L., Eastop V.F. *Aphids of the World's Crops: An Identification and Information Guide.* Chichester: John Wiley and Sons, 1984.
- Bonierbale M.W., Plaisted R.L., Pineda O., Tanksley S.D. QTL analysis of trichome-mediated insect resistance in potato. *Theor. Appl. Genet.* 1994;87(8):973-987. DOI 10.1007/BF00225792.
- Briggs J.B. The distribution, abundance, and genetic relationships of four strains of the rubus aphid (*Amphorophora rubi* (Kalt.)) in relation to raspberry breeding. *J. Horticult. Sci.* 1965;40(2):109-117. DOI <http://dx.doi.org/10.1080/00221589.1965.11514125>.
- Burnham J.C., MacLeod D.J. Varietal susceptibility of potatoes to aphid injury. *Can. Entomol.* 1942;74(2):36. DOI <http://dx.doi.org/10.4039/Ent7436-2>.
- Cherqui A., Alla S., Saguez J., Doury G., Sangwan-Norreel B.S., Giordanengo P. Probiotic effects of β -glucuronidase on the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Aphididae). *J. Insect Physiol.* 2003;49(12): 1199-1209. DOI 10.1016/j.jinsphys.2003.09.004.
- Davis J.A., Radcliffe E.B., Ragsdale D.W. Resistance to green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), and potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas), in potato cultivars. *Am. J. Potato Res.* 2007; 84(3):259-269. DOI 10.1007/BF02986276.
- Davis J.A., Radcliffe E.B., Thill C.A., Ragsdale D.W. Resistance to aphids, late blight and viruses in somatic fusions and crosses of *Solanum tuberosum* L. and *Solanum bulbocastanum* Dun. *Am. J. Potato Res.* 2012;89(6):489-500. DOI 10.1007/s12230-012-9272-1.
- Dethier V.G., Browne L.B., Smith C.N. The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insects. *J. Econ. Entomol.* 1960;53(1):134-136. DOI <http://dx.doi.org/10.1093/jee/53.1.134>.
- Duffey S.S. *Plant glandular trichomes: their partial role in defence against insects. Insects and the Plant Surface.* London: Edward Arnold, 1986;151-172.
- Flanders K.L., Hawkes J.G., Radcliffe E.B., Lauer F.I. Insect resistance in potatoes: sources, evolutionary relationships, morphological and chemical defenses, and ecogeographical associations. *Euphytica.* 1992;61(2):83-111. DOI 10.1007/BF00026800.
- Flor H.H. The complementary genetic systems in flax and flax rust. *Adv. Genet.* 1956;8:29-54.
- Fragoyannis D.A., McKinlay R.G., D'Mello J.P.F. Studies of the growth, development and reproductive performance of the aphid *Myzus persicae* on artificial diets containing potato glycoalkaloids. *Entomol. Exp. Appl.* 1998;88(1):59-66. DOI 10.1046/j.1570-7458.1998.00346.x.
- Fréchette B., Bejan M., Lucas É., Giordanengo P., Vincent C. Resistance of wild *Solanum* accessions to aphids and other potato pests in Quebec field conditions. *J. Insect Sci.* 2010;10(161):1-16.
- Gatehouse A.M.R., Down R.E., Powell K.S., Sauvion N., Rahbé Y., Newell C.A., Merryweather A., Hamilton W.D.O., Gatehouse J.A. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Entomol. Exp. Appl.* 1996;79(3):295-307. DOI 10.1111/j.1570-7458.1996.tb00837.x.
- Gibson R.W. Glandular hairs providing resistance to aphids in certain wild potato species. *Ann. Appl. Biol.* 1971;68(2):113-119. DOI 10.1111/j.1744-7348.1971.tb06448.x.
- Gibson R.W. Aphid-trapping glandular hairs on hybrids of *Solanum tuberosum* and *S. berthaultii*. *Potato Res.* 1974;17(2):152-154. DOI 10.1007/BF02360379.
- Gibson R.W. Glandular hairs are a possible means of limiting aphid damage to the potato crop. *Ann. Appl. Biol.* 1976;82(1):143-146. DOI 10.1111/j.1744-7348.1976.tb01681.x.
- Gibson R.W., Pickett J.A. Wild potato repels aphids by release of aphid alarm pheromone. *Nature.* 1983;302(5909):608-609. DOI 10.1038/302608a0.
- Gibson R.W., Turner R.H. Insect-trapping hairs on potato plants. *PANS (Pest Artic. News Summ.).* 1977;22(3):272-277.
- Goggin F.L., Williamson V.M., Ullman D.E. Variability in the response of *Macrosiphum euphorbiae* and *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) to the tomato resistance gene *Mi*. *Environ. Entomol.* 2001;30(1):101-106. DOI <http://dx.doi.org/10.1603/0046-225X-30.1.101>.
- Gosset V., Harmel N., Göbel C., Francis F., Haubruge E., Wathélet J.-P., du Jardin P., Feussner I., Fauconnier M.-L. Attacks by a piercing-sucking insect (*Myzus persicae* Sultzer) or a chewing insect (*Leptinotarsa decemlineata* Say) on potato plants (*Solanum tuberosum* L.) induce differential changes in volatile compound release and oxylipin synthesis. *J. Exp. Bot.* 2009;60(4):1231-1240. DOI 10.1093/jxb/erp015.
- Gunenc Y., Gibson R.W. Effects of glandular foliar hairs on the spread of potato virus Y. *Potato Res.* 1980;23(3):345-351. DOI 10.1007/BF02360673.
- Güntner C., González A., Dos Reis R., González G., Vázquez A., Ferreira F., Moyna P. Effect of *Solanum* glycoalkaloids on potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae*. *J. Chem. Ecol.* 1997;23(6):1651-1659. DOI 10.1023/B:JOEC.0000006429.14373.91.
- Güntner C., Vázquez A., González G., Usabillaga A., Ferreira F., Moyna P. Effect of *Solanum* glycoalkaloids on potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae*: Part II. *J. Chem. Ecol.* 2000;26(5):1113-1121. DOI 10.1023/A:1005471624833.
- Jansson R.K., Elliott G.C., Smilowitz Z., Cole R.H. Influence of cultivar maturity time and foliar nitrogen on population growth of *Myzus persicae* on potato. *Entomol. Exp. Appl.* 1987;43(3):297-300. DOI 10.1111/j.1570-7458.1987.tb02227.x.
- Kalazich J.C., Plaisted R.L. Association between trichome characters and agronomic traits in *Solanum tuberosum* (L.) $\times$ *S. berthaultii* (Hawkes) hybrids. *Am. Potato J.* 1991;68(12):833-847. DOI 10.1007/BF02853857.
- Kaloshian I. Gene-for-gene disease resistance: bridging insect pest and pathogen defense. *J. Chem. Ecol.* 2004;30(12):2419-2438. DOI 10.1007/s10886-004-7943-1.
- Karley A.J., Douglas A.E., Parker W.E. Amino acid composition and nutritional quality of potato leaf phloem sap for aphids. *J. Exp. Biol.* 2002;205(19):3009-3018.
- Karley A.J., Pitchford J.W., Douglas A.E., Parker W.E., Howard J.J. The causes and processes of the mid-summer population crash of the potato aphids *Macrosiphum euphorbiae* and *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Bull. Entomol. Res.* 2003;93(5):425-437. DOI 10.1079/BER2003252.

- Kerchev P.I., Fenton B., Foyer C.H., Hancock R.D. Infestation of potato (*Solanum tuberosum* L.) by the peach-potato aphid (*Myzus persicae* Sulzer) alters cellular redox status and is influenced by ascorbate. *Plant, Cell & Environ.* 2012a;35(2):430-440. DOI 10.1111/j.1365-3040.2011.02395.x.
- Kerchev P.I., Fenton B., Foyer C.H., Hancock R.D. Plant responses to insect herbivory: interactions between photosynthesis, reactive oxygen species and hormonal signalling pathways. *Plant, Cell & Environ.* 2012b;35(2):441-453. DOI 10.1111/j.1365-3040.2011.02399.x.
- Kogan M., Ortman E.F. Antixenosis – a new term proposed to define Painter's "non-preference" modality of resistance. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 1978;24:175-176.
- Lapointe S.L., Tingey W.M. Glandular trichomes of *Solanum neocardenasii* confer resistance to green peach aphid (Homoptera: Aphididae). *J. Econ. Entomol.* 1986;79(5):1264-1268. DOI http://dx.doi.org/10.1093/jee/79.5.1264.
- Lara F.M., Da Silva E.A., Boiça A.L.J. Resistência de genótipos de batata, *Solanum* spp., a afídeos (Homoptera: Aphididae) e influência sobre parasitoides. *An. Soc. Entomol. Brasil.* 1999;28(4):721-728. DOI http://dx.doi.org/10.1590/S0301-80591999000400015.
- Le Roux V., Campan E.D.M., Dubois F., Vincent C., Giordanengo P. Screening for resistance against *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae* among wild *Solanum*. *Ann. Appl. Biol.* 2007;151(1):83-88. DOI 10.1111/j.1744-7348.2007.00155.x.
- Le Roux V., Dugravot S., Campan E., Dubois F., Vincent C., Giordanengo P. Wild *Solanum* resistance to aphids: antixenosis or antibiosis? *J. Econ. Entomol.* 2008;101(2):584-591. DOI http://dx.doi.org/10.1093/jee/101.2.584.
- Margaritopoulos J.T., Blackman R.L., Tsitsipis J.A., Sannino L. Coexistence of different host-adapted forms of the *Myzus persicae* group (Hemiptera: Aphididae) in Southern Italy. *Bull. Entomol. Res.* 2003;93(2):131-135. DOI 10.1079/BER2002222.
- Maughan F.B. Varietal differences in insect populations and injuries to potatoes. *Am. Potato J.* 1937;14(5):157-161. DOI 10.1007/BF02912036.
- Mehlenbacher S.A., Plaisted R.L., Tingey W.M. Inheritance of glandular trichomes in crosses with *Solanum berthaultii*. *Am. Potato J.* 1983;60(9):699-708. DOI 10.1007/BF02852841.
- Mondal S., Wenninger E.J., Hutchinson P.J.S., Whitworth J.L., Shrestha D., Eigenbrode S.D., Bosque-Pérez N.A. Comparison of transmission efficiency of various isolates of *Potato virus Y* among three aphid vectors. *Entomol. Exp. Appl.* 2016;158(3):258-268. DOI 10.1111/eea.12404.
- Mottaghinia L., Razmjou J., Nouri-Ganbalani G., Rafiee-Dastjerdi H. Antibiosis and antixenosis of six commonly produced potato cultivars to the green peach aphid, *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera: Aphididae). *Neotrop. Entomol.* 2011;40(3):380-386.
- Nderitu J.H., Mueke J.M. Aphid infestation on eight potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) in Kenya. *Insect Sci. Applic.* 1986;7(5):677-682.
- Nderitu J.H., Mueke J.M. Susceptibility of eight potato cultivars to *Myzus persicae* Sulzer in the greenhouse. *Insect Sci. Applic.* 1989;10(2):229-234.
- Neal J.J., Steffens J.C., Tingey W.M. Glandular trichomes of *Solanum berthaultii* and resistance to the Colorado potato beetle. *Entomol. Exp. Appl.* 1989;51(2):133-140. DOI 10.1111/j.1570-7458.1989.tb01223.x.
- Novy R.G., Nasruddin A., Ragsdale D.W., Radcliffe E.B. Genetic resistances to potato leafroll virus, potato virus Y, and green peach aphid in progeny of *Solanum tuberosum*. *Am. J. Potato Res.* 2002;79(1):9-18. DOI 10.1007/BF02883518.
- Painter R.H. *Insect Resistance in Crop Plants*. New York: Macmillan Co., 1951.
- Pelletier Y., Clark C. Use of reciprocal grafts to elucidate mode of resistance to Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* (Say)) and potato aphid (*Macrosiphum euphorbiae* (Thomas)) in six wild *Solanum* species. *Am. J. Potato Res.* 2004;81(5):341-346. DOI 10.1007/BF02870180.
- Pompon J., Li X.-Q., Pelletier Y. Resistance level to an aphid potato pest varies between genotypes from the same *Solanum* accession. *J. Econ. Entomol.* 2011;104(3):1075-1079. DOI 10.1603/EC10278.
- Pompon J., Pelletier Y. Changes in aphid probing behaviour as a function of insect age and plant resistance level. *Bull. Entomol. Res.* 2012;102(5):550-557. DOI 10.1017/S0007485312000120.
- Puterka G.J., Peters D.C. Inheritance of greenbug, *Schizaphis graminum* (Rondani), virulence to *Gb2* and *Gb3* resistance genes in wheat. *Genome.* 1989;32(1):109-114. DOI 10.1139/g89-416.
- Puterka G.J., Peters D.C. Genetics of greenbug (Homoptera: Aphididae) virulence to resistance in sorghum. *J. Econ. Entomol.* 1995;88(2):421-429. DOI http://dx.doi.org/10.1093/jee/88.2.421.
- Radcliffe E.B., Lauer F.I. A survey of aphid resistance in the tuber-bearing *Solanum* (Tourn.) L. species. *Minn. Agr. Exp. Stat. Tech. Bull.* 1966;253:23.
- Radcliffe E.B., Lauer F.I. Resistance to *Myzus persicae* (Sulzer), *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas), and *Empoasca fabae* (Harris) in the wild tuber-bearing *Solanum* (Tourn.) L. species. *Minn. Agr. Exp. Stat. Tech. Bull.* 1968;259:27.
- Radcliffe E.B., Lauer F.I. Further studies on resistance to green peach aphid and potato aphid in the wild tuber-bearing *Solanum* species. *J. Econ. Entomol.* 1970;63(1):110-114. DOI http://dx.doi.org/10.1093/jee/63.1.110.
- Radcliffe E.B., Lauer F.I. Resistance to green peach aphid and potato aphid in introductions of wild tuber-bearing *Solanum* species. *J. Econ. Entomol.* 1971;64(5):1260-1266. DOI http://dx.doi.org/10.1093/jee/64.5.1260.
- Radcliffe E.B., Tingey W.M., Gibson R.W., Valencia L., Raman K.V. Stability of green peach aphid (Homoptera: Aphididae) resistance in wild potato species. *J. Econ. Entomol.* 1988;81(1):361-367. DOI http://dx.doi.org/10.1093/jee/81.1.361.
- Reese J.C., Holyoke C.W., Jr. Allelochemicals affecting insect growth and development. *Handbook of Natural Pesticides*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1987;21-66.
- Saguez J., Hainez R., Cherqui A., Van Wuytswinkel O., Jeanpierre H., Lebon G., Noiraud N., Beaujean A., Jouanin L., Laberche J.-C., Vincent C., Giordanengo P. Unexpected effects of chitinases on the peach-potato aphid (*Myzus persicae* Sulzer) when delivered via transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* Linné) and *in vitro*. *Transgenic Research.* 2005;14(1):57-67.
- Smith C.M., Boyko E.V. The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status. *Entomol. Exp. Appl.* 2007;122(1):1-16. DOI 10.1111/j.1570-7458.2006.00503.x.
- Stringer A. A note on the resistance of *Solanum polyadenium* to aphids. *Ann. Rept. Agr. Hart. Res. Stat. Univ. for 1946*. Bristol (Long Ashton). 1947;88-89.
- Taylor C.E. Growth of the potato plant and aphid colonisation. *Ann. Appl. Biol.* 1955;43(1):151-156. DOI 10.1111/j.1744-7348.1955.tb02464.x.
- Thieme R., Heinze M., Thieme T., Schubert J., Heimbach U. Analysis of the behaviour of virus transmitting green peach aphid, *Myzus persicae*, feeding on wild potato, *Solanum tarnii*, interspecific somatic hybrids and their progeny. *REDIA.* 2009;92:253-256.
- Timmerman-Vaughan G.M., Frew T.J., Weeden N.F. Characterization and linkage mapping of R-gene analogous DNA sequences in pea (*Pisum sativum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2000;101(1-2):241-247. DOI 10.1007/s001220051475.
- Tingey W.M. Glycoalkaloids as pest resistance factors. *Am. Potato J.* 1984;61(3):157-167. DOI 10.1007/BF02854036.
- Tingey W.M., Plaisted R.L. Tetraploid sources of potato resistance to *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, and *Empoasca fabae*. *J. Econ. Entomol.* 1976;69(5):673-676. DOI http://dx.doi.org/10.1093/jee/69.5.673.
- Tingey W.M., Plaisted R.L., Laubengayer J.E., Mehlenbacher S.A. Green peach aphid resistance by glandular trichomes in *Solanum tuberosum* × *S. berthaultii* hybrids. *Am. Potato J.* 1982;59(6):241-251. DOI 10.1007/BF02856560.

- Tingey W.M., Sinden S.L. Glandular pubescence, glycoalkaloid composition, and resistance to the green peach aphid, potato leafhopper, and potato flea beetle in *Solanum berthaultii*. Am. Potato J. 1982; 59(3):95-106. DOI 10.1007/BF02866364.
- Valkonen J.P.T., Brigneti G., Pehu E. Resistance to *Myzus persicae* (Sulz.) in wild potatoes of the series *Etuberosa*. Acta Agric. Scand., Sect. B. 1992;42(2):118-127. DOI <http://dx.doi.org/10.1080/09064719209410209>.
- Vavilov N.I. Immunitet rastenii k infekcionnym zabolevaniyam [Plant immunity to infectious diseases]. Moscow, Nauka Publ., 1986. (in Russian)
- Wikteliuss S. Flight and settling behaviour of *Rhopalosiphum padi* (L.) (Homoptera: Aphididae). Bull. Entomol. Res. 1982;72(1):157-163. DOI <http://dx.doi.org/10.1017/S0007485300050380>.
- Yencho G.C., Bonierbale M.W., Tingey W.M., Plaisted R.L., Tanksley S.D. Molecular markers locate genes for resistance to the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, in hybrid *Solanum tuberosum* × *S. berthaultii* potato progenies. Entomol. Exp. Appl. 1996;81(2):141-154. DOI 10.1111/j.1570-7458.1996.tb02026.x.
- Zikin A.G. Tli – perenoschiki virusov kartofelya [Aphids as potato virus transmitters]. Leningrad, Kolos Publ., 1970. (in Russian)



Цитоплазматическая мужская стерильность и перспективы ее использования в селекционно-генетических исследованиях и семеноводстве картофеля

И.Н. Анисимова¹, Т.А. Гавриленко^{1, 2}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова» (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия

Возрастающий интерес к цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) и поиску генов восстановления фертильности пыльцы (*Rf*) у картофеля обусловлен появлением нового направления в современной селекции этой важной культуры, которое заключается в создании гетерозисных гибридов, полученных от скрещиваний инбредных диплоидных линий. В статье дается обзор основных результатов исследований генетических систем ЦМС-*Rf*, проведенных на разных видах культурных растений, обсуждаются современные подходы к изучению молекулярных механизмов ЦМС и восстановления фертильности пыльцы, а также имеющиеся на сегодняшний день литературные данные по состоянию этих исследований у картофеля. Рассматривается природа химерных митохондриальных генов, обуславливающих цитоплазматическую мужскую стерильность, обсуждаются особенности структуры и функции генов восстановления фертильности пыльцы; приведены примеры генетических систем ЦМС-*Rf* у культурных видов растений, в том числе у представителей семейства пасленовых. Освещаются основные результаты исследований молекулярных механизмов ЦМС и восстановления фертильности в постгеномную эру, полученные на разных видах растений с использованием методов транскриптомного и протеомного анализов. Как и у большинства видов растений, у картофеля признак цитоплазматической мужской стерильности имеет гибридную природу. Рассматриваются результаты исследований генетического контроля мужской стерильности у картофеля, которые были выполнены с использованием традиционных подходов (гибридологического анализа) и привели к формированию концепции генно-цитоплазматической мужской стерильности ряда видов секции *Petota* рода *Solanum*. Дана характеристика различных типов цитоплазм картофеля, ассоциированных с проявлением мужской стерильности. Согласно классификации Hosaka, Sanetomo (2012), они включают: T/бета, W/гамма и D, каждый из которых отличается по фенотипическому проявлению признака мужской стерильности, а также по частоте встречаемости в генофонде селекционных сортов и у разных видов картофеля. Представлены результаты исследований по разработке ДНК-маркеров для идентификации различных типов цитоплазм картофеля.

Ключевые слова: цитоплазматическая мужская стерильность; гены *Rf*; *Solanum*; картофель; гибридизация.

Cytoplasmic male sterility and prospects for its utilization in breeding, genetic studies and seed production of potato

I.N. Anisimova¹, T.A. Gavrilenco^{1, 2}

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

² St. Petersburg State University, Biological Faculty, St. Petersburg, Russia

Increasing interest to cytoplasmic male sterility (CMS) and searching for restoration of pollen fertility (*Rf*) genes in potato is determined by a new way in the modern breeding of this important crop, the development of heterotic hybrids obtained after crosses of inbred diploid lines. The paper reviews the main results of studies on CMS-*Rf* genetic systems in different species of cultivated plants, the modern methods and approaches of investigating molecular mechanisms of CMS and pollen fertility restoration, and also the available literature data on the status of these studies in potato. The nature of chimeric mitochondrial genes accounting for cytoplasmic male sterility is considered; the peculiarities of the structure and functions of restoration of pollen fertility genes are discussed; examples of CMS-*Rf* genetic systems in cultivated plant species including representatives of the family Solanaceae are presented. The main results of research on molecular mechanisms of CMS and fertility restoration obtained in the post-genomic era for various plant species using methods of transcriptomic and proteomic analyses are provided. As in many plant species, cytoplasmic male sterility in potato is of hybrid origin. The results of investigating genetic control of male sterility in potato are presented that have been carried out using conventional approaches (hybridological analysis) and led to the formation of the concept of genic cytoplasmic male sterility in some species of section *Petota* of the genus *Solanum*. The characteristics of potato cytoplasm types which are associated with male sterility are given. According to classification of Hosaka, Sanetomo (2012), these types include: T/beta, W/gamma and D, each distinguished by the phenotypic appearance of male sterility traits



and also by the frequency of occurrence in the breeding varieties gene pool and in various potato species. The results of studies on developing DNA markers for identification of various potato cytoplasm types are presented.

Key words: cytoplasmic male sterility; *Rf* genes; *Solanum*; potato; hybridization.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Анисимова И.Н., Гавриленко Т.А. Цитоплазматическая мужская стерильность и перспективы ее использования в селекционно-генетических исследованиях и семеноводстве картофеля. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(1):83-95. DOI 10.18699/VJ17.226

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

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

Селекционно-генетические исследования возделываемого картофеля – *Solanum tuberosum* L. ($2n = 4x = 48$) – существенно осложняет комплекс следующих факторов: стерильность многих форм, автотетраплоидность, высокий уровень гетерозиготности, тетрасомное (до 4 аллелей на локус) наследование и проявление сильной инбредной депрессии. В отечественной селекции картофеля преимущественно используют традиционные методы межсортовых скрещиваний и межвидовой гибридизации, селекция проводится на тетраплоидном уровне. В мировой практике помимо этих традиционных методов для повышения эффективности отбора применяют достаточно сложные схемы селекции на диплоидном уровне, включающие: получение с использованием гаплопродюсеров дигаплоидов ($2n = 2x = 24$); вовлечение их в межвидовую или внутривидовую гибридизацию; отбор в расщепляющихся поколениях перспективных диплоидных генотипов, обладающих селекционно-ценными признаками; отбор среди них генотипов, способных формировать нередуцированные гаметы для возврата на исходный тетраплоидный уровень; скрещивания отобранных генотипов между собой либо с тетраплоидными сортами с целью комбинирования ценных признаков (Hougas, Peloquin, 1957, 1958; Chase, 1963; Peloquin et al., 1989a, b; Jansky, Peloquin, 2006). Отметим, что самонесовместимость, характерная для большинства диплоидных видов картофеля, ограничивает возможности проведения генетических исследований на диплоидном уровне.

В последние десятилетия в селекционном процессе как на тетра-, так и на диплоидном уровне все шире используют методы биотехнологии и молекулярной биологии (например, индукция андрогенеза *in vitro*, методы маркер-опосредованной и геномной селекции) (Veilleux, 1999; Gebhardt et al., 2006; Mori et al., 2015).

Для стабильного воспроизводства сортов картофеля применяют методы вегетативного размножения (клубневые репродукции, клоновый отбор, микроразмножение), поскольку половое размножение разрушает генетическую структуру селекционных сортов, представленных высокогетерозиготными тетраплоидными генотипами. До недавнего времени в картофелеводстве доминировало представление о том, что вегетативное размножение – идеальный и единственно возможный способ воспроизводства возделываемого картофеля.

В последние годы было обосновано новое направление селекции и семеноводства картофеля, представляющее

«радикальную смену парадигмы» в создании и воспроизводстве сортов этой важной культуры (Lindhout et al., 2011; Jansky et al., 2016). Это направление включает: создание инбредных самофертильных диплоидных линий с использованием мутаций самосовместимости, например мутации гена *Sli* (Hosaka, Hanneman, 1998); отбор линий с высокой комбинационной способностью и проведение направленных скрещиваний между ними для получения гибридных семян (настоящих ботанических семян – true potato seeds, TPS) и гетерозисных диплоидных гибридов. Эффективные методы создания инбредных линий, межлинейной гибридизации и массового производства гибридных семян на основе мужской стерильности (ЦМС или ГМС) успешно реализованы в селекции и семеноводстве многих представителей крупных, овощных, зерновых и других культур, для которых разработаны теоретические основы гибридной селекции, базирующиеся на исследованиях самонесовместимости, гетерозиса и генетических систем ЦМС-*Rf*. У картофеля эти вопросы мало изучены, хотя в последнее время возрастает интерес к исследованию этих проблем. Так, с использованием мутации самосовместимости гена *Sli* созданы инбредные диплоидные линии картофеля, высокая степень гомозиготности которых подтверждена SNP-сканированием, получены межлинейные гибриды и первые успешные результаты их селекционно-генетических исследований (Phumichai et al., 2005; Lindhout et al., 2011; Jansky et al., 2014, 2016; Endelman, Jansky, 2016). Прогнозируемыми преимуществами гетерозисной гибридной селекции картофеля на диплоидном уровне являются: повышение эффективности отбора генотипов с аллелями генов (QTL), детерминирующими ценные признаки и результативность элиминации аллелей, ассоциированных с инбредной депрессией и негативными свойствами; кардинальное сокращение сроков селекционного процесса, а также возможность отказаться от затратных технологий получения и репродуцирования безвирусного картофеля, поскольку подавляющее большинство патогенов с пылью не передаются (Lindhout et al., 2011; Jansky et al., 2014).

Гораздо меньший прогресс у картофеля достигнут в области исследований систем ЦМС-*Rf*. Классификация разных типов цитоплазм построена в основном на данных о полиморфизме хлоропластной (хл) ДНК культурных видов картофеля (Hosaka, Sanetomo, 2012); работы, в которых проводился анализ структурных перестроек мтДНК, единичны (Sanetomo, Hosaka, 2013); отсутствуют данные

о механизмах взаимодействий ядерного и митохондриального (мт) геномов; имеется ограниченная информация о генах восстановления фертильности. В то же время исследования генетических систем ЦМС-*Rf* являются основой для разработки методов гибридной гетерозисной селекции у картофеля, а информация о типах цитоплазм у сортов, источников и доноров ценных признаков необходима для эффективного подбора пар для скрещиваний. В этой связи представляется актуальным обсудить достигнутые результаты изучения систем ЦМС-*Rf*, полученные для разных видов культурных растений, современные методы и подходы исследования данной проблемы, а также имеющиеся на сегодняшний день литературные данные, касающиеся картофеля.

Системы ЦМС-*Rf* у растений

Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) – наследуемая по материнской линии неспособность растений продуцировать жизнеспособную пыльцу, описана у нескольких сотен видов (Horn, 2006; Иванов, Дымшиц, 2007), включая многих представителей семейства пасленовых (Young, Hanson, 1987; Kim D., Kim B., 2006; Stoeva-Popova et al., 2007), к которому принадлежит и картофель. Признак ЦМС проявляется в результате взаимодействия определенных мутантных аллелей мт-генома с рецессивными аллелями ядерных генов восстановления фертильности (*rf*). Реверсии ЦМС-форм к фертильности могут быть получены при введении доминантных аллелей генов *Rf* в генотип растений-носителей стерильных цитоплазм. Генетические системы ЦМС-*Rf*, широко используемые в семеноводстве гибридов ряда экономически важных растений (кукурузы, риса, хлопчатника, подсолнечника, ряда овощных культур), служат эффективными моделями для изучения механизмов взаимодействий ядерного и мт-геномов.

Большинство источников ЦМС у растений получены на основе межвидовой гибридизации. Для выявления молекулярных различий между стерильным и фертильным типами цитоплазм использовались методы рестрикционного и RFLP анализов мтДНК, секвенирования мт-генома и его отдельных участков, изучения экспрессии в прокариотических системах, а также различные системы молекулярных маркеров на основе ПЦР. Работы по изучению особенностей проявления признака ЦМС, выяснению структуры мт-генов у ЦМС-форм, особенностей их взаимодействия с ядерным геномом подробно обсуждаются в ряде обзоров (Schnable, Wise, 1998; Тырнов, Эльконин, 2000; Hanson, Bentolila, 2004; Chase, 2006; Horn, 2006; Анисимова, Гаврилова, 2012; Chen, Liu, 2014; Touzet, Meyer, 2014).

В большинстве случаев факторами, индуцирующими мужскую стерильность, являются так называемые химерные гены, возникающие в результате множественных перестроек последовательностей мтДНК, наиболее часто включающие копии (или их фрагменты) генов «домашнего хозяйства» митохондрий и/или новые, не идентифицированные последовательности (*orf*), кодирующие специфичные для ЦМС белки. Ассоциированные с ЦМС локусы чрезвычайно разнообразны, но чаще всего содержат гены (или их фрагменты), кодирующие разные субъеди-

ницы АТФ-синтаз (*atp*), либо локализованы вблизи этих генов. В ряде случаев ЦМС-локусы могут включать последовательности генов цитохромоксидазы (*cox*) и NADH-дегидрогеназы (*nad*), кодирующих белковые компоненты дыхательной цепи, а также фрагменты генов ядерной или хлДНК (Даниленко, Давыденко, 2003; Hanson, Bentolila, 2004; Mackenzie, 2004). Для одних видов формирование стерильной пыльцы у ЦМС-форм связывают с появлением в клетках пыльников новых транскриптов и полипептидов, кодируемых химерными генами, для других видов такие молекулярные маркеры признака ЦМС не выявлены (Hanson, Bentolila, 2004; Mackenzie, 2004; Satoh et al., 2004).

В клетках ЦМС-линий наряду с реорганизованными копиями мтДНК могут присутствовать в разной копииности и нереорганизованные копии связанных с ЦМС участков, а также целые молекулы мтДНК, не подвергшиеся перестройкам, причем у некоторых видов растений гетероплазмия является естественным состоянием мтДНК (Дымшиц, 2002; Даниленко, Давыденко, 2003; Брагин и др., 2011). Для отдельных видов показано, что ядерные гены могут оказывать влияние на соотношение мутантных и интактных молекул в общем пуле мтДНК (Abdelnoor et al., 2003; Shedje et al., 2007).

У различных культур компонентами генетических систем ЦМС-*Rf*, используемыми для производства гибридных семян, являются материнская линия ЦМС, ее фертильный аналог – закрепитель стерильности, и отцовская линия-восстановитель фертильности, несущая ядерный ген (или гены) восстановления фертильности. При изучении генетического контроля восстановления фертильности пыльцы, идентификации генетических факторов, отвечающих за проявление этого признака, используются методы классического генетического анализа. В селекции линий-восстановителей принципиальное значение имеет отбор генотипов, несущих функциональные аллели генов восстановления фертильности. Традиционно для выявления в генотипе генов, восстанавливающих фертильность, и изучения особенностей их экспрессии проводят тест-скрещивания с ЦМС-линиями и анализируют растения F_1 . Этот длительный и трудоемкий процесс может быть ускорен благодаря использованию методов маркер-опосредованной селекции. В этой связи в последние десятилетия интенсивно развиваются методы молекулярного маркирования генов *Rf* на основе различных маркерных систем – RAPD, RFLP, AFLP, SSR (Klein et al., 2001; Horn, 2006; Wang et al., 2006; Kim et al., 2010; Dong et al., 2012; Liu Z. et al., 2013; Анисимова и др., 2015; Bisht et al., 2015; Kiani, 2015; и др.).

К настоящему времени гены восстановления фертильности выделены и охарактеризованы на молекулярном уровне лишь для небольшого числа видов. Среди них *Rf2* кукурузы, кодирующий альдегиддегидрогеназу (Cui et al., 1996), *Rf17* и *Rf2* риса, кодирующие синтаза-подобный белок-переносчик ацильной группы (Fujii, Toriyama, 2009) и глицин-богатый белок (Itabashi et al., 2011) соответственно, а также ген *Rf1* сахарной свеклы, кодирующий OMA1-подобный белок, сходный с протеазой дрожжей (Kitazaki et al., 2015). Все другие идентифицированные к настоящему времени гены *Rf* кодируют PPR-белки, которые характеризуются наличием tandemно повторяющихся

вырожденных последовательностей из 35 аминокислотных остатков (pentatricopeptide repeats – PPR). Семейство PPR-генов широко представлено у высших растений, вовлечено в антероградную/ретроградную регуляцию и играет важную роль в согласованной работе геномов ядра и органелл. PPR-белки необходимы для правильного процессинга и/или трансляции органелльных РНК (Lurin et al., 2004; Юрина, Одинцова, 2010). Принадлежность генов *Rf* к семейству, кодирующему PPR-белки, подтверждена для петунии (Bentolila et al., 2002), перца чили (Kim et al., 2010), риса (Kazama, Toriyama, 2003; Huang et al., 2015), редиса (Brown et al., 2003; Wang et al., 2015), капусты (Ahmad et al., 2013), кукурузы (Gabay-Laughnan et al., 2004; Meyer et al., 2011), сорго (Klein et al., 2005; Jordan et al., 2011). Не всегда удается идентифицировать гены *Rf* с помощью позиционного клонирования, что обусловлено сложной организацией этих локусов (Horn, Hamrit, 2010). Поэтому для их определения может быть использован сравнительно-генетический подход, основанный на поиске в геноме изучаемого вида последовательностей-кандидатов, гомологичных известным генам *Rf* (Yue et al., 2010; Anisimova et al., 2014). Недавно была продемонстрирована возможность *in silico* идентификации генов-кандидатов *Rf* на основе анализа биоинформационных баз данных (Sykes et al., 2016).

PPR-гены, продукты которых ассоциированы с функцией восстановления фертильности, выделены в отдельное подсемейство *RFL-PPR* (restoration of fertility like-PPR). Отличительной чертой *RFL-PPR*-генов высших растений является кластерная организация в геноме, уникальный характер дивергенции PPR-мотивов (Fujii et al., 2011) и высокая скорость эволюции (Dahan, Mireau, 2013). Продemonстрирован согласованный характер эволюции ассоциированных с ЦМС митотипов и соответствующих нуклеотипов – кандидатов генов *Rf* у риса (Tan et al., 2011).

Показано, что эффекты большинства идентифицированных к настоящему времени генов *Rf* проявляются на уровне процессинга мРНК или трансляции (см. таблицу). Для выяснения связи между структурой PPR-доменов и функцией генов *Rf* недавно был успешно использован метод направленного мутагенеза *RFL-PPR*-последовательностей и сравнительного анализа экспрессии *in vivo* (Qin et al., 2014). Данные первых экспериментов по изучению процессинга транскриптов мт-генома показали, что продукты генов *Rf* взаимодействуют с продуктами аберрантных генов митохондрий через формирование комплексов с другими белками (Huang et al., 2013). Однако четкого понимания действия генов восстановления фертильности пыльцы пока нет (Touzet, Meyer, 2014), а имеющаяся информация еще очень фрагментарна либо фактически отсутствует для представителей многих видов.

У культурных видов семейства пасленовых практическое применение получили генетические системы ЦМС-*Rf* сладкого и жгучего (чили) перца *Capsicum annuum* и баклажана *Solanum melongena*. Однако на молекулярном уровне ассоциированные с ЦМС мт-гены и ядерный ген *Rf* описаны лишь у перца. Известны по меньшей мере два мт-гена, обуславливающих ЦМС у перца, и определена природа ядерного гена *Rf* (Jo et al., 2009, 2016; Kim et al., 2009, 2010). У баклажана описаны несколько аллоплазма-

тических типов ЦМС, но гены восстановления фертильности пыльцы для них охарактеризованы только на фенотипическом уровне (Saito et al., 2009; Khan, Isshiki, 2011).

Использование транскриптного, протеомного и метаболомного анализов для изучения механизмов ЦМС

В постгеномную эру для изучения молекулярных механизмов и идентификации генов и генных путей, ассоциированных с цитоплазматической мужской стерильностью и восстановлением фертильности, используются методы иммуноцитохимии, секвенирования нового поколения (new generation sequencing – NGS), профилирования транскриптома, протеомного и метаболомного анализов. Первые данные по изучению транскриптома линий ЦМС и их фертильных аналогов были опубликованы сравнительно недавно.

Сравнительный полногеномный анализ транскриптома у стерильных (ЦМС D8) линий *Gossypium hirsutum* и их фертильных аналогов на микрочипах платформы Affymetrix проведен в работе (Suzuki et al., 2013). Исследования дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) у линий ЦМС и закрепителей стерильности с использованием методов высокопроизводительного секвенирования выполнены для рапса (Yan et al., 2013), хлопчатника (Yang P. et al., 2014), сои (Li et al., 2015; Du et al., 2016), редиса (Mei et al., 2016), белокочанной капусты (Wang et al., 2016). На основе профилирования транскриптома у китайской капусты (Liu et al., 2016) и арбуза (Rhee et al., 2015) идентифицированы группы функционально связанных генов, ассоциированных с генной мужской стерильностью (ГМС).

Накопленные к настоящему времени данные показывают, что у разных объектов ассоциированные с ЦМС ДЭГ относятся к различным функциональным категориям. Так, при сравнительном анализе транскриптома линии ЦМС NJCMS1A и закрепителя стерильности NJCMS1B у сои было проанализировано 88463 транскрипта и выявлено 365 ДЭГ. У стерильной линии уровень экспрессии 339 ДЭГ был понижен, и только 26 ДЭГ характеризовались повышенным уровнем экспрессии (Li et al., 2015). Тридцать шесть ДЭГ оказались связаны с 33 метаболическими путями. Многие ДЭГ, уровень экспрессии которых понижен у линии NJCMS1A по сравнению с фертильным аналогом, были вовлечены в энергетический метаболизм. По мнению авторов, этот факт, а также значительно сниженный у линии NJCMS1A уровень активности АТФазы свидетельствуют о том, что фенотип ЦМС связан с подавлением экспрессии генов, вовлеченных в энергетические процессы в клетке. Среди других групп ДЭГ, предположительно ассоциированных с проявлением признака ЦМС, были отмечены гены, кодирующие транскрипционные факторы, а также гены, участвующие в развитии пыльников и пыльцевых зерен, вовлеченные в элиминацию реактивных форм кислорода, клеточную трансдукцию. В работе (Mei et al., 2016) не выявлено различий в уровнях транскрипции мт- и хл-генов у двух пар линий ЦМС и закрепителей стерильности редиса НУВР-А/В и УН-А/В (источник – линия 9802А-1), за исключением ассоциированного с ЦМС мт-транскрипта

Examples of CMS/Rf systems in crops

Species	CMS type	Mitochondrial gene	<i>Rf</i> gene	<i>Rf</i> gene product	Function of the protein uncoded by <i>Rf</i>	References
POACEAE						
<i>Oryza sativa</i>	BT	<i>atp6-orf79</i>	<i>Rf1</i>	PPR	mRNA processing	Wang et al., 2006
	LD	<i>orf79</i>	<i>Rf2</i>	Mitochondrial glycine-rich protein	mRNA processing	Itabashi et al., 2011
	HL	<i>orf79</i>	<i>Rf5</i>	PPR	Processing of the <i>atp6-orf79</i> transcript	Hu et al., 2012
	CW	Unknown	<i>Rf17</i>	Mitochondrial protein bearing a synthase-like fragment of the acyl-carrier protein	Participation in retro-grade signaling	Fujii, Toriyama, 2009
<i>Sorghum bicolor</i>	A1	<i>orf107/urf209</i>	<i>Rf1</i>	PPR13	Unknown	Klein et al., 2005
			<i>Rf2</i>	Presumably PPR	Unknown	Jordan et al., 2010
	A1, A2	Unknown	<i>Rf5</i>	Presumably PPR	mRNA processing	Jordan et al., 2011
<i>Triticum aestivum</i>	K	<i>orf256</i>	<i>Rfv</i> ₁ ^{3P} <i>Rfv</i> ₂	Not identified	Unknown	Song et al., 2014
<i>Zea mays</i>	T	<i>T-urf13</i>	<i>Rf1</i>	Not identified	Processing and post-transcriptional reduction of the T-URF13 protein level	Wise et al., 1999
			<i>Rf2</i>	Mitochondrial aldehyde de-hydrogenase	Aldehyde oxidation. Not involved in <i>urf13</i> post-transcriptional processing	Cui et al., 1996
			<i>Rf3</i>	PPR	Unknown	Xu et al., 2009
			<i>Rf8</i>	PPR	<i>urf13</i> transcript processing	Meyer et al., 2011
	S	<i>orf355-orf77</i>	<i>Rf3</i>	Not identified	Post-transcriptional regulation	Wen, Chase, 1999; Gabay-Laughnan et al., 2004
				PPR Non-ATPase subunit 5 of the 26S proteaso	Suppression of programmed cell death	Zhang, Zheng, 2008
CRUCIFERAE						
<i>Brassica napus</i>	Ogura	<i>orf138/orf125</i>	<i>Rfo</i>	PPR	Posttranscriptional regulation	Brown et al., 2003; Desloire et al., 2003
<i>Rhaphanus sativus</i>	Kosena	<i>orf138/orf125</i>	<i>Rfk1</i>	PPR	Post-transcriptional regulation	Koizuka et al., 2003
	DCGMS	<i>orf463</i>	<i>Rfd1</i>	Not identified	Unknown	Kim et al., 2010
MALVACEAE						
<i>Gossypium hirsutum</i>	D2	<i>atp9</i>	<i>Rf1</i>	PPR	Unknown	Zhang, Stewart, 2001
	D8	<i>atpA, cox3, nad6</i>	<i>Rf1, Rf2</i>	Not identified	Unknown	Wu et al., 2011
SOLANACEAE						
<i>Capsicum annuum</i>	S	<i>orf456</i> (bell pepper)	<i>Rf</i>	PPR	Unknown	Jo et al., 2009; Kim et al., 2009
		<i>atp6-2 orf507</i> (chili pepper)	<i>Rf</i>	PPR	Unknown	Gulyas et al., 2010; Jo et al., 2016
<i>Petunia × hybrida</i>	pcf	<i>urf-S</i>	<i>Rf</i>	PPR592	Degradation of mRNA and reduction of the PCF protein level	Bentolila et al., 2002
<i>Solanum melongena</i>	CMS1	Not identified	One dominant gene	Not identified	mRNA processing	Gillman et al., 2007
	CMS2	Not identified	Two independent dominant genes	Not identified	Unknown	Saito et al., 2009
ASTERACEAE						
<i>Helianthus annuus</i>	PET1	<i>orfH522</i>	<i>Rf1, Rf2</i>	Not identified	Unknown	de la Canal et al., 2001; Horn, 2006

orf138. В то же время в группу ДЭГ попали ядерные гены, кодирующие транскрипционные факторы MYB, bHLH, а также PPR-белки и белки теплового шока. Показано участие редокс-гомеостатической системы в формировании мужской стерильности у хлопчатника (Yang P. et al., 2014); получены экспериментальные данные, подтверждающие предположение (Bentolila, Hanson, 2004) о том, что абортивность пыльцы у ЦМС-линий сопровождается нарушениями процессов дыхания и/или программируемой смерти клеток (апоптоза) (Shemesh-Mayer et al., 2015).

У представителей семейства пасленовых транскриптомный анализ выполнен пока лишь для перца чили (Liu C. et al., 2013). В результате сравнительного анализа транскриптомных профилей пыльников линии ЦМС 121А и ее почти изогенного аналога – линии восстановителя фертильности пыльцы 121С – идентифицировано 85 144 транскрипта со средней длиной 643 п. н., среди которых 84 783 представляли белок-кодирующие последовательности. Число генов с повышенным уровнем экспрессии существенно различалось у стерильной линии и у восстановителя фертильности (4326 и 7061 соответственно). Некоторые из них рассматриваются как кандидаты для признака ЦМС (гены субъединиц АТФ-синтазы, цитохромоксидазы) или восстановления фертильности пыльцы (PPR).

Наряду с методами транскриптомного анализа, в последние годы для выяснения молекулярных механизмов ЦМС у различных растений активно привлекаются методы профилирования протеома. Как правило, на первом этапе работы белковые фракции, выделенные из развивающихся пыльников либо из изолированных митохондрий, разделяют методом дифференциального двумерного электрофореза (2-DE), сочетающего изоэлектрическое фокусирование (IEF) или электрофорез нативных белков (blue native electrophoresis – BN-E) – в первом направлении, с электрофорезом в денатурирующих условиях – во втором. Затем полученные белковые компоненты, по которым линии с фертильной и стерильной цитоплазмами различаются, вырезают из гелей и подвергают анализу с использованием технологии MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionization) – масс-спектрометрии (mass spectrometry – MS). Обработка полученных данных с привлечением различных биоинформационных ресурсов позволяет сделать заключение о функциях дифференциально накапливающихся белков.

Первые работы в этом направлении были посвящены исследованию протеома линий риса с широко используемым в гибридной селекции типом ЦМС Honglian (HL) (Wen et al., 2007). С помощью 2-DE и MALDI-TOF-MS в спектрах белков развивающихся пыльников, находящихся на стадии тетрад, авторы идентифицировали до 1 500 компонентов. Сорок восемь уникальных белков, вовлеченных в ряд важных для развития пыльцы процессов (метаболизма, синтеза белков, транскрипции, сигнальной трансдукции, клеточной смерти, иммунного ответа, клеточного транспорта), оказались в различной степени представлены у линий со стерильной и фертильной цитоплазмами. С использованием высокоразрешающей технологии ICAT (isotope-code affinity tag) установлено, что в пыльниках линии риса с ЦМС HL-типа (стадия одноядерных клеток) уровень накопления белков, участвующих в энергетиче-

ских процессах в клетке, значительно снижен в сравнении с фертильным аналогом (Sun et al., 2009). В пыльниках линии рапса с фертильной цитоплазмой наблюдался более высокий уровень экспрессии белков, связанных с метаболизмом, ремоделированием клеточной стенки, фотосинтезом, синтезом флавоноидов, чем у линии с ЦМС Ogura. В то же время в пыльниках стерильной линии отмечался повышенный уровень протеиназ (Sheoran, Sawhney, 2010).

Дифференциальный количественный анализ протеома линии сои с ЦМС NJCMS1А и ее аналога, закрепителя стерильности NJCMS1В, выполнен в работе (Li et al., 2016). С применением технологии iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantification), а также валидации полученных данных с помощью qRT-PCR и анализа активности ферментов авторы выявили несколько ассоциированных с ЦМС ключевых групп белков. Показано, что экспрессия признака ЦМС у сои сопровождается дисбалансом между синтезом и деградацией белков, нарушением синтеза флавоноидов, аномалиями метаболизма, апоптозом. Схожие результаты получены и при изучении белков пыльцы линии *Triticum aestivum* с ЦМС К-типа (Zhang et al., 2016). Мужскую стерильность линии 732А авторы связывают с нарушениями метаболизма, накоплением активного кислорода, программируемой смертью клеток, нарушениями пентозофосфатного пути, гликолизом. В протеомных спектрах семян родительских линий и гибрида F₁ подсолнечника с использованием 2-DE и MALDI-TOF-MS идентифицированы семь дифференциально экспрессирующихся групп белков, вовлеченных в первичный и вторичный метаболизм, энергетические процессы, рост клеток, их деление, устойчивость к болезням (Shabani et al., 2013).

В работах по изучению протеома митохондрий пыльников риса (Wei et al., 2010; Liu et al., 2012) и свеклы (Wesolowski et al., 2015) также выявлены множественные функциональные и метаболические изменения у линий ЦМС по сравнению с фертильными аналогами.

Известно единственное исследование, посвященное дифференциальному анализу протеома представителя семейства пасленовых – перца чили (Wu et al., 2013). Методом 2-DE с последующей масс-спектрометрией выявлены значительные различия в составе и уровне накопления белков между линией ЦМС NA3 и закрепителем стерильности NB3. У линии ЦМС наблюдали пониженный уровень экспрессии D-цепи АТФ-синтазы, форматдегидрогеназы, альфа-маннозидазы и многих других белков, в то время как уровни экспрессии полифенолоксидазы, бета-субъединицы АТФ-синтазы, актина были повышены.

Методы метаболомного анализа пока не используются в исследованиях ядерно-цитоплазматических отношений у форм растений с различными типами цитоплазмона и разными аллелями ядерных генов *Rf*. Однако результаты поискового исследования, выполненного на арабидопсисе, указывают на центральную роль цитоплазматических геномов в контроле изменчивости метаболомных сетей (Joseph et al., 2013).

Таким образом, данные транскриптомного и протеомного анализов свидетельствуют о том, что феномен цитоплазматической мужской стерильности у различных видов растений обусловлен значительными нарушениями, затрагивающими работу различных функционально

связанных групп генов, участвующих в процессах обмена веществ и энергии, деления и гибели клеток. Однако работы в этой области пока выполняются только на модельных для ЦМС объектах, а ввиду весьма ограниченного объема транскриптомных и геномных данных молекулярные механизмы цитоплазматической мужской стерильности и восстановления фертильности до сих пор остаются малоизученными.

Цитоплазматическая мужская стерильность у картофеля

Как и у большинства растений, у картофеля признак цитоплазматической мужской стерильности имеет гибридную природу, т.е. проявляется при скрещиваниях определенных родительских пар в одном направлении и не проявляется в реципрокных комбинациях; в дальнейшем признак ЦМС передается строго по материнской линии. Источники различных типов цитоплазм, ассоциированных с мужской стерильностью, выявлены среди образцов культурного (*S. tuberosum* ssp. *tuberosum*) и диких (например, *S. demissum*, *S. stoloniferum*, *S. verrucosum*) видов картофеля (Dionne, 1961; Grun, Aubertin, 1965; Grun, 1970a, b, 1973; Abdalla, Hermesen, 1971; Grun et al., 1977; Hanneman, Peloquin, 1981; Ross, 1986; Jansky, Hamernik, 2009)¹. Больше всего данных получено для носителей цитоплазмы 'Tuberosum'-типа (или T/бета-, или T-, или культурного, или чилийского типа), источником которой являются местные чилийские сорта картофеля либо полученные на их основе селекционные сорта. Этот тип цитоплазмы был идентифицирован при изучении многочисленных реципрокных комбинаций скрещиваний ($4x \times 4x$) между тетраплоидными чилийскими и андийскими аборигенными сортами – *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* и *S. tuberosum* ssp. *andigenum* соответственно, а также комбинаций скрещиваний ($2x \times 2x$) дигамплоидов *S. tuberosum* с диплоидными дикими или диплоидными культурными видами картофеля. Результаты этих исследований можно обобщить следующим образом.

В комбинациях ($4x \times 4x$) у гибридов (*S. tuberosum* ssp. *tuberosum* $\times$ *S. tuberosum* ssp. *andigenum*) с 'Tuberosum'-типом цитоплазмы проявляются различные аномалии развития генеративных органов (дефектные пыльники, не содержащие пыльцу; срастание пестика и пыльников; стерильность пыльцы и др.); в реципрокных комбинациях эти дефекты не выявлены, гибриды формируют фертильную пыльцу (Grun, 1970a, b, 1973, 1979; Grun et al., 1977; Hoopes et al., 1980). Признак мужской стерильности у гибридов из возвратных скрещиваний наследуется по материнской линии; вместе с тем проявление этого признака определяется ядерно-цитоплазматическими взаимодействиями. Согласно П. Грюну (Grun, 1970a, b, 1973; Grun et al., 1977), генотипы с цитоплазмой 'Tuberosum'-типа (образцы чилийского картофеля и их производные) различаются по наличию плазмогенов – 'plasmon factors' [Sp^s (sporads), SM^s (shrivelled microspores), In^s (indehiscence), TA^s (thin anthers), ASF^s (anther-style fusion), VSA^s (ventral-styles anthers), Fm^s (female sterility)], которые индуцируют

у гибридов разные формы мужской стерильности в присутствии соответствующих ядерных генов (*Sp*, *SM*, *TA*, *In*, *ASF*, *VSA*, *Fm*) андийского картофеля.

В комбинациях ($2x \times 2x$) мужская стерильность выявлена у межвидовых гибридов, полученных в скрещиваниях дигамплоидов *S. tuberosum* (материнская форма, цитоплазма 'Tuberosum') с рядом диплоидных диких видов картофеля: *S. gourlayi*, *S. infundibuliforme*, *S. microdontum*, *S. raphanifolium*, *S. sanctae-rosae*, *S. sparsipilum* (Hermundstad, Peloquin, 1985; Tucci et al., 1996; Santini et al., 2000) или с диплоидными культурными видами (*S. phureja*, *S. stenotomum*) (Ross et al., 1964; Carroll, 1975; Hanneman, Peloquin, 1981; Hilali et al., 1987). В реципрокных комбинациях (когда удавалось в качестве опылителей привлечь редкие фертильные формы дигамплоидов *S. tuberosum*) были получены фертильные формы межвидовых гибридов.

В большинстве случаев межвидовые гибриды с цитоплазмой 'Tuberosum'-типа были полностью стерильны, однако в отдельных комбинациях скрещиваний (дигамплоиды *S. tuberosum* $\times$ диплоидные виды картофеля) наряду со стерильными были получены и фертильные формы гибридов (Hermundstad, Peloquin, 1985). Для объяснения этих результатов была предложена гипотеза генно-цитоплазматической (или ядерно-цитоплазматической) мужской стерильности картофеля, согласно которой мужская стерильность межвидовых гибридов определяется взаимодействием генетических факторов цитоплазмы 'Tuberosum'-типа с доминантным аллелем ядерного гена *Ms* (Male sterility gene) диплоидных видов картофеля (Hanneman, Peloquin, 1981; Hermundstad, Peloquin, 1985; Iwanaga et al., 1991; Camadro et al., 2004). В случае гетерозиготного состояния локуса *Ms* у генотипов (*Ms/ms*) диплоидных видов, используемых в качестве опылителей, часть межвидовых гибридов (*ms/ms*) со стерильной цитоплазмой 'Tuberosum'-типа может быть фертильна (Hermundstad, Peloquin 1985; Jansky, Peloquin, 2006).

В то же время доминантный аллель гена *Ms* не выявлен у других изученных южноамериканских диких диплоидных видов, например *S. berthaultii*, *S. chacoense*, *S. kurtzianum*, *S. spegazzinii*, *S. tariense*, *S. vernei* (Grun et al., 1962, 1977; Hermundstad, Peloquin, 1985; Tucci et al., 1996), и у мексиканского вида *S. demissum* (Ortiz et al., 2009).

Источники восстановления фертильности пыльцы у генотипов с 'Tuberosum'-типом цитоплазмы выделены среди нескольких селекционных клонов *S. tuberosum* неизвестного происхождения (Iwanaga et al., 1991; Ortiz et al., 1993; Mihovilovich et al., 2015), а также среди образцов родственных диких видов – *S. sanctae-rosae* (Tucci et al., 1996) и *S. chacoense* (Grun, Aubertin, 1965; Tucci et al., 1996). Исследователи из Университета штата Висконсин, США (Iwanaga et al., 1991; Ortiz et al., 1993), провели масштабное изучение наследования признака восстановления фертильности пыльцы в гибридном потомстве более сотни комбинаций скрещиваний ($4x \times 4x$) и ($4x \times 2x$) с участием сортов, селекционных клонов и дигамплоидов *S. tuberosum*, а также образцов диплоидных культурных и диких видов. В этих работах с использованием гибридологического анализа был идентифицирован ядерный ген *Rt* (male fertility Restorer gene), доминантный аллель которого восстанавливает фертильность пыльцы у генотипов со стерильной

¹ Здесь и далее латинские названия видов (подвидов) картофеля приведены в соответствии с таксономической системой Дж. Хокса (Hawkes, 1990).

цитоплазмой 'Tuberosum'-типа даже при наличии у них доминантного аллеля гена *Ms* (Iwanaga et al., 1991; Ortiz et al., 1993). По оценке (Iwanaga et al., 1991), частота встречаемости в селекционном генофонде доминантного аллеля гена *Rt* достигает 0.2. При использовании таких генотипов в скрещиваниях частота появления фертильных форм в гибридном потомстве варьирует в широких пределах в зависимости от состояния гетерозиготности локуса *Rt* [нуллиплекс (*rtrtrtrt*), симплекс (*Rtrtrtrt*), дуплекс (*RtRtrtrt*), триплекс (*RtRtRtrt*)] (Iwanaga et al., 1991).

Новый этап в изучении ЦМС картофеля связан с результатами молекулярно-генетических исследований полиморфизма хл- и мтДНК, послуживших основой для создания сначала RFLP (Lössl et al., 1999; Sukhotu et al., 2004), а затем ПЦР-маркеров, с использованием которых идентифицируют пять основных типов пластома: А, М (=С), Р (=S), Т, W (Hosaka, Sanetomo, 2012), три основных (альфа, бета, гамма) и два минорных типа мт-геномов (Lössl et al., 2000) у культурных и родственных диких видов. Ни для одного из изученных видов картофеля не установлен специфичный тип пластинного или митохондриального геномов, однако выявлены их устойчивые сочетания. На основе этих данных разработана современная классификация, включающая семь основных типов цитоплазм картофеля: А, М, Р, Т/бета, W/бета, W/гамма, W/альфа (=D), из которых три типа (Т/бета, W/гамма и D) ассоциированы с проявлением признака мужской стерильности в определенных гибридных комбинациях, причем каждый из этих типов отличается по фенотипическому проявлению данного признака (Hosaka, Sanetomo, 2012).

С использованием ДНК-маркеров были протестированы большие выборки коллекционных образцов и выявлено широкое распространение различных типов фертильных и ЦМС-индуцирующих цитоплазм у отдельных культурных и диких видов картофеля. Остановимся на этих данных подробнее.

1. Т/бета- (или Т-, или чилийский, или 'Tuberosum') тип цитоплазмы, ассоциированный с нарушениями развития генеративных органов гибридов и стерильностью их пыльцы, был идентифицирован примерно у 90 % чилийских аборигенных сортов (Hosaka, 2002; Hosaka, Sanetomo, 2009; Gavrilenko et al., 2013) и у старых европейских и североамериканских сортов, созданных в XIX – начале XX в. на основе клоновых отборов из потомства редких интродукций местных южноамериканских сортов и их гибридов (Powell et al., 1993; Provan et al., 1999; Гавриленко и др., 2007; Hosaka, Sanetomo, 2012; Sanetomo, Gebhardt, 2015). Широкое распространение Т/бета-типа цитоплазмы среди старых селекционных сортов картофеля связано с его положительным влиянием на урожайность растений (Plaisted, 1972; Sanford, Hanneman, 1982; Maris, 1989), с одной стороны, и с индукцией мужской стерильности (Grun, 1973, 1979; Grun et al., 1977) – с другой. Поэтому растения с Т/бета-цитоплазмой традиционно использовались в селекционном процессе только в качестве материнских форм.
2. W/гамма-тип цитоплазмы был интрогрессирован в селекционные сорта от образцов дикого аллотетраплоидного мексиканского вида *S. stoloniferum* (Ross, 1986;

Lössl et al., 2000). У сортов и межвидовых гибридов с W/гамма-типом цитоплазмы стерильные пыльцевые зерна часто соединены в тетрады (тетрадная стерильность) (Abdalla, Hermesen, 1971; Ortiz et al., 1993; Song, Schwarzfischer, 2008; Hosaka, Sanetomo, 2012). С использованием метода цибридизации (асимметричной соматической гибридизации) осуществлен перенос органелл *S. stoloniferum* в протопласты фертильных сортов картофеля. Среди полученных цибридов выявлены растения с тетрадной стерильностью (Perl et al., 1990); по мнению авторов, данный подход перспективен для получения ЦМС-аналогов картофеля, которые могут быть востребованы для производства гибридных TPS-семян.

3. D-тип цитоплазмы детектируется по наличию рекомбинантного фрагмента 'Band1', образованного в результате состыковок кодирующих областей мт-генов *rps19* и *atp6* и участка гомологичного 'Region 2' мт-ДНК (Sanetomo, Hosaka, 2011, 2013). Фрагмент 'Band1' выявлен только у носителей D-типа цитоплазмы. Источником D-типа цитоплазмы селекционных сортов являются образцы дикого мексиканского гексаплоидного вида *S. demissum*. Гибридизация этого дикого вида с возделываемым картофелем в большинстве случаев возможна в направлении *S. demissum* × *S. tuberosum*. Образующиеся гибриды формируют нежизнеспособные пыльцевые зерна нормальной морфологии и при дальнейшем беккроссировании с *S. tuberosum* используются только в качестве материнских форм (Dionne, 1961; Irikura, 1968). Согласно (Hosaka, Sanetomo, 2012; Sanetomo, Gebhardt, 2015), для сортов с D-типом цитоплазмы характерна функциональная стерильность пыльцы. В то же время в работе (Song, Schwarzfischer, 2008) сообщалось о функциональной фертильности пыльцы у ряда сортов, для которых позднее был идентифицирован D-тип цитоплазмы (Sanetomo, Gebhardt, 2015).

Начиная со второй половины XX в. межвидовая гибридизация стала основным методом расширения генетического разнообразия возделываемого картофеля, поэтому современный генофонд селекционных сортов представлен преимущественно сложными межвидовыми гибридами. Большинство зарубежных сортов, созданных во второй половине XX – начале XXI в., обладают W/гамма- и D-типами стерильных цитоплазм, полученными ими от образцов диких мексиканских полиплоидных видов картофеля *S. stoloniferum* и *S. demissum* соответственно (Sanetomo, Hosaka, 2011; Sanetomo, Gebhardt, 2015), которые наиболее часто вовлекались в селекцию в качестве источников устойчивости к Y вирусу картофеля и к фитофторозу (Ross, 1986).

Результаты масштабного молекулярного скрининга около 1200 европейских сортов и селекционных клонов картофеля показали, что более 90 % из них имеют цитоплазмы D-, W/гамма- и Т/бета-типов; генотипы с фертильным Р-типом цитоплазмы не обнаружены (Sanetomo, Gebhardt, 2015). В то же время фертильный Р-тип цитоплазмы встречается примерно у 6 % японских сортов и селекционных клонов (Hosaka, Sanetomo, 2012). Отметим, что Р-тип цитоплазмы характерен для представителей диплоидных культурных видов картофеля – *S. phureja* и *S. stenotomum*

(Sukhotu et al., 2006; Gavrilenko et al., 2013). Поскольку образцы *S. phureja* часто вовлекались в селекционный процесс и скрещивания с их участием характеризуются высокой результативностью (Mogi et al., 2012), можно полагать, что генотипы с фертильным Р-типом цитоплазмы использовались в европейских селекционных программах только в качестве опылителей. А-, М- и W/бета-типы цитоплазм редко встречаются у зарубежных селекционных сортов (Hosaka, Sanetomo, 2012; Sanetomo, Gebhardt, 2015). Некоторые исследователи полагают, что А-тип цитоплазмы также можно отнести к фертильному (Mihovilovich et al., 2015), поскольку он характерен для *S. tuberosum* ssp. *andigenum*, который часто использовался в селекции. Редкая встречаемость А-типа у селекционных сортов указывает на то, что родительские генотипы с А-типом цитоплазмы использовались в скрещиваниях в качестве опылителей.

Полученные результаты указывают на необходимость расширения генетического разнообразия селекционных сортов картофеля по генетическим факторам цитоплазмы. С использованием методов соматической гибридизации продемонстрирована возможность создания аллоплазматических форм картофеля на основе переноса в сорта органелл разных видов картофеля и неклбубеносных видов рода *Solanum* (Perl et al., 1990; Cardi et al., 1999; Gavrilenko et al., 2005).

Можно заключить, что по сравнению с другими культурными видами, для которых разработаны методы гибридной селекции, информация о системах ЦМС-*Rf* картофеля ограничена. Это связано с тем, что признак мужской стерильности, хотя и проявляется у большинства селекционных сортов, размножаемых вегетативно, никогда не был приоритетным в селекции картофеля. В то же время практическое применение имеющейся информации о типах стерильных–фертильных цитоплазм может уже сейчас кардинально повысить эффективность исследований по подбору родительских пар для проведения скрещиваний, в том числе с целью пирамидирования генов, детерминирующих хозяйственно ценные признаки.

Со сменой парадигм в современной селекции картофеля, направленных на создание гетерозисных гибридов, полученных от скрещиваний инбредных диплоидных линий (Lindhout et al., 2011; Jansky et al., 2016), можно ожидать возрастания интереса к поиску генов восстановления фертильности пыльцы у картофеля и к изучению механизмов ядерно-плазматических взаимодействий.

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

Abdalla M.M.F., Hermesen J.G.T. The plasmon-genic basis of pollen lobedness and tetrad sterility in *Solanum verrucosum* hybrids and duplicate linkage groups. *Genetica*. 1971;42:261-270.
Abdelnoor R.V., Yule R., Elo A., Christensen A.C., Meyer-Gauen G., Mackenzie S.A. Substoichiometric shifting in the plant mitochondrial genome is influenced by a gene homologous to MutS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003;100(10):5968-5973.

Ahmad R., Farhatullah Khan R.S., Quiros C.F. Inheritance of fertility restorer gene for cytoplasmic male-sterility in *B. napus* and identification of closely linked molecular markers to it. *Euphytica*. 2013; 194(3):351-360. DOI 10.1007/s10681-013-0942-y.
Anisimova I.N., Alpat'eva N.V., Karabicina Ju.I., Kuznecova E.B., Rozhkova V.T., Gavrilova V.A. Identification of genes of sunflower agronomic traits based on molecular screening. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC*. 2015;29(7):39-42.
Anisimova I.N., Alpatieva N.V., Rozhkova V.T., Kuznetsova E.B., Pinaev A.G., Gavrilova V.A. Polymorphism among RFL-PPR homologs in sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines with varying ability for the suppression of the cytoplasmic male sterility phenotype. *Rus. J. Genet*. 2014;50(7):712-721. DOI 10.1134/S1022795414070023.
Anisimova I.N., Gavrilova V.A. Structural and functional diversity of genes suppressing phenotype of cytoplasmic male sterility in plants. *Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2012;170:3-16.
Bentolila S., Alfonso A.A., Hanson M.R. A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002;16:10887-10892. DOI 10.1073/pnas.102301599.
Bisht D.S., Chamola R., Nath M., Shripad R., Bhat S. Molecular mapping of fertility restorer gene of an alloplasmic CMS system in *Brassica juncea* containing *Moricandia arvensis* cytoplasm. *Mol. Breeding*. 2015;35:14. DOI 10.1007/s11032-015-0225-5.
Bragin A.G., Ivanov M.K., Fedoseeva L.A., Dymshic G.M. Analysis of mitochondrial DNA heteroplasmy in fertile and owen CMS sugar beet (*Beta vulgaris*) plants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekt-sii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2011;15(3):524-530.
Brown G.G., Formanova N., Jin H., Wargachuk R., Dendy C., Patil P., Laforest M., Zhang J., Cheung W.Y., Landry B.S. The radish *Rfo* restorer gene of Ogura cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. *Plant J*. 2003;35(2):262-272. DOI 10.1046/j.1365-3113X.2003.01799.
Camadro E.L., Carputo D., Peloquin S.J. Substitutes for genome differentiation in tuber-bearing *Solanum*: interspecific pollen-pistil incompatibility, nuclear-cytoplasmic male sterility, and endosperm. *Theor. Appl. Genet*. 2004;109:1369-1376. DOI 10.1007/s00122-004-1753-2.
Cardi T., Bastia T., Monti L., Earle E.D. Organelle DNA and male fertility variation in *Solanum* spp. and interspecific somatic hybrids. *Theor. Appl. Genet*. 1999;99:819-828.
Carroll C.P. The inheritance and expression of sterility in hybrids of dihaploid and cultivated diploid potatoes. *Genetica*. 1975;45(2):149-162.
Chase C.D. Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions. *Trends in Genetics*. 2006;23(3): 81-90. DOI 10.1016/j.tig.2006.12.004.
Chase S.S. Analytic breeding in *Solanum tuberosum* L. – a scheme utilizing partenotes and other diploid stocks. *Can. J. Genet. Cytol*. 1963;5:359-363.
Chen L., Liu Y.G. Male sterility and fertility restoration in crops. *Annu. Rev. Plant Biol*. 2014;65:579-606. DOI 10.1146/annurev-arplant-050213-040119.
Cui X., Wise R.P., Schnable P.S. The *Rf2* nuclear restorer gene of male-sterile T-cytoplasm maize. *Science*. 1996;272(266):1334-1336. DOI 10.1126/science.272.5266.1334.
Dahan J., Mireau H. The *Rf* and *Rf*-like PPR in higher plants, a fast-evolving subclass of PPR genes. *RNA Biol*. 2013;10(9):1469-1476. DOI 10.4161/rna.25568.
Danilenko N.G., Davydenko O.G. Miry genomov organell [The worlds of organelle genomes]. Minsk, Tekhnologiya Publ., 2003.
de la Canal L., Crouzillat D., Quetier F., Ledoigt G. A transcriptional alteration on the *atp9* gene is associated with a sunflower male-sterile cytoplasm. *Theor. Appl. Genet*. 2001;102(8):1185-1189. DOI 10.1007/s001220100558.
Desloire S., Gherbi H., Laloui W., Marhadour S., Clouet V., Catto-lico L., Falentin L., Giancola S., Renard M., Budar F., Small I.,

- Caboche M., Delourme R.M., Bendahmane A. Identification of the fertility restoration locus, *Rfo*, in radish, as a member of the pentatricopeptide-repeat protein family. *EMBO Rep.* 2003;4(6):588-594. DOI 10.1038/sj.embor.embor848.
- Dionne L.A. Sterility in *Solanum demissum*. *Am. Potato J.* 1961;38:117-120. DOI 10.1007/s11540-011-9196-z.
- Dong D.K., Li Z., Yuan F.J., Zhu S.L., Chen P., Yu W., Yang Q.H., Fu X.J., Yu X.M., Li B.Q., Zhu D.H. Inheritance and fine mapping of a restorer-of-fertility (*Rf*) gene for the cytoplasmic male sterility in soybean. *Plant Sci.* 2012;188-189:36-40. DOI 10.1016/j.plantsci.2012.02.007.
- Du K., Liu Q., Wu X., Jiang J., Wu J., Fang Y., Li A., Wang Y. Morphological structure and transcriptome comparison of the cytoplasmic male sterility line in *Brassica napus* (SaNa-1A) derived from somatic hybridization and its maintainer line SaNa-1B. *Front. Plant Sci.* 2016;7:1313. DOI 10.3389/fpls.2016.01313.
- Dymshits G.M. Surprises of mitochondrial genome. *Priroda = Nature (Moscow)*. 2002;6:5461.
- Endelman J.B., Jansky S.H. Genetic mapping with an inbred line-derived F2 population in potato. *Theor. Appl. Genet.* 2016;129(5):935-943. DOI 10.1007/s00122-016-2673-7.
- Fujii S., Bond Ch.S., Small I.D. Selection patterns on restorer-like genes reveals a conflict between nuclear and mitochondrial genomes throughout angiosperm evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011;108(4):1723-1728. DOI 10.1073/pnas.1007667108.
- Fujii S., Toriyama K. Suppressed expression of retrograde-regulated male sterility restores pollen fertility in cytoplasmic male sterile rice plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009;106(23):9513-9518. DOI 10.1073/pnas.0901860106.
- Gabay-Laughnan S., Chase C.D., Ortega V.M., Zhao L.M. Molecular-genetic characterization of CMS-S restorer-of fertility alleles identified in Mexican maize and teosinte. *Genetics.* 2004;166(2):959-970.
- Gavrilenko T.A., Antonova O.Ju., Kostina L.I. Study of genetic diversity in potato cultivars using PCR analysis of organelle DNA. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 2007;43(11):1301-1305.
- 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(7):1997-2015. DOI 10.1007/s10722-013-9968-1.
- Gavrilenko T., Antonova O., Thieme R., Szczerbakowa A., Wielgat B. Inheritance of chloroplast and mitochondrial DNAs in interspecific somatic hybrids of potato. *Eur. Assoc. of Potato Res. Bilbao*, 2005; 652-654.
- Gebhardt C., Bellin D., Henselewski H., Lehmann W., Schwarzfischer J., Valkonen J.P.T. Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. *Theor. Appl. Genet.* 2006;112:1458-1464. DOI 10.1007/s00122-006-0248-8.
- Gillman J.-D., Bentolila S., Hanson M.-R. The petunia restorer of fertility proteins are part of a large mitochondrial complex that interacts with transcripts of the CMS-associated loci. *Plant J.* 2007;49(2):217-227. DOI 10.1111/j.1365-313X.2006.02953.x.
- Grun P. Changes of cytoplasmic factors during the evolution of the cultivated potato. *Evolution.* 1970a;24:188-198.
- Grun P. Cytoplasmic sterilities that separate the cultivated potato from its putative diploid ancestors. *Evolution.* 1970b;24:750-758.
- Grun P. Cytoplasmic sterilities that separate the Group Tuberosum cultivated potato from its putative tetraploid ancestor. *Evolution.* 1973; 27:633-643.
- Grun P. Evolution of cultivated potato: a cytoplasmic analysis. *The Biology and Taxonomy of the Solanaceae*. Eds. J.G. Hawkes, R.N. Lester, A.D. Skelding. Linn. Soc. Ser. 1979;7:655-665.
- Grun P., Aubertin M. Evolutionary pathways of cytoplasmic male sterility in *Solanum*. *Genetics.* 1965;51:399-409.
- Grun P., Aubertin M., Radlow A. Multiple differentiation of plasmons of diploid species of *Solanum*. *Genetics.* 1962;47(10):1321-1333.
- Grun P., Ochoa C., Capage D. Evolution of cytoplasmic factors in tetraploid cultivated potatoes. *Am. J. Botany.* 1977;64:412-420.
- Gulyas G., Shin Y., Kim H., Lee J.-S., Hirata Y. Altered transcript reveals an *Orf507* sterility-related gene in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Mol. Biol. Rep.* 2010;28:605-612. DOI 10.1007/s11105-010-0182-4.
- Hanneman R.E., Peloquin S.J. Genetic-cytoplasmic male sterility in progeny of 4x-2x crosses in cultivated potatoes. *Theor. Appl. Genet.* 1981;59(1):53-56.
- Hanson M.R., Bentolila S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant Cell.* 2004;16(1):154-169. DOI 10.1105/tpc.015966.
- Hawkes J.G. The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources. London: Belhaven Press, 1990.
- Hermundstad S.A., Peloquin S.J. Male fertility and 2n pollen production in haploid-wild species hybrids. *Am. Potato J.* 1985;62:479-487.
- Hilali A., Lauer F.I., Veilleux R.E. Reciprocal differences between hybrids of *Solanum tuberosum* groups tuberosum (haploid) and Phureja. *Euphytica.* 1987;36:631-639.
- Hoopes R.W., Plaisted R.L., Cubillos A.G. Yield and fertility of reciprocal-cross *tuberosum-andigena* hybrids. *Am. Potato J.* 1980;57: 275-284. DOI 10.1007/BF02855305.
- Horn R. Recombination: Cytoplasmic male sterility and fertility restoration in higher plants. *Progress Botany.* 2006;67:31-52. DOI 10.1007/3-540-27998-9_2.
- Horn R., Hamrit S. Gene cloning and characterization. *Genetics, Genomics and Breeding of Sunflower*. Eds. J. Hu, G. Seiler, C. Kole. USA: Sci. Publ., 2010;173-219.
- Hosaka K. Distribution of the 241 bp deletion of chloroplast DNA in wild potato species. *Am. J. Potato Res.* 2002;79:119-123. DOI 10.1007/BF02881520.
- Hosaka K., Hanneman R.E. Genetics of self-compatibility in a self-incompatible wild diploid potato species *Solanum chacoense*. 2. Localization of an S locus inhibitor (*Sl*i**) gene on the potato genome using DNA markers. *Euphytica.* 1998;103:265-271.
- Hosaka K., Sanetomo R. Comparative differentiation in mitochondrial and chloroplast DNA among cultivated potatoes and closely related wild species. *Genes Genet. Syst.* 2009;84(5):371-378. DOI 10.1266/ggs.84.371.
- Hosaka K., Sanetomo R. Development of a rapid identification method for potato cytoplasm and its use for evaluating Japanese collections. *Theor. Appl. Genet.* 2012;125:1237-1251. DOI 10.1007/s00122-012-1909-4.
- Hougas R.W., Peloquin S.J. A haploid plant of the potato variety Katahdin. *Nature.* 1957;180:1209-1210.
- Hougas R.W., Peloquin S.J. The potential of potato haploids in breeding and genetic research. *Am. Potato J.* 1958;35:701-707.
- Hu J., Wang K., Huang W., Liu G., Gao Y., Wang J., Huang Q., Ji Y., Qin X., Wan L., Zhu R., Li S., Yang D., Zhua Y. The rice pentatricopeptide repeat protein RF5 restores fertility in Hong-Lian cytoplasmic male-sterile lines via a complex with the glycine-rich protein GRP162. *Plant Cell.* 2012;24:109-122. DOI 10.1105/tpc.111. 093211.
- Huang S., Shingaki-Wells R.N., Taylor N.L., Millar A.H. The rice mitochondria proteome and its response during development and to the environment. *Front. Plant Sci.* 2013;4:16. DOI 10.3389/fpls.2013. 00016.
- Huang W., Yu C., Hu J., Wang L., Dan Z., Zhou W., He C., Zeng Y., Yao G., Qi J., Zhang Z., Zhu R., Chen X., Zhu Y. Pentatricopeptide-repeat family protein RF6 functions with hexokinase 6 to rescue rice cytoplasmic male sterility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015;112: 14984-14989. DOI 10.1073/pnas.1511748112.
- Irikura Y. Studies on interspecific crosses of tuber-bearing Solanums. I. Overcoming and cross-incompatibility between *Solanum tuberosum* and other *Solanum* species by means of induced polyploids and haploids. *Res. Bull. Hokkaido Nat. Agr. Exp. Stat.* 1968;92: 23-27.
- Itabashi E., Iwata N., Fujii S., Kazama T., Toriyama K. The fertility restorer gene, *Rf2*, for lead rice-type cytoplasmic male sterility of rice encodes a mitochondrial glycine-rich protein. *Plant J.* 2011; 659(3):359-367. DOI 10.1111/j.1365-313X.2010.04427.x.
- Ivanov M.K., Dymshits G.M. Cytoplasmic male sterility and restora-

- tion of pollen fertility in higher plants. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 2007;43(4):354-368.
- Iwanaga M., Ortiz R., Cipar M.S., Peloquin S.J. A restorer gene for genetic-cytoplasmic male sterility in cultivated potatoes. *Am. Potato J.* 1991;68:19-28.
- Jansky S.H., Charkowski A.O., Douches D.S., Gusmini G., Richael C., Bethke P.C., Spooner D.M., Novy R.G., De Jong H., De Jong W.S., Bamberg J., Thompson A., Bizimungu B., Holm D., Brown C., Haynes K., Sathuvalli V. Reinventing potato as a diploid inbred line. *Crop Science*. 2016;56:1412-1422. DOI 10.2135/cropsci2015.12.0740.
- Jansky S.H., Chung Y.S., Kittipadukul P. M6: A diploid potato inbred line for use in breeding and genetics research. *J. Plant Reg.* 2014;8:195-199. DOI 10.3198/jpr2013.05.0024crg.
- Jansky S.H., Hamernik A.J. The introgression of 2x 1EBN *Solanum* species into the cultivated potato using *Solanum verrucosum* as a bridge. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2009;56:1107-1115. DOI 10.1007/s10722-009-9433-3.
- Jansky S.H., Peloquin S.J. Advantages of wild diploid *Solanum* species over cultivated diploid relatives in potato breeding programs. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2006;53:669-674. DOI 10.1007/s10722-004-2949-7.
- Jo Y.D., Ha Y., Lee J., Park M., Bergsma A.C., Choi H.-Il, Goritschnig S., Kloosterman B., van Dijk P.J., Choi D., Kang B.-C. Fine mapping of *Restorer-of-fertility* in pepper (*Capsicum annuum* L.) identified a candidate gene encoding a pentatricopeptide repeat (PPR)-containing protein. *Theor. Appl. Genet.* 2016;129:2003. DOI 10.1007/s00122-016-2755-6.
- Jo Y.D., Kim Y.-M., Park M.-N., Yoo J.-H., Park M.K., Kim B.-D., Kang B.-C. Development and evaluation of broadly applicable markers for *Restorer-of-fertility* in pepper. *Mol. Breeding*. 2009;25(2): 187-201. DOI 10.1007/s11032-009-9318-3.
- Jordan D.R., Klein R.R., Sakreuski K.G., Henzell R.G., Klein P.E., Mace E.S. Mapping and characterization of *Rf3*: a new gene conditioning pollen fertility restoration in *A1* and *A2* cytoplasm in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Theor. Appl. Genet.* 2011; 123(3):383-396. DOI 10.1007/s00122-011-1591-y.
- Jordan D.R., Mace E.S., Henzell R.G., Klein P.E., Klein R.R. Molecular mapping and candidate gene identification of the *Rf2* gene for pollen fertility restoration in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Theor. Appl. Genet.* 2010;120(7):1279-1287. DOI 10.1007/s00122-009-1255-3.
- Joseph B., Corwin J.A., Li B., Atwell S., Kliebenstein D.J. Cytoplasmic genetic variation and extensive cytonuclear interactions influence natural variation in the metabolome. *eLife*. 2013;2:e00776. DOI 10.7554/eLife.00776.
- Kazama T., Toriyama K. A pentatricopeptide repeat-containing gene that promotes the processing of aberrant *atp6* RNA of cytoplasmic male-sterile rice. *FEBS Lett.* 2003;544(1-3):99-102. DOI 10.1016/S0014-5793(03)00480-0.
- Khan M.R., Isshiki S. Development of a cytoplasmic male-sterile line of eggplant (*Solanum melongena* L.) with the cytoplasm of *Solanum anguivi*. *Plant Breeding*. 2011;130(2):256-260. DOI 10.1111/j.1439-0523.2010.01788.x.
- Khan M.R., Isshiki S. Cytoplasmic male sterility in eggplant. *Horticulture J.* 2016;85(1):1-7. DOI doi: 10.2503/hortj.MI-IR03.
- Kiani G. Validation of SSR markers linked to restoring fertility (*Rf*) genes and genotyping of rice lines at *Rf* loci. *J. Agr. Sci. Tech.* 2015; 17:1931-1938.
- Kim D.H., Kim B.-D. The organization of mitochondrial *atp6* gene region in male fertile and CMS lines of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Curr. Genetics*. 2006;49(1):59-67. DOI 10.1007/s00294-005-0032-3.
- Kim K., Lee Y.-P., Lim H., Han T., Sung S.-K., Kim S. Identification of *Rfd1*, a novel restorer-of-fertility locus for cytoplasmic male-sterility caused by DCGMS cytoplasm and development of simple PCR markers linked to the *Rfd1* locus in radish (*Raphanus sativus* L.). *Euphytica*. 2010;175(1):79-90. DOI 10.1007/s10681-010-0190-3.
- Kim Y.M., Jo Y.D., Kang B.J. Haplotype analysis of CMS-associated DNA markers in sweet peppers. *Crop Sci. Biotechnol.* 2009;12:129-132. DOI 10.1007/s12892-009-0114-8.
- Kitazaki K., Arakawa T., Matsunaga M., Yui-Kurino R., Matsuhira H., Mikami T., Kubo T. Post-translational mechanisms are associated with fertility restoration of cytoplasmic male sterility in sugar beet (*Betavulgaris*). *Plant J.* 2015;83(2):290-299. DOI 10.1111/tpj.12888.
- Klein R.R., Klein P.E., Chhabra A.K., Dong J., Pammi S., Childs K.L., Mullet J.E., Rooney W.L., Schertz K.F. Molecular mapping of the *rfl* gene for pollen fertility restoration in sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2001;102(8):1206-1212. DOI 10.1007/s001220100575.
- Klein R.R., Klein P.E., Mullet J.E., Minx P., Rooney W.L., Schertz K.F. Fertility restorer locus *Rfl* of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) encodes a pentatricopeptide repeat protein not present in the collinear region of rice chromosome 12. *Theor. Appl. Genet.* 2005;111(6):994-1012. DOI 10.1007/s00122-005-2011-y.
- Koizuka N., Imai R., Fujimoto H., Hayakawa T., Kimura Y., Kohno-Murase J., Sakai S., Imamura J. Genetic characterization of a pentatricopeptide repeat protein gene, *orf687*, that restores fertility in the cytoplasmic male-sterile Kosen radish. *Plant J.* 2003;34(4):407-415. DOI 10.1046/j.1365313X.2003.01735.x.
- Li J., Ding X., Han S., He T., Zhang H., Yang L., Yang S., Gai J. Differential proteomics analysis to identify proteins and pathways associated with male sterility of soybean using iTRAQ-based strategy. *J. Proteomics*. 2016;138:2-82. DOI 10.1016/j.jpro.2016.02.017.
- Li J., Han S., Ding X., He T., Dai J., Yang S., Gai J. Comparative transcriptome analysis between the cytoplasmic male sterile line NJCMS1A and its maintainer NJCMS1B in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *PLoS ONE*. 2015;10(5):e0126771. DOI 10.1371/journal.pone.0126771.
- Lindhout P., Meijer D., Schotte T., Hutten R.C.B., Visser R.G.F., Eck H.J. Towards F1 hybrid seed potato breeding. *Potato Res.* 2011; 54:301-312. DOI 10.1007/s11540-011-9196-z.
- Liu C., Liu Z., Li C., Zhang Y., Feng H. Comparative transcriptome analysis of fertile and sterile buds from a genetically male sterile line of Chinese cabbage. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 2016;52(2):130-139. DOI 10.1007/s11627-016-9754-9.
- Liu C., Ma N., Wang P.-Y., Fu N., Shen H.-L. Transcriptome sequencing and *de novo* analysis of a cytoplasmic male sterile line and its near-isogenic restorer line in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *PLoS ONE*. 2013;8(6):e65209. DOI 10.1371/journal.pone.0065209.
- Liu G., Tian H., Huang Y.-Q., Hu J., Ji Y.-X., Li S.-Q., Feng Y.-Q., Guo L., Zhu Y.-G. Alterations of mitochondrial protein assembly and jasmonic acid biosynthesis pathway in Honglian (HL)-type cytoplasmic male sterility rice. *J. Biol. Chem.* 2012;287(47):40051-40060. DOI 10.1074/jbc.M112.382549.
- Liu Z., Wang D., Feng J., Seiler G.J., Cai X., Jan C.-C. Diversifying sunflower germplasm by integration and mapping of a novel male fertility restoration gene. *Genetics*. 2013;193(3):727-737. DOI 10.1534/genetics.112.146092.
- Lössl A., Adler N., Horn R., Frei U., Wenzel G. Chondriome-type characterization of potato: mt a, β , γ , ϵ and novel plastid-mitochondrial configurations in somatic hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 1999;98:1-10. DOI 10.1007/s001220051202.
- 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.
- Lurin C., Andrés C., Aubourg S., Bellaoui M., Bitton F., Bruyère C., Caboche M., Debast C., Gualberto J., Hoffmann B., Lecharny A., Le Ret M., Martin-Magniette M.-L., Mireau H., Peeters N., Renou J.-P., Szurek B., Taconnat L., Small I. Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell*. 2004;16:2089-2103. DOI 10.1105/tpc.104.022236.
- Mackenzie S.A. The influence of mitochondrial genetics in crop breeding strategies. *Plant Breed. Rev.* 2004;25:115-138. DOI 10.1073/pnas.0609344104.

- Maris B. Analysis of an incomplete diallel cross among three ssp. *tuberosum* varieties and seven long-day adapted ssp. *andigena* clones of the potato (*Solanum tuberosum* L.). Euphytica. 1989;41:163-182.
- Mei S., Liu T., Wang Z. Comparative transcriptome profile of the cytoplasmic male sterile and fertile floral buds of radish (*Raphanus sativus* L.). Int. J. Mol. Sci. 2016;6(17):E42. DOI 10.3390/ijms17010042.
- Meyer J., Pei D., Wise R.P. *Rf8*-Mediated *T-urf13* transcript accumulation coincides with a pentatricopeptide repeat cluster on maize chromosome 2L. Plant Genome. 2011;4(3):283-299.
- Mihovilovich E., Sanetomo R., Hosaka K., Ordoñez B., Aponte M., Bonierbale M. Cytoplasmic diversity in potato breeding: case study from the International Potato Center. Mol. Breeding. 2015;35:137-146. DOI 10.1007/s11032-015-0326-1.
- Mori K., Asano K., Tamiya S., Nakao T., Mori M. Challenges of breeding potato cultivars to grow in various environments and to meet different demands. Breed. Science. 2015;65:3-16. DOI 10.1270/jsbbs.65.3.
- 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.
- Ortiz R., Iwanaga M., Peloquin S.J. Male sterility and $2n$ pollen in $4x$ progenies derived from $4x \times 2x$ and $4x \times 4x$ crosses in potatoes. Potato Res. 1993;36:227-236.
- Ortiz R., Simon P., Jansky S., Stelly D. Ploidy manipulation of the gametophyte, endosperm and sporophyte in nature and for crop improvement: a tribute to Professor Stanley J. Peloquin (1921–2008). Ann. Bot. 2009;104(5):795-807. DOI 10.1093/aob/mcp207.
- Peloquin S.J., Jansky S.H., Yerik G.L. Potato cytogenetics and germplasm utilization. Am. Potato J. 1989a;66:629-638.
- Peloquin S.J., Yerik G.L., Werner J.E., Darmo E. Potato breeding with haploids and $2n$ gametes. Genome. 1989b;31:1000-1004.
- Perl A., Aviv D., Galun E. Protoplast-fusion-derived CMS potato cybrids: Potential seed-parents for hybrid, true-potato-seeds. J. Heredity. 1990;81(6):438-442.
- Phumichai C., Mori M., Kobayashi A., Kamijima O., Hosaka K. Toward the development of highly homozygous diploid potato lines using the self-compatibility controlling *Sli* gene. Genome. 2005;48:977-984. DOI 10.1139/g05-066.
- Plaisted R.L. Utilization of germplasm in breeding programs – use of cultivated tetraploids. Prospect for the Potato in the Developing Worlds. Lima, Peru: Intern. Potato Centre, 1972;23.
- Powell W., Baird E., Duncan N., Waugh R. Chloroplast DNA variability in old and recently introduced potato cultivars. Ann. Appl. Biol. 1993;123:403-410.
- Provan J., Powell W., Dewar H., Bryan G., Machray G.C., Waugh R. An extreme cytoplasmic bottleneck in the modern European cultivated potato (*Solanum tuberosum*) is not reflected in decreased levels of nuclear diversity. Proc. R. Soc. Lond. 1999;266:633-639.
- Qin X., Warguchuk R., Arnal N., Gaborieau L., Mireau H., Brown G.G. *In vivo* functional analysis of a nuclear restorer PPR protein. BMC Plant Biology. 2014;14:313. DOI 10.1186/s12870-014-0313-4.
- Rhee S.-J., Seo M., Jang Y.J., Cho S., Lee G.P. Transcriptome profiling of differentially expressed genes in floral buds and flowers of male sterile and fertile lines in watermelon. BMC Genomics. 2015;16:914. DOI 10.1186/s12864-015-2186-9.
- Ross H. Potato Breeding – Problems and Perspectives. Berlin; Hamburg: Paul Parey, 1986.
- Ross R.W., Peloquin S.J., Hougas R.W. Fertility of hybrids from *Solanum phureja* and haploid *S. tuberosum* matings. Eur. Potato J. 1964;7:81-89.
- Saito T., Matsunaga H., Saito A., Hamato N., Koga T., Suzuki T., Yoshida T. A novel source of cytoplasmic male sterility and a fertility restoration gene in eggplant (*Solanum melongena* L.) lines. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 2009;78(4):425-430.
- Sanetomo R., Gebhardt C. Cytoplasmic genome types of European potatoes and their effects on complex agronomic traits. BMC Plant Biology. 2015;15:162. DOI 10.1186/s12870-015-0545-y.
- Sanetomo R., Hosaka K. A maternally inherited DNA marker, descended from *Solanum demissum* ($2n = 6x = 72$) to *S. tuberosum* ($2n = 4x = 48$). Breed. Sci. 2011;61:426-434. DOI 10.1270/jsbbs.61.426.
- 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.
- Sanford J.C., Hanneman R.E., Jr. Large yield differences between reciprocal families of *Solanum tuberosum*. Euphytica. 1982;31:1-12.
- Santini M., Camadro E.L., Marcellan O.N., Erazzu L.E. Agronomic characterization of diploid hybrid families derived from crosses between haploids of the common potato and three wild Argentinian tuber-bearing species. Am. J. Potato Res. 2000;77:211-218. DOI 10.1007/BF02855788.
- Satoh M., Kubo T., Nishizawa S., Estiati A., Itchoda N., Mikami T. The cytoplasmic male-sterile type and normal type mitochondrial genomes of sugar beet share the same complement of genes of known function but differ in the content of expressed ORFs. Mol. Gen. Genomics. 2004;272:247-256. DOI 10.1007/s00438-004-1058-9.
- Schnable P.S., Wise R.P. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. Trends Plant Sci. 1998;3:175-180.
- Shabani A., Tahmasebi Enferadi S., Zaeifzadeh M. Proteom-comparison of sunflower cytoplasmic male sterile and fertile restorer inbred lines. Int. Sci. Investigation J. 2013;2(3):69-77.
- Shedge V., Arrieta-Montiel M., Christensen A.C., Mackenzie S.A. Plant mitochondrial recombination surveillance requires unusual RecA and MutS homologs. Plant Cell. 2007;19(4):1251-1264. DOI 10.1105/tpc.106.048355.
- Shemesh-Mayer E., Ben-Michael T., Rotem N., Rabinowitch H.D., Doron-Faigenboim A., Kosmala A., Perlikowski D., Sherman A., Kamenetsky R. Garlic (*Allium sativum* L.) fertility: transcriptome and proteome analyses provide insight into flower and pollen development. Front. Plant Sci. 2015;6:271. DOI 10.3389/fpls.2015.00271.
- Sheoran I.S., Sawhney V.K. Proteome analysis of the normal and *Ogura* (*ogu*) CMS anthers of *Brassica napus* to identify proteins associated with male sterility. Botany. 2010;88(3):217-230. DOI 10.1139/B09-085.
- Song X.Y., Qian H.H., Zhang L.L. Cytogenetic analysis of cytoplasmic male sterility in wheat line KTP116A and molecular mapping of two thermo-sensitive restoration genes. Euphytica. 2014;196(1):129-136. DOI 10.1007/s10681-013-1020-1.
- Song Y.S., Schwarzfischer A. Development of STS markers for selection of extreme resistance (Rysto) to PVY and maternal pedigree analysis of extremely resistant cultivars. Am. J. Potato Res. 2008; 85:159-170.
- Stoeva-Popova P.K., Dimaculangan D., Radkova M., Vulkova Z. Towards cytoplasmic male sterility in cultivated tomato. J. Agric. Food Environ. Sci. 2007;1(1). <http://www.scientificjournals.org/journals/2007/articles/1058.htm>.
- Sukhotu T., Kamijima O., Hosaka K. Nuclear and chloroplast DNA differentiation in Andean potatoes. Genome. 2004;47:46-56. DOI 10.1139/g03-105.
- Sukhotu T., Kamijima O., Hosaka K. Chloroplast DNA variation in the most primitive cultivated diploid potato species *Solanum stenotomum* Juz. et Buk. and its putative wild ancestral species using high-resolution markers. Genet. Res. Crop Evol. 2006;53:53-63. DOI 10.1007/s10722-004-0573-1.
- Sun Q., Hu C., Hu J., Li S., Zhu Y. Quantitative proteomic analysis of CMS-related changes in Honglian CMS rice anther. Protein J. 2009; 28(7-8):341-348. DOI 10.1007/s10930-009-9199-7.
- Suzuki H., Rodriguez-Urbe L., Xu J., Zhang J. Transcriptome analysis of cytoplasmic male sterility and restoration in CMS-D8 cotton. Plant Cell Rep. 2013;32(10):1531-1542. DOI 10.1007/s00299-013-1465-1467.
- Sykes T., Yates S., Nagy I., Asp T., Small I., Studer B. *In silico* identification of candidate genes for fertility restoration in cytoplasmic male sterile perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Genome Biol. Evol. 2016;evw047. DOI 10.1093/gbe/evw047.

- Tan Y., Li S., Xie H.W., Zhu Y.G. Genetical and molecular analysis reveals a cooperating relationship between cytoplasmic male sterility- and fertility restoration-related genes in *Oryza* species. *Theor. Appl. Genet.* 2011;122(1):9-19. DOI 10.1007/s00122-010-1418-2.
- Touzet P., Meyer E.H. Cytoplasmic male sterility and mitochondrial metabolism in plants. *Mitochondrion.* 2014;19:166-171. DOI 10.1016/j.mito.2014.04.009.
- Tucci M., Carputo D., Bile G., Frusciante L. Male fertility and freezing tolerance of hybrids involving *Solanum tuberosum* haploids and diploid *Solanum* species. *Potato Res.* 1996;39(3):345-353. DOI 10.1007/BF02357938.
- Tymov V.S., Elkonin L.A. Studying genetic control of cytoplasmic male sterility in plants: state of the problem and current approaches. *Genetika = Genetics (Moscow).* 2000;36 (4):437-45.
- Veilleux R. Anther culture of potato and molecular analysis of anther-derived plants as laboratory exercises for plant breeding courses. *Hortic. Technol.* 1999;9:585-588.
- Wang S., Wang C., Zhang X.-X., Chen X., Liu J.-J., Jia X.-F., Jia S.-Q. Transcriptome *de novo* assembly and analysis of differentially expressed genes related to cytoplasmic male sterility in cabbage. *Plant Physiol. Biochem.* 2016;5:224-232. DOI 10.3390/ijms17010042.
- Wang Z., Zou Y., Li X., Zhang Q., Chen L., Wu H., Su D., Chen Y., Guo J., Long Y., Zhong Y., Liu Y. Cytoplasmic male sterility of rice with boro II cytoplasm is caused by cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing. *Plant Cell.* 2006;18(3):676-687. DOI 10.1105/tpc.105.038240.
- Wang Z.W., De Wang C., Mei S.Y., Gao L., Zhou Y., Wang T. An insertion-deletion at a pentatricopeptide repeat locus linked to fertility transition to cytoplasmic male sterility in radish (*Raphanus sativus* L.). *Mol. Breeding.* 2015;35:108(4). DOI 10.1007/s11032-015-0301-x.
- Wei L., Fei Z., Wu X., Dong H., Zhou P., Zhang J. Mitochondrial comparative proteomic analysis of sterile line and its maintain line of purple cytoplasmic rice (*Oryza sativa*). *Advances Biosci. Biotechnol.* 2010;1:145-151. DOI 10.4236/abb.2010.13020.
- Wen L., Chase C.D. Pleiotropic effects of a nuclear restorer-of-fertility locus on mitochondrial transcripts in malefertile and S male-sterile maize. *Curr. Genet.* 1999;35:521-526.
- Wen L., Liu G., Li S.-Q., Wan C.-X., Tao J., Xu K.-Z., Zhang Z.-J., Zhu Y.-G. Proteomic analysis of anthers from Honglian cytoplasmic male sterility line rice and its corresponding maintainer and hybrid. *Bot. Studies.* 2007;48(3):293-309.
- Wesołowski W., Szklarczyk M., Szalonek M., Słowińska J. Analysis of the mitochondrial proteome in cytoplasmic male-sterile and male-fertile beets. *J. Proteomics.* 2015;119:61-74. DOI 10.1016/j.jprot.2014.12.013.
- Wise R.P., Gobelman-Werner K., Pei D., Dill C.L., Schnable P.S. Mitochondrial transcript processing and restoration of male fertility in T-cytoplasm maize. *J. Hered.* 1999;90(3):380-385.
- Wu J., Gong Y., Cui M., Qi T., Guo L., Zhang J., Xing C. Molecular characterization of cytoplasmic male sterility conditioned by *Gossypium harknessii* cytoplasm (CMS-D2) in upland cotton. *Euphytica.* 2011;181:17-29. DOI 10.1007/s10681-011-0357-6.
- Wu Z., Cheng J., Qin C., Hu Z., Yin C., Hu K. Differential proteomic analysis of anthers between cytoplasmic male sterile and maintainer lines in *Capsicum annuum* L. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14(11):22982-22996. DOI 10.3390/ijms141122982.
- Xu X.-B., Liu Z.-X., Zhang D.-F., Liu Y., Song W.-B., Li J.-S., Dai J.-R. Isolation and analysis of rice *Rf1*-orthologous *PPR* genes co-segregating with *Rf3* in maize. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2009;27:511. DOI 10.1007/s11105-009-0105-4.
- Yan X., Dong C., Yu J., Liu W., Jiang C., Liu J., Hu Q., Fang X., Wei W. Transcriptome profile analysis of young floral buds of fertile and sterile plants from the self-pollinated offspring of the hybrid between novel restorer line NR1 and *Nsa* CMS line in *Brassica napus*. *BMC Genomics.* 2013;14:26. DOI 10.1186/1471-2164-14-26.
- Yang P., Han J., Huang J. Transcriptome sequencing and *de novo* analysis of cytoplasmic male sterility and maintenance in JA-CMS cotton. *PLoS ONE.* 2014;9(11):e112320. DOI 10.1371/journal.pone.0112320.
- Yang X., Cheng Y.F., Deng C., Ma Y., Wang Z.W., Chen X.H., Xue L.-B. Comparative transcriptome analysis of eggplant (*Solanum melongena* L.) and turkey berry (*Solanum torvum* Sw.): phylogenomics and disease resistance analysis. *BMC Genomics.* 2014;15:412. DOI 10.1186/1471-2164-15-412.
- Young E.G., Hanson M.R. A fused mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility is developmentally regulated. *Cell.* 1987;50(1):41-49.
- Yue B., Vick B.A., Cai X., Hu J. Genetic mapping for the *Rf1* (fertility restoration) gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by SSR and TRAP markers. *Plant Breed.* 2010;129(1):24-28. DOI 10.1111/j.1439-0523.2009.01661.x.
- Yurina N.P., Odintsova M.S. Signal transduction pathways of plant mitochondria: retrograde regulation. *Fiziologiya rasteniy = Plant Physiology (Moscow).* 2010;57(1):9-22.
- Zhang F., Li G., Ding Q., Wang Z., Ma X., Zhang H., Zhang Z., Jin F., Ma L. Proteome analysis of pollen in the K-type male sterility line 732A and its maintainer 732B in wheat (*Triticum aestivum* L.) by two-dimensional gel electrophoresis. *Acta Physiol. Plant.* 2016;38:84. DOI 10.1007/s11738-016-2077-y.
- Zhang J., Stewart J.M. Inheritance and genetic relationships of the D8 and D2-2 restorer genes for cotton cytoplasmic male sterility. *Crop Science.* 2001;41(2):289-294. DOI 10.2135/cropsci2001.412289x.
- Zhang Z., Zheng Y. Identification of candidate genes associated with fertility restoration in maize S cytoplasmic male sterility. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2008;26(1):60-71. DOI:10.1007/s11105-008-0023-x.

Достижения и перспективы использования методов высокопроизводительного секвенирования в генетике и селекции картофеля

И.В. Быкова¹ , Н.А. Шмаков^{1, 2}, Д.А. Афонников^{1, 2}, А.В. Кочетов^{1, 2}, Е. К. Хлесткина^{1, 2}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Для повышения эффективности процесса селекции картофеля в последние годы активно используются методы отбора с помощью ДНК-маркеров. Применение маркер-ориентированной селекции, а также геномной селекции и новейших методов создания форм картофеля с заданными свойствами (геномное редактирование) требует широкомасштабного изучения геномов и генов картофеля на основе высокопроизводительных методов секвенирования нового поколения. Цель настоящего обзора – рассмотреть направления исследований в картофелеводстве, основанные на применении данных методов, и систематизировать связанные с этой темой сведения об интернет-ресурсах. Уделяется также внимание особенностям используемых моделей и подходов в генетических исследованиях картофеля ввиду сложной организации его генома и высокого уровня гетерозиготности. В генетических исследованиях нередко прибегают к использованию диплоидных форм, к которым относятся диплоидные виды картофеля, искусственно полученные гетерозиготные дигаплоиды и гомозиготные удвоенные моноплоиды. Наличие искусственно созданных диплоидных форм сыграло важную роль в успешном секвенировании генома картофеля, завершено в 2011 г. Работа Международного консорциума по секвенированию генома картофеля включала не только конструирование геномных библиотек, секвенирование, сборку и аннотирование генома, но и фундаментальные исследования на основе полученной последовательности, направленные на выявление особенностей эволюции генома картофеля, идентификацию SNP (single nucleotide polymorphism – однонуклеотидный полиморфизм), анализ генов и генных сетей, контролирующих устойчивость к фитопатогенам и технологические свойства. Важным следствием секвенирования генома стала идентификация более 8 тыс. SNP и апробация метода GBS (genotyping-by-sequencing – генотипирование путем секвенирования) на картофеле, что является основой для геномной селекции этой культуры и выявления новых хозяйственно ценных генов картофеля методом полногеномного анализа ассоциаций (genome-wide association studies – GWAS). Ведется работа по оптимизации существующих биоинформатических методов анализа для осуществления работ в этом направлении, учитывающая особенности организации генома картофеля. В обзоре приведен анализ доступных электронных баз данных, содержащих результаты работ по секвенированию генома и транскриптома картофеля, а также сопутствующих ресурсов. Эта информация будет полезна для планирования работ по сравнительному анализу транскриптома картофеля и исследований с использованием геномных ДНК-маркеров. Результаты секвенирования генома, а также сравнительных исследований, базирующихся на анализе транскриптома и микроРНК

Achievements and prospects of applying high-throughput sequencing techniques to potato genetics and breeding

I.V. Bykova¹ , N.A. Shmakov^{1, 2}, D.A. Afonnikov^{1, 2}, A.V. Kochetov^{1, 2}, E.K. Khlestkina^{1, 2}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

In recent years, marker-assisted selection (MAS) has been intensively used to increase potato breeding efficiency. Large-scale studies of the potato genome and genes exploiting next-generation sequence (NGS) approaches are required for broad application of MAS, genomic selection as well as genomic editing (the newest approach for creating potato with desired properties). In this review, trends in potato NGS-based research are overviewed, and related Internet resources are systematized. Special attention is given to peculiarities of the models and the approaches used in potato genetic studies, taking into account the complex organization of its genome and a high level of heterozygosity. In genetic studies diploids are used often, including diploid potato species, artificially obtained heterozygous dihaploids and homozygous double monoploids. The availability of artificially created diploid forms played an essential role in potato genome sequencing, which was completed in 2011. The Potato Genome Sequencing Consortium activities included not only constructing genome libraries, sequencing, assembling and annotation of the genome, but also genome sequence-based investigations uncovering features of potato genome evolution, SNP identification, analysis of genes and gene networks regulating resistance to phytopathogens and technological characteristics. An important outcome of the genome sequencing was further identification of more than 8 thousand SNPs and approbation of the Genotyping-by-sequencing (GBS) method on potato, which is the basis for potato genomic selection and for discovery of economically important genes using genome wide association studies (GWAS). Optimization of existing bioinformatic tools to support these studies, taking into account potato genome organiza-

Received 07.11.2016

Accepted for publication 12.01.2017

© AUTHORS, 2017

I.V. Bykova and N.A. Shmakov equal contribution to manuscript preparation

образцов культивируемого картофеля и его дикорастущих сородичей, с одной стороны, представляют фундаментальный интерес, способствуя выявлению особенностей эволюции генома, онтогенетического развития растений картофеля и механизмов ответа на различные стимулы окружающей среды, а с другой – позволяют осуществлять широкий спектр прикладных работ, направленных на разработку эффективных геномных и ген-специфичных маркеров и получения с их помощью новых сортов картофеля с заданными свойствами.

Ключевые слова: RNAseq; *Solanum tuberosum*; картофель; геном, транскриптом; секвенирование; гены; маркеры; базы данных.

tion peculiarities, are carried out. This review gives analysis of databases containing potato genome and transcriptome sequencing results, as well as accompanying resources. This information should prove useful while planning comparative assays of potato transcriptome or application of DNA-markers. Sequencing of the genome as well as transcriptomes and micro-RNomes of cultivated potato and its wild relatives, on one hand, is of fundamental interest, assisting in detecting features of genome evolution, ontogenetic development and mechanisms of various environmental stresses responses. On the other hand, it is the basis for a wide range of practical applications for developing effective genomic and gene-specific markers and marker-assisted breeding of new potato cultivars with desired properties.

Key words: databases; genes; genome; markers; potato; RNAseq; *Solanum tuberosum*; sequencing; transcriptome.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Быкова И.В., Шмаков Н.А., Афонников Д.А., Кочетов А.В., Хлесткина Е.К. Достижения и перспективы использования методов высокопроизводительного секвенирования в генетике и селекции картофеля. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(1):96-103. DOI 10.18699/VJ17.227

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Bykova I.V., Shmakov N.A., Afonnikov D.A., Kochetov A.V., Khlestkina E.K. Achievements and prospects of applying high-throughput sequencing techniques to potato genetics and breeding. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):96-103. DOI 10.18699/VJ17.227

Картофель по объемам производства и потребления входит в четверку наиболее важных продовольственных культур наряду с пшеницей, рисом и кукурузой (www.fao.org). Селекция картофеля – динамичный процесс, отвечающий постоянно меняющимся требованиям в области переработки картофеля и возникновению новых технологических операций, а в последнее время – также потребности в разработке продуктов для функционального и диетического питания. Кроме того, традиционные задачи селекции картофеля – повышение урожайности и устойчивости к заболеваниям и неблагоприятным климатическим условиям (Gebhardt, 2013).

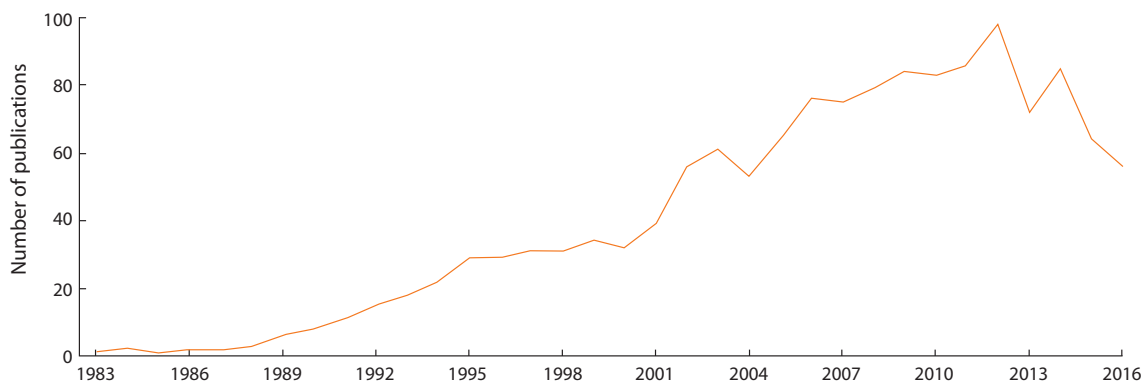
С целью повышения эффективности процесса селекции картофеля в последние годы активно используются схемы маркер-ориентированной селекции, подходящие для отбора по моно- и олигогенным признакам (Gebhardt, 2013; Ramakrishnan et al., 2015; Хлесткина и др., 2016; Колчанов и др., 2017); экономическая целесообразность применения данного метода обоснованна (Slater et al., 2013). Согласно оценке публикационной активности (см. рисунок), вплоть до 2012 г. отмечалась выраженная положительная динамика использования ДНК-маркеров в картофелеводстве. Некоторое ее снижение в последние три-четыре года требует дополнительного анализа и может быть связано с переключением интереса на новейший метод получения генотипов с заданными свойствами (геномное редактирование с помощью системы CRISPR/Cas9).

Для улучшения сельскохозяйственных культур, в том числе картофеля, по моно- и олигогенным признакам также перспективны современные методы геномного редактирования, а для отбора по полигенным признакам – геномная селекция (Bortesi, Fischer, 2015; Butler et al., 2015; Wang et al., 2015; Хлесткина, Шумный, 2016; Andersson et al., 2016; Butler, Douches, 2016; Slater et al., 2016).

Применение маркер-ориентированной селекции и геномного редактирования требует предварительного проведения интенсивных исследований, направленных на выявление хозяйственно ценных генов, установление их аллельных вариантов на уровне ДНК. Для геномной селекции, помимо этого, необходимы экономичные высокопроизводительные методы анализа полиморфизма ДНК. И то и другое требует вовлечения методов секвенирования нового поколения. Цель настоящего обзора – рассмотреть направления исследований в картофелеводстве, основанные на применении методов высокопроизводительного секвенирования, и систематизировать сведения об интернет-ресурсах, связанные с данными исследованиями.

Организация генома картофеля и особенности используемых моделей в генетических исследованиях

Основной вид картофеля, находящийся в производстве, – *Solanum tuberosum* – относится к семейству Solanaceae, которое включает в себя и другие важные сельскохозяйственные культуры (томат, перец, баклажан, табак). *S. tuberosum* – автотетраплоид ($2n = 4x = 48$) с базовым числом хромосом 12 и размером (гаплоидного) генома $0,84 \cdot 10^9$ п. н. (Visser et al., 2009). Для сортов *S. tuberosum* характерна высокая степень гетерозиготности, что обеспечивает повышенную жизнеспособность растений картофеля при полиплоидном уровне организации. Из-за этих особенностей (полиплоидный геном и гетерозиготность) анализ как отдельных генов картофеля, так и генома в целом затруднен. В генетических исследованиях нередко прибегают к использованию диплоидных форм, к которым относятся: диплоидные сородичи *S. tuberosum*; искусственно полученные гетерозиготные диплоидные формы (дигаплоиды); гомозиготные диплоидные формы



Trend in the number of publications dealing with the use of molecular markers in potato research and breeding. Website: <http://scopus.com>; search results for "marker+potato+Solanum" in article titles, abstracts and key words are presented ("Solanum" was added to exclude sweet potato research).

(получаемые за счет удвоения моноплоидов). Вовлечение диплоидных сородичей в генетические исследования не только упрощает анализ, но и позволяет изучить потенциал этих видов в качестве доноров селекционно значимых генов, особенно генов устойчивости к фитопатогенам и вредителям (Nowicki et al., 2012; Рогозина и др., 2012, 2013; Limantseva et al., 2014).

Помимо естественных диплоидных форм в генетических исследованиях используют специально созданные диплоидные линии картофеля. Например, H. van Os et al. (2006) сконструировали генетическую карту картофеля, плотно насыщенную ДНК-маркерами (более 10 тыс. AFLP-локусов; amplified fragment length polymorphism – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов) при использовании картирующей популяции, полученной от скрещивания двух диплоидных гетерозиготных клоновых линий. Одна из родительских форм данной популяции в дальнейшем была включена в проект по полногеномному секвенированию картофеля (The Potato... Consortium, 2011). Дигаметоидные формы создают за счет понижения уровня пloidности с тетра- до диплоидного (Hougas et al., 1958), при этом создаваемые диплоидные формы являются гетерозиготными. Между тем для решения ряда генетических задач, а также для практического применения в гибридной селекции необходимы гомозиготные диплоидные формы. Такие формы получают за счет удвоения моноплоидов, и именно удвоенный моноплоид стал основной моделью для проведения полногеномного секвенирования картофеля (The Potato... Consortium, 2011). Моноплоиды получают из диплоидных форм через культуру пыльников (Veilleux et al., 1985). Возможность создания таких форм ограничена генетически детерминированной способностью генотипов к культивированию *in vitro*.

Секвенирование генома картофеля и результаты работы консорциума

Для проведения сложной и масштабной работы по секвенированию генома картофеля был организован Международный консорциум (The Potato Genome Sequencing Consortium – PGSC), включающий 16 исследовательских групп из Аргентины, Бразилии, Великобритании,

Китая, Индии, Ирландии, Италии, Нидерландов, Новой Зеландии, Перу, Польши, России, США и Чили. С целью получения качественной геномной последовательности основным объектом полногеномного секвенирования был выбран гомозиготный генотип – искусственно созданный удвоенный моноплоид (DM1-3 516R44), произведенный из диплоидной формы *S. tuberosum* группы Phureja (*S. phureja*). Последовательность генома удвоенного моноплоида DM1-3 516R44, в свою очередь, стала основой для интеграции данных, полученных при секвенировании гетерозиготной диплоидной культурной формы *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* (Visser et al., 2009; The Potato... Consortium, 2011). Именно этот гетерозиготный диплоидный образец (RH-89-039-16) изначально был взят в качестве модели для полногеномного секвенирования – отчасти ввиду того, что являлся родительской формой наиболее информативной на тот момент картирующей популяции, с использованием которой была создана молекулярно-генетическая карта картофеля высокой плотности (van Os et al., 2006). Однако с самого начала анализ данных для гетерозиготной формы оказался затруднен, поэтому в процессе работы консорциума в качестве основной модели была выбрана упомянутая выше гомозиготная диплоидная форма DM1-3 516R44 (далее – DM).

Деятельность консорциума включала следующие этапы: 1) собственно секвенирование и построение хромосомных последовательностей (конструирование геномных библиотек на основе ВАС-клонов (ВАС – bacterial artificial chromosome, бактериальная искусственная хромосома) и фосмид, секвенирование, сборка и аннотирование генома), в результате чего была определена нуклеотидная последовательность, составляющая 86 % от всего генома и установлено 90.3 % от ранее предсказанного числа генов; 2) фундаментальные исследования на основе полученной последовательности генома (изучение эволюции генома картофеля, идентификация SNP, анализ генов и генных сетей, контролирующих устойчивость к фитопатогенам и технологические свойства картофеля).

Полученная сборка генома образца DM имеет длину $7.26 \cdot 10^8$ п.н., 86 % из которых привязано к генетической карте, и содержит 39031 аннотированный ген.

Table 1. Internet resources for potato genome sequences (The Potato...consortium 2011)

Database name*	Assembling type	Assembly of pseudomolecules	BAC clones	Nonnuclear genomes	Other sequences
Sol Genome	Scaffolds	Yes	Yes	Chloroplast, mitochondrial	CDS, proteins
Spud		Yes	Yes		CDS, cDNA, proteins, SSR, DArT, OPA, SNP
NCBI		No	Yes	Chloroplast	CDS
Ensembl		No	No		CDS, cDNA, microRNA
Plaza	Chromosomes	No	No		CDS

*Websites and references are given in Supplementary material 1.

Table 2. SNP and indel frequencies according to the results of sequencing the whole potato genome or its fragments

Samples compared	SNP	indel	Reference
11 diploids and 17 tetraploids; genomic fragments of total length 71 kb	1/21	1/243	Rickert et al., 2003
47 accessions; genomic fragments of total length > 25 kb	1/23	1/441	Simko et al., 2006
2 genotypes (heterozygous diploid and doubled monopleid), whole genome sequences	1/40	1/394	The Potato... Consortium, 2011
Homologous sequences of a single heterozygous diploid	1/29	1/253	»
83 cultivars of tetraploid potato (807 resequenced genes)	1/18	1/163	Uitdewilligen et al., 2013
83 cultivars of tetraploid potato (807 resequenced genes – coding regions only)	1/24	1/1448	»

Сведения о сборке генома картофеля и сопутствующие данные представлены в пяти основных интернет-ресурсах (табл. 1). Их подробный анализ дан в Приложении (Доп. материалы 1)¹.

Сравнение двух секвенированных форм картофеля (DM и RH) показало уровень идентичности 97.5 % (повторяющаяся фракция генома при этом не учитывалась). Встречаемость SNP в среднем составила один на 40 п. н., а инсерций/делеций (indels) – одну на 394 п. н. При сравнении последовательностей гетерозиготного образца RH установлен уровень идентичности в гомологичных участках 96.5 %, встречаемость SNP – один на 29 п. н., indel – одна на 253 п. н. Сравнение частот SNP и indel по данным консорциума, а также предшествующих и последующих исследований приведено в табл. 2.

Данные геномного секвенирования послужили основой при разработке микрочипа картофеля для анализа более 8 тыс. SNP-локусов (Hamilton et al., 2011; Felcher et al., 2012; SolCAP, 2016) и применении на картофеле относительно нового метода высокопроизводительного генотипирования – GBS (genotyping-by-sequencing – генотипирование путем секвенирования) (Uitdewilligen et al., 2013). Эти разработки являются основой для будущего освоения метода геномной селекции картофеля и выявления новых

хозяйственно ценных генов картофеля методом GWAS (genome-wide association studies – полногеномный анализ ассоциаций). Однако на пути к широкому применению этих подходов в анализе культивируемых форм картофеля стоит вопрос разработки биоинформатических методов оценки получаемых данных с учетом высокой степени гетерозиготности полиплоидных образцов. Проводятся работы, направленные на решение этой сложной задачи (Rosyara et al., 2016).

Сравнение полученной последовательности генома картофеля с геномом томата – представителя того же семейства, но не образующего клубни, в отличие от картофеля, а также проведенный консорциумом анализ транскриптома клубней и столонов позволили расширить представление о механизмах клубнеобразования. При клубнеобразовании усиливалась транскрипция 333 генов, в наибольшей степени – генов, кодирующих запасные белки, ингибиторы протеиназ и пататин. При этом выявлено, что большое семейство ингибиторов протеаз КТІ у картофеля вдвое больше по численности, чем у томата. Предполагается, что КТІ нацелены на ингибирование экзогенных протеиназ, защищая тем самым клубни от воздействия патогенов и вредителей (The Potato... Consortium, 2011).

Другая группа генов, активность которой существенно различается в клубнях и столонах, – гены биосинтеза крахмала. Сравнение уровня экспрессии генов у двух

¹ Дополнительные материалы 1–2 см. в Приложении 2 по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2017-21/appx2.pdf>

секвенированных образцов показало, что у гетерозиготной формы, полученной от современного коммерческого сорта, гены биосинтеза крахмала в среднем в 3–8 раз активнее, чем у удвоенного моноплоида (DM), производного образца из группы Phureja. У DM, наоборот, выше уровень мРНК альфа- (в 10–25 раз) и бета-амилазы (в 5–10 раз). В целом различия между двумя генотипами хорошо согласуются с гипотезой о том, что отбор на повышенную продуктивность клубней – это отчасти результат снижения активности генов гидролиза крахмала. Выявление дифференциально экспрессирующихся генов, влияющих на метаболизм крахмала, имеет важное значение для получения в перспективе сортов картофеля, продуцирующих крахмал с заданными свойствами, который будет представлять собой оптимальное сырье для тех или иных отраслей промышленности (Хлесткин и др., 2017).

Поскольку картофель поражается разнообразными вредителями и возбудителями болезней, то особое внимание по завершении секвенирования было уделено идентификации генов устойчивости (*R*-генов). Большинство изученных до этого генов *R* Solanaceae, как было показано, несут NBS- и LRR-домены (NBS – nucleotide-binding site, LRR – leucine-rich-repeat). У секвенированного образца DM обнаружено 438 NBS-LRR-кодирующих генов (Jupé et al., 2012), среди них известные ранее *R1*, *RB*, *R2*, *R3a*, *Rpi-blb2* и *Rpi-vnt1.1*. Однако 39.4 % выявленных генов несли функциональные мутации (сдвиг рамки считывания, преждевременные стоп-кодона и т. д.), в том числе эти нарушения выявлены в генах *R1*, *R3a* и *Rpi-vnt1.1*. Такой высокий уровень изменчивости наблюдается параллельно быстрой эволюции эффекторных генов некоторых фитопатогенов картофеля. Изучение выделенных новых *R*-генов позволит выявить в дальнейшем гены-кандидаты для использования в селекции картофеля.

Таким образом, данные, полученные в результате секвенирования генома картофеля, служат основой для широкого спектра как фундаментальных исследований, так и прикладных работ, направленных на получение новых сортов с заданными свойствами, разработку новых геномных и ген-специфичных маркеров картофеля для селекции по хозяйственно значимым признакам.

Транскриптомные исследования как ключ к пониманию механизмов формирования хозяйственно значимых признаков картофеля

Сравнительный анализ транскриптомов генотипов картофеля, контрастных по проявлению того или иного признака, позволяет понять, какие молекулярно-генетические механизмы задействованы в формировании фенотипа, найти и маркировать гены-мишени для селекции новых улучшенных форм картофеля.

Данные об исследованиях транскриптома картофеля методами RNAseq и анализа ДНК-микрочипов содержатся в репозиториях Gene Expression Omnibus NCBI – GEO (Clough, Barrett, 2016) и ArrayExpress EBI (Kolesnikov et al., 2015).

GEO (Gene Expression Omnibus Database; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) – это база данных, в которой собраны результаты высокопроизводительного секвенирования

транскриптомов (RNAseq) и анализа экспрессии генов с использованием микрочипов, в том числе для *S. tuberosum* (Rensink et al., 2005; Carvallo et al., 2011; Evers et al., 2012; Zhang et al., 2013; Stare et al., 2015; Gálvez et al., 2016). База данных GEO включает несколько разделов, в том числе DataSets, который содержит описание экспериментов по секвенированию транскриптомов. В этом разделе суммированы данные 1583 экспериментов, посвященных анализу транскриптома картофеля. Результаты транскриптомных экспериментов в БД GEO представлены в 30 публикациях, в число которых входят исследования по изменению транскриптома картофеля в ответ на заражение вирусами (Baebler et al., 2014; Petek et al., 2014; Stare et al., 2015), на воздействие факторами абиотического стресса (Gálvez et al., 2016), различия в уровне экспрессии генов miRNA в зависимости от стадии развития (Lakhotia et al., 2014). Первичные данные секвенирования транскриптомов в экспериментах RNA-seq представлены в базе данных NCBI SRA (Sequence Read Archive), основном мировом архиве результатов высокопроизводительного секвенирования нуклеотидных последовательностей. SRA содержит информацию по 2004 экспериментам, связанным с высокопроизводительным секвенированием *S. tuberosum*, из которых 1438 относятся к секвенированию генома и 564 – к секвенированию транскриптома (Massa et al., 2011; Zhang et al., 2013; Gong et al., 2015; Liu et al., 2015; Zuluaga et al., 2015).

Еще одна полезная база данных – ArrayExpress (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>). Этот ресурс Европейского института биоинформатики содержит результаты 77 экспериментов по анализу экспрессии генов картофеля (Ali et al., 2014; Burra et al., 2014). Основные типы экспериментов, данные по которым опубликованы в ArrayExpress для *S. tuberosum*, это высокопроизводительное секвенирование транскриптома ('RNA-seq of coding RNA', 9 экспериментов) и анализ экспрессии с помощью микрочипов ('transcription profiling by array', 62 эксперимента).

Наиболее часто встречающейся постановкой транскриптомного эксперимента у картофеля является сравнение уровней экспрессии генов растений для двух контрастных условий. Такие эксперименты позволяют выявить ранее неизвестные детали механизма взаимодействия растений картофеля с патогеном. В отдельных случаях может быть идентифицирован новый ген устойчивости, что позволяет разработать диагностические ДНК-маркеры для ускоренного отбора селекционного материала по целевому гену.

Так, на основе сравнительного анализа транскриптома чувствительных и устойчивых к фитофторе образцов дикого и культивируемого картофеля среди дифференциально экспрессирующихся генов были выявлены не только ожидаемые гены, имеющие отношение к известным механизмам устойчивости (гиперчувствительный ответ, программируемая клеточная гибель, активность эндопептидаз), но и гены с функциями, ранее не ассоциированными с защитой от данного патогена (ацилирование белков, трансмембранный транспорт и др.) (Frades et al., 2015). Кроме того, авторы описали несколько новых потенциальных генов устойчивости (*R*) – кандидатов для дальнейшего использования в селекционном процессе.

Другая группа исследований – сравнение паттернов транскрипции генов в разных частях растений или на разных стадиях развития. Их результаты важны для понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе эволюционных и онтогенетических изменений, что представляет прежде всего фундаментальный интерес. Кроме того, в свете интенсивно осваиваемой технологии геномного редактирования такие исследования открывают новые возможности для выявления генов-мишеней для направленного мутагенеза. Например, обнаруженные при сравнении транскриптомов столонов и клубней дифференциально экспрессирующиеся гены, связанные с клубнеобразованием (The Potato ... Consortium, 2011), представляют собой потенциальные мишени для применения стратегии доместикации *de novo* (Хлесткина, 2016).

Идентификация микроРНК, участвующих в регуляции физиологических процессов

МикроРНК (miRNA) представляет собой класс коротких некодирующих эндогенных РНК, которые играют важную роль в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов и участвуют в контроле онтогенетических, физиологических и биохимических процессов. Это короткие (21–24 нуклеотида) одноцепочечные молекулы, в образовании которых участвуют РНК полимеразы II и эндорибонуклеазы DCL1. Идентификация микроРНК и предсказание их мишеней выполняются с помощью существующих и активно развивающихся методов биоинформатического анализа секвенированных фракций микроРНК, выделяемых в ходе сравнительных экспериментов из разных частей растений, на тех или иных этапах развития, а также при воздействии различных внешних стимулов. Для секвенирования используют как экспериментальные подходы, связанные с высокопроизводительным секвенированием (Zhang et al., 2013), так и биоинформатические подходы для предсказания структуры микроРНК по уже известным последовательностям (Zhang et al., 2009). Исследования направлены на изучение микроРНК, которые регулируют экспрессию конкретных генов (Chi et al., 2015), участвующих в формировании стрессового ответа на засуху (Zhang et al., 2014) и играющих роль в процессе клубнеобразования (Martin et al., 2009; Bhogale et al., 2014; Lakhota et al., 2014).

Данные по микроРНК картофеля аннотированы в нескольких базах данных: miRBase (Kozomara, Griffiths-Jones, 2013), miRNEST 2.0 (Szcześniak, Mąkałowska, 2014), RNAcentral (The RNAcentral Consortium, 2017) и Spud DB (Hirsch et al., 2014). Подробный анализ этих электронных ресурсов дан в Доп. материалах 2.

Если до применения методов NGS на картофеле работы по изучению его микроРНК сводились к проверке функций микроРНК, известных у представителей растительного мира, то с применением методов высокопроизводительного секвенирования стало возможным выявление новых, специфичных для картофеля семейств. Так, в работе (Zhang et al., 2013) в листьях и столонах картофеля было идентифицировано 28 консервативных семейств микроРНК растений и выявлено 120 специфичных для картофеля семейств. Для большинства из них были предсказаны гены-мишени.

В дальнейших исследованиях сравнительный анализ микроРНК (совокупности всех микроРНК) выполнялся в разрезе онтогенетического развития (Lakhota et al., 2014) и ответа на засуху (Zhang et al., 2014). В результате в работе (Lakhota et al., 2014) были выявлены микроРНК картофеля, мишенями для которых являются гены, кодирующие известные факторы, важные для развития растений (ARF16 – auxin response factor 16, NAM – no apical meristem, RAP1 – relative to APETALA2 1, HAM – hairy meristem), а в работе (Zhang et al., 2014) выявлены четыре микроРНК, участвующие в регуляции ответа на данный вид стресса, и предсказаны мишени для этих микроРНК.

Заключение

Результаты секвенирования генома, а также сравнительных исследований, базирующихся на анализе транскриптома и микроРНК образцов культивируемого картофеля и его дикорастущих сородичей, с одной стороны, представляют фундаментальный интерес, способствуя выявлению особенностей эволюции генома, онтогенетического развития растений картофеля и механизмов ответа на различные стимулы окружающей среды, а с другой стороны, являются основой для широкого спектра прикладных работ, направленных на разработку эффективных геномных и ген-специфичных маркеров и получения с их помощью новых сортов картофеля с заданными свойствами.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Science Foundation, project 16-16-04073.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Ali A., Alexandersson E., Sandin M., Resjö S., Lenman M., Hedley P., Levander F., Andreasson E. Quantitative proteomics and transcriptomics of potato in response to *Phytophthora infestans* in compatible and incompatible interactions. BMC Genomics. 2014;15(1):497. DOI 10.1186/1471-2164-15-497.
- Andersson M., Tureson H., Nicola A., Falt A., Samuelsson M., Hofvander P. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. Plant Cell Rep. 2016;36(1):117-128. DOI 10.1007/s00299-016-2062-3.
- Baeblér Š., Witek K., Petek M., Stare K., Tušek-Žnidarič M., Pompe-Novak M., Renaut J., Szajko K., Strzelczyk-Zyta D., Marczewski W., Morgiewicz K., Gruden K., Hennig J. Salicylic acid is an indispensable component of the *Ny-1* resistance-gene-mediated response against *Potato virus Y* infection in potato. J. Exp. Bot. 2014; 65(4):1095-1109.
- Bhogale S., Mahajan A.S., Natarajan B., Rajabhoj M., Thulasiram H.V., Banerjee A.K. MicroRNA156: A potential graft-transmissible microRNA that modulates plant architecture and tuberization in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. Plant Physiol. 2014;164(2):1011-1027. DOI 10.1104/pp.113.230714.
- Bortesi L., Fischer R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. Biotechnol. Advance. 2015;33(1):41-52. Available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006>.
- Burra D.D., Berkowitz O., Hedley P.E., Morris J., Resjö S., Levander F., Liljeroth E., Andreasson E., Alexandersson E. Phosphite-induced changes of the transcriptome and secretome in *Solanum tuberosum* leading to resistance against *Phytophthora infestans*. BMC Plant Biol. 2014;14:254. DOI 10.1186/s12870-014-0254-y.

- Butler N.M., Atkins P.A., Voytas D.F., Douches D.S. Generation and inheritance of targeted mutations in potato (*Solanum tuberosum* L.) using the CRISPR/Cas System. *PLoS ONE*. 2015;10(12). DOI 10.1371/journal.pone.0144591.
- Butler N.M., Douches D.S. Sequence-specific nucleases for genetic improvement of potato. *Am. J. Potato Res.* 2016;93(4):303-320. DOI 10.1007/s12230-016-9513-9.
- Carvalho M.A., Pino M.T., Jeknić Z., Zou C., Doherty C.J., Shiu S.H., Chen T.H.H., Thomashow M.F. A comparison of the low temperature transcriptomes and CBF regulons of three plant species that differ in freezing tolerance: *Solanum commersonii*, *Solanum tuberosum*, and *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 2011;62(11):3807-3819.
- Chi M., Liu C., Su Y., Tong Y., Liu H. Bioinformatic prediction of upstream microRNAs of PPO and novel microRNAs in potato. *Can. J. Plant Sci.* 2015;95(5):871-877. DOI <http://dx.doi.org/10.1139/CJPS-2014-308>.
- Clough E., Barrett T. The Gene Expression Omnibus database. *Methods Mol. Biology.* 2016;1418:93-110. DOI 10.1007/978-1-4939-3578-9_5.
- Evers D., Legay S., Lamoureux D., Hausman J.F., Hoffmann L., Renaut J. Towards a synthetic view of potato cold and salt stress response by transcriptomic and proteomic analyses. *Plant. Mol. Biol.* 2012;78(4-5):503-14. DOI 10.1007/s11103-012-9879-0.
- Felcher K.J., Coombs J.J., Massa A.N., Hansey C.N., Hamilton J.P., Veilleux R.E., Buell C.R., Douches D.S. Integration of two diploid potato linkage maps with the Potato Genome Sequence. *PLoS ONE*. 2012;7(4). DOI 10.1371/journal.pone.0036347.
- Frades I., Abreha K.B., Proux-Wéra E., Lankinen Å., Andreasson E., Alexandersson E. A novel workflow correlating RNA-seq data to *Phytophthora infestans* resistance levels in wild *Solanum* species and potato clones. *Front. Plant Sci.* 2015;6:718. DOI 10.3389/fpls.2015.00718.
- Gálvez J.H., Tai H.H., Lagüe M., Zebarth B.J., Strömvik M.V. The nitrogen responsive transcriptome in potato (*Solanum tuberosum* L.) reveals significant gene regulatory motifs. *Sci. Reports.* 2016;6:26090. DOI 10.1038/srep26090.
- Gebhardt C. Bridging the gap between genome analysis and precision breeding in potato. *Cell.* 2013;29(4):248-256. DOI 10.1016/j.tig.2012.11.006.
- Gong L., Zhang H., Gan X., Zhang L., Chen Y., Nie F., Shi L., Li M., Guo Z., Zhang G., Song Y. Transcriptome profiling of the potato (*Solanum tuberosum* L.) plant under drought stress and water-stimulus conditions. *PLoS ONE*. 2015;10(5):e0128041. DOI 10.1371/journal.pone.0128041.
- Hamilton J.P., Hansey C.N., Whitty B.R., Stoffel K., Massa A.N., Deynze A., De Jong W., David S., Douches D.S., Buell C.R. Single nucleotide polymorphism discovery in elite north american potato germplasm. *BMC Genomics.* 2011;12:302. DOI 10.1186/1471-2164-12-302.
- Hirsch C.D., Hamilton J.P., Childs K.L., Cepela J., Crisovan E., Vaillancourt B., Hirsch C.N., Habermann M., Neal B., Buell C.R. Spud DB: A resource for mining sequences, genotypes, and phenotypes to accelerate potato breeding. *Plant Genome.* 2014;7(1). DOI 10.3835/plantgenome2013.12.0042.
- Hougas R.W., Peloquin S.J., Ross R.W. Haploids of the common potato. *J. Heredity.* 1958;49:103-106.
- Jupe F., Pritchard L., Etherington G.J., MacKenzie K., Cock P.J.A., Wright F., Sharma S.K., Bolser D., Bryan G.J., Jones J.D.G., Hein I. Identification and localization of the NB-LRR gene family within the potato genome. *BMC Genomics.* 2012;13:75. DOI 10.1186/1471-2164-13-75.
- Khlestkin V.K., Peltek S.E., Kolchanov N.A. Target genes for development of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars with desired starch properties. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya=Agricultural Biology.* 2017;52(1):25-36. DOI 10.15389/agrobiology.2017.1.25. (in Russian).
- Khlestkina E.K. Genomnoe redaktirovanie kak mashina vremeni, ili domestikatsiya za paru let. *Nauka iz pervykh ruk [Genome editing as 'time machine' or domestication within a couple of years. Science First Hand].* 2016;71-72(5-6):72-75. (in Russian).
- Khlestkina E.K., Shumny V.K. Prospects for application of breakthrough technologies in breeding: The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing. *Genetika = Genetics.* 2016;52(7):774-787. (in Russian).
- Khlestkina E.K., Shumny V.K., Kolchanov N.A. Marker-assisted selection and examples of its application in world potato growing. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC.* 2016;30(10):5-8. (in Russian).
- Kolchanov N.A., Kochetov A.V., Salina E.A., Pershina L.A., Khlestkina E.K., Shumny V.K. The state and trends of marker-assisted and genomic selection application in plants. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Nauk = Herald of the Russian Academy of Sciences.* 2017;87:40-46. (in Russian).
- Kolesnikov N., Hastings E., Keays M., Melnichuk O., Tang Y.A., Williams E., Dylag M., Kurbatova N., Brandizi M., Burdett T., Megy K., Pilicheva E., Rustici G., Tikhonov A., Parkinson H., Petryszak R., Sarkans U., Brazma A. ArrayExpress update—simplifying data submissions. *Nucl. Acids Res.* 2015;43(D1):D1113-D1116. DOI 10.1093/nar/gku1057.
- Kozomara A., Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucl. Acids Res.* 2013;42(D1):D68-D73. DOI <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1181>.
- Lakhotia N., Joshi G., Bhardwaj A.R., Bhardwaj A.R., Katiyar-Agarwal S., Agarwal M., Jagannath A., Goel S., Kumar A. Identification and characterization of miRNAome in root, stem, leaf and tuber developmental stages of potato (*Solanum tuberosum* L.) by high-throughput sequencing. *BMC Plant Biology.* 2014;14:6. DOI 10.1186/1471-2229-14-6.
- Limantseva L., Mironenko N., Shuvalov 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 Breeding.* 2014; 133:660-665. DOI 10.1111/pbr.12195.
- Liu Y., Lin-Wang K., Deng C., Warran B., Wang L., Yu B., Yang H., Wang J., Espley R.V., Zhang J., Wang D., Allan A.C. Comparative transcriptome analysis of white and purple potato to identify genes involved in anthocyanin biosynthesis. *PLoS ONE*. 2015;10(6):e0129148. DOI 10.1371/journal.pone.0129148.
- Martin A., Adam H., Díaz-Mendoza M., Zurczak M., González-Schain N.D., Suárez-López P. Graft-transmissible induction of potato tuberization by the microRNA miR172. *Development.* 2009; 136(17):2873-2881. DOI 10.1242/dev.031658.
- Massa A.N., Childs K.L., Lin H., Bryan G.J., Giuliano G., Buell C.R. The transcriptome of the reference potato genome *Solanum tuberosum* group phureja clone DM1-3 516R44. *PLoS ONE*. 2011;6(10):e26801. DOI 10.1371/journal.pone.0026801.
- Nowicki M., Foolad M.R., Nowakowska M., Kozik E.U. Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: An overview of pathology and resistance breeding. *Plant Disease.* 2012;96(1):4-17. Available at <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0458>.
- Petek M., Rotter A., Kogovšek P., Baebler Š., Mithöfer A., Gruden K. *Potato virus Y* infection hinders potato defence response and renders plants more vulnerable to Colorado potato beetle attack. *Mol. Ecol.* 2014;23(21):5378-5391. DOI 10.1111/mec.12932.
- Ramakrishnan A.P., Ritland C.E., 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.
- Rensink W.A., Lee Y., Liu J., Iobst S., Ouyang S., Buell C.R. Comparative analyses of six solanaceous transcriptomes reveal a high degree of sequence conservation and species-specific transcripts. *BMC Genomics.* 2005;6:124. DOI 10.1186/1471-2164-6-124.
- Rickert A.M., Kim J.H., Meyer S., Nagel A., Ballvora A., Oefner P.J., Gebhardt C. First generation SNP/InDel markers tagging loci for pathogen resistance in the potato genome. *Plant Biotechnol.* 2003;1: 399-410. DOI 10.1046/j.1467-7652.2003.00036.x.
- Rogozina E.V., Khavkin E.E., Sokolova E.A., Kuznetsova M.A., Gavrilenko T.A., Limantseva L.A., Biryukova V.A., Chalaja N.A.,

- Jones R.W., Deahl K.L. Clone collection of wild species and interspecific hybrids of potato studied phytopathologically and by means of DNA markers. *Trudy po prikladnoi botanike, genetike i selektsii*=Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 2013;174:23-32. (in Russian).
- Rogozina E.V., Shuvalov O.Yu., Antonova O.Yu., Gavrilenko T.A. Interspecific and intraspecific diversity on resistance to Y virus in potato. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya = Agricultural Biology*, 2012;5:64-69. DOI 10.15389/agrobiolgy.2012.5.64. (in Russian).
- Rosyara U.R., De Jong W.S., Douches D.S., Endelman J.B. Software for genome-wide association studies in autopolyploids and its application to potato. *Plant Genome*. 2016;9(2). DOI 10.3835/plantgenome2015.08.0073.
- Simko I., Haynes K.G., Jones R.W. Assessment of linkage disequilibrium in potato genome with single nucleotide polymorphism markers. *Genetics*. 2006;173(4):2237-2245. DOI 10.1534/genetics.106.060905.
- Slater A.T., Cogan N.O.I., Forster J.W. Cost analysis of the application of marker-assisted selection in potato breeding. *Mol. Breeding*. 2013;32(2):299-310. DOI 10.1007/s11032-013-9871-7.
- Slater A.T., Cogan N.O.I., Forster J.W., Hayes B.J., Daetwyler H.D. Improving genetic gain with genomic selection in autotetraploid potato. *Plant Genome*. 2016;9(3). DOI 10.3835/plantgenome2016.02.0021.
- SolCAP 2016. Available at http://solcap.msu.edu/potato_infinium.shtml. Доступ 08.10.2016.
- Stare T., Ramšak Ž., Blejec A., Stare K., Turnšek N., Weckwerth W., Wienkoop S., Vodnik D., Gruden K. Bimodal dynamics of primary metabolism-related responses in tolerant potato–*Potato virus Y* interaction. *BMC Genomics*. 2015;16(1):716. DOI 10.1186/s12864-015-1925-2.
- Szceśniak M.W., Makalowska I. miRNEST 2.0: a database of plant and animal microRNAs. *Nucl. Acids Res*. 2014;42:D74-D77. DOI <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1156>.
- The Potato Genome Sequencing Consortium. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*. 2011;475:189-195. DOI 10.1038/nature10158.
- The RNAcentral Consortium. RNAcentral: a comprehensive database of non-coding RNA sequences. *Nucl. Acids Res*. 2017;45(D1):D128-D134. DOI <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1008>.
- Uitdewilligen J.G.A.M.L., Wolters A.-M.A., D'hoop B.B., Borm T.J.A., Visser R.G.F., van Eck H.J. A next-generation sequencing method for genotyping-by-sequencing of highly heterozygous autotetraploid potato. *PLoS ONE*. 2013;8(5):e62355. DOI 10.1371/journal.pone.0062355.
- Van Os H., Andrzejewski S., Bakker E., Barrena I., Bryan G.J., Carmel B., Ghareeb B., Isidore E., de Jong W., van Koert P., Lefebvre V., Milbourne D., Ritter E., Rouppe van der Voort J.N.A.M., Rousselle-Bourgeois F., van Vliet J., Waugh R., Visser R.G.F., Bakker J., van Eck H.J. Construction of a 10,000-marker ultradense genetic recombination map of potato: providing a framework for accelerated gene isolation and a genomewide physical map. *Genetics*. 2006;173:1075-1087. DOI 10.1534/genetics.106.055871.
- Veilleux R.E., Boozé-Daniels J., Pehu E. Anther culture of a 2n pollen producing clone of *Solanum phureja* Juz. & Buk. *Can. J. Genet. Cytology*. 1985;27:559-564.
- Visser R.G.F., Bachem C.W.B., de Boer J.M., Bryan G.J., Chakrabarti S.K., Feingold S., Gromadka R., van Ham R.C.H.J., Huang S., Jacobs J.M.E., Kuznetsov B., de Melo P.E., Milbourne D., Orjeda G., Sagredo B., Tang X. Sequencing the potato genome: outline and first results to come from the elucidation of the sequence of the world's third most important food crop. *Am. J. Potato Res.* 2009;86:417-429. DOI 10.1007/s12230-009-9097-8.
- Wang S., Zhang S., Wang W., Xiong X., Meng F., Cui X. Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system. *Plant Cell Rep.* 2015;34(9):1473-1476. DOI 10.1007/s00299-015-1816-7.
- Zhang N., Yang J., Wang Z., Wen Y., Wang J., He W., Liu B., Si H., Wang D. Identification of novel and conserved microRNAs related to drought stress in potato by deep sequencing. *PLoS ONE*. 2014;9(4):e95489. DOI 10.1371/journal.pone.0095489.
- Zhang R., Marshall D., Bryan G.J., Hornyik C. Identification and characterization of miRNA transcriptome in potato by high-throughput sequencing. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e57233. DOI 10.1371/journal.pone.0057233.
- Zhang W., Luo Y., Gong X., Zeng W., Li S. Computational identification of 48 potato microRNAs and their targets. *Comput. Biol. Chem.* 2009;33(1):84-93. Available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2008.07.006>.
- Zuluaga P.A., Solé M., Lu H., Góngora-Castillo E., Vaillancourt B., Coll N., Buell C.R., Valls M. Transcriptome responses to *Ralstonia solanacearum* infection in the roots of the wild potato *Solanum comersonii*. *BMC Genomics*. 2015;16(1):246. DOI 10.1186/s12864-015-1460-1.

Сделать сложное проще: современный инструментарий для редактирования генома растений

Н.Е. Злобин, В.В. Терновой, Н.А. Гребенкина, В.В. Таранов 

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, Россия

Существует несколько технологий редактирования генома растений, из которых наиболее простой и универсальной является CRISPR/Cas. В настоящее время эта технология активно используется для нокаутирования генов, делеций участков генома и встраивания экзогенных последовательностей в растительный геном. Для каждого из этих приложений разработано множество вариантов генетического инструментария, которые использовались различными исследовательскими группами для решения конкретных задач. Технология CRISPR/Cas применительно к редактированию генома растений находится на начальном этапе оптимизации, выражающейся в поиске наиболее эффективных, простых и универсальных методик. Вследствие этого экспериментальная работа должна предваряться достаточно длительным и трудоемким выбором варианта генетического инструментария, оптимального для решения конкретной экспериментальной задачи. В данном обзоре мы охарактеризовали разработанные на сегодняшний день основные варианты генетического инструментария технологии CRISPR/Cas для редактирования генома растений с точки зрения решаемых экспериментальных задач, составляющих компонентов и эффективности применения. В первой части подробно рассмотрены основные элементы технологии CRISPR/Cas – нуклеаза и направляющая РНК, проанализировано влияние структурных особенностей этих элементов на эффективность редактирования. Обобщены экспериментальные данные о взаимосвязи между эффективностью редактирования и нуклеотидной последовательностью направляющей РНК. Охарактеризованы различные варианты нуклеаз, использовавшиеся при редактировании геномов растений, обсуждаются преимущества этих вариантов для решения определенных экспериментальных задач. Вторая часть обзора посвящена различным стратегиям экспрессии элементов системы CRISPR/Cas в растительных клетках, в частности преимуществам и недостаткам использования стабильной трансформации и транзientной экспрессии. Описывается влияние регуляторных элементов генов, кодирующих нуклеазу и направляющую РНК, на эффективность редактирования. Особый акцент сделан на способах повышения эффективности замещения целевых участков в геноме растений на экзогенные последовательности ДНК.

Ключевые слова: CRISPR/Cas; редактирование генома; генетическая инженерия растений; sgRNA.

Making complex things simpler: modern tools to edit the plant genome

N.E. Zlobin, V.V. Ternovoy, N.A. Grebenkina, V.V. Taranov 

All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

There are several technologies for plant genome editing, of which the most simple and universal is CRISPR/Cas. Currently, this technology is widely used for gene knockout, deleting genome fragments and inserting exogenous sequences in the plant genome. For each of these applications, many different types of genetic tools have been developed that are used by various research groups to solve specific problems. The CRISPR/Cas technology for plant genome editing is at an early stage of optimization, which is reflected by the ongoing search for the most effective, simple and flexible techniques. As a result, experimental work has to be preceded by a rather long and laborious process of selecting a genetic tool that will be optimal for a specific experimental task. In our review we describe the main variants of the CRISPR/Cas technology used to edit a plant genome. We classify them in terms of experimental tasks solved, major components and technology performance. In the first half of the review a detailed description of two major components of CRISPR/Cas technology – nuclease and guide RNA – is given, the effect of structural features of these elements on editing efficiency is analyzed. Experimental data on the relationship between editing efficiency and nucleotide sequence of guide RNA are generalized. We also give the characteristic for different variants of nucleases used for plant genome editing and discuss their benefits for different experimental purposes. In the second half of the review various strategies for expression of CRISPR/Cas elements in plant cells, in particular, advantages and disadvantages of stable transformation and transient expression, are discussed. The effect of various regulatory elements of genes encoding nuclease and guide RNA on editing efficiency is described. Special emphasis is placed on the techniques of increasing targeted gene replacement efficiency.

Key words: CRISPR/Cas; genome editing; plant genetic engineering; sgRNA.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Злобин Н.Е., Терновой В.В., Гребенкина Н.А., Таранов В.В. Сделать сложное проще: современный инструментарий для редактирования генома растений. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(1):104-111. DOI 10.18699/VJ17.228

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Zlobin N.E., Ternovoy V.V., Grebenkina N.A., Taranov V.V. Making complex things simpler: modern tools to edit the plant genome. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):104-111. DOI 10.18699/VJ17.228

В настоящее время существует три основные технологии направленного изменения генома: ZFN (zinc finger nuclease – нуклеазы с доменами «цинковые пальцы»), TALEN (transcription activator-like effector nucleases – эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции) и CRISPR/Cas (clustered regulatory interspaced short palindromic repeats – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами) (Чугунова и др., 2016). Из них наиболее простой, универсальной и одновременно эффективной является CRISPR/Cas. Данный метод основан на способности комплекса, состоящего из специфической sgRNA (single guide RNA – одиночная направляющая РНК) и бактериальной нуклеазы Cas9 (CRISPR associated – ассоциированный с CRISPR), вносить точечные двуцепочечные разрывы в участок генома, комплементарный последовательности sgRNA (рис. 1, а) (Савицкая и др., 2016). В клетках эукариот репарацию двуцепочечных разрывов обеспечивают два основных механизма – NHEJ (nonhomologous end joining – негомологичное воссоединение концов) и HDR (homology directed repair – репарация на основе гомологичной рекомбинации) (Jasin, Haber, 2016). При репарации по типу NHEJ в месте разрыва могут происходить инсерции или делеции небольшой длины – до нескольких десятков пар нуклеотидов. Если место разрыва приходится на кодирующую область гена, возможен сдвиг рамки считывания, приводящий к нокауту гена. Репарация двуцепочечных разрывов по механизму гомологичной рекомбинации приводит к восстановлению исходной последовательности в месте разрыва с использованием в качестве матрицы эндогенной гомологичной последовательности (например, гомологичной хромосомы) или экзогенной гомологичной последовательности ДНК. В последнем случае происходит замещение целевой последовательности в геноме (см. рис. 1, б) (Puchta, Fauser, 2014).

Технология CRISPR/Cas была разработана в 2012 г. и впервые применена на растительных объектах в 2013 г. Поиск в базе данных NCBI позволил установить, что к настоящему времени эта технология использована для редактирования генома тридцати видов растений, включая такие важнейшие сельскохозяйственные культуры, как рис, пшеница, кукуруза и картофель. Сейчас основной задачей применения технологии CRISPR/Cas является нокаутирование генов, однако эта технология также успешно применялась для встраивания экзогенных последовательностей в геном и делеции участков генома различной длины. Одно из основных преимуществ технологии CRISPR/Cas9 – возможность редактирования генома сразу по нескольким сайтам (локусам) за счет использования нескольких различных sgRNA (Lowder et al., 2015).

Эффективность технологии определяется рядом параметров: способом доставки генетического инструментария в растительную клетку, вариантом нуклеазы (Cas9 или ортологи), кодонным составом гена нуклеазы, промотором и терминатором генов нуклеазы и sgRNA, структурой sgRNA. В нашем обзоре охарактеризованы различные варианты генетического инструментария, применявшиеся для редактирования геномов растений.

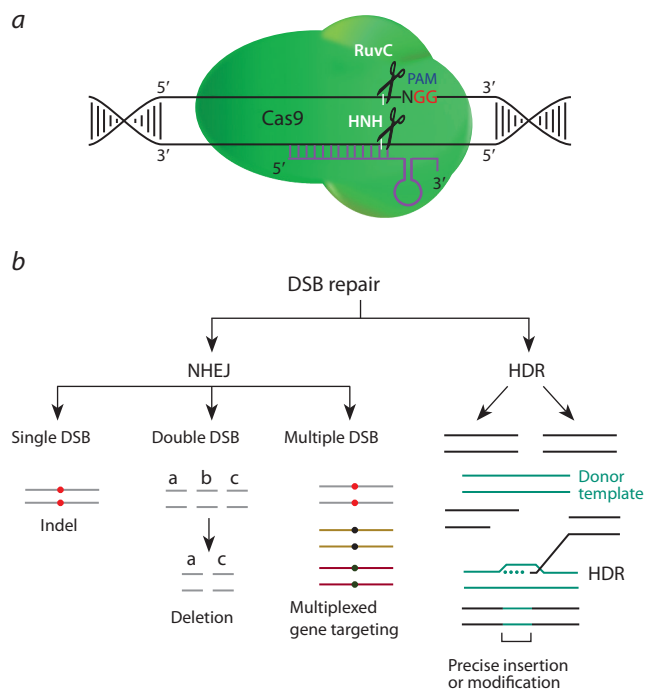


Fig. 1. CRISPR/Cas technology.

(a) The complex of Cas9 nuclease with sgRNA and genomic DNA. RuvC and HNH are Cas9 domains with nuclease activity. The PAM sequence NGG is required for the interaction of Cas9 with DNA. (b) Double-stranded breaks introduced by the Cas9-sgRNA complex are repaired by nonhomologous end joining (NHEJ) or homology-directed repair (HDR).

Структура sgRNA

Специфичность технологии CRISPR/Cas9 обеспечивается направляющей РНК – sgRNA, которая состоит из двух областей – константной, длиной около 70 нуклеотидов, и вариательной, длиной 17–25 нуклеотидов. Константная часть необходима для образования комплекса sgRNA с нуклеазой Cas9, вариательная – для специфичного связывания комплекса с целевой последовательностью в геноме (Jinek et al., 2012; Nishimasu et al., 2014). В геномной ДНК к 3'-концу участка, комплементарного sgRNA, должна примыкать так называемая последовательность PAM (protospacer adjacent motif – последовательность, примыкающая к протоспейсеру), необходимая для связывания комплекса Cas9-sgRNA с геномной ДНК. Последовательность PAM для нуклеазы Cas9 состоит из трех нуклеотидов, обычно NGG (Hsu et al., 2013; Mao et al., 2013). Фактически, наличие последовательности PAM – это единственное ограничение при выборе сайта для редактирования геномной ДНК с помощью технологии CRISPR/Cas. Анализ секвенированных геномов растений показал наличие хотя бы одного уникального сайта для редактирования в кодирующих областях не менее чем 90 % генов (Luo et al., 2016), за исключением кукурузы, в которой только 30 % генов содержат такой сайт (Xie et al., 2014).

Подбор sgRNA к уникальной последовательности в геноме обеспечивает высокую специфичность редактирования. Однако было показано, что комплекс Cas9-sgRNA

способен взаимодействовать и с другими нуклеотидными последовательностями в геноме, имеющими высокую гомологию с целевой последовательностью. Следствием этого взаимодействия являются нецелевые модификации генома – так называемый off-target эффект. Для взаимодействия комплекса Cas9-sgRNA с геномной ДНК наиболее критична комплементарность первых 12 нуклеотидов, примыкающих к последовательности PAM (Ding et al., 2016). Несовпадения в дистально расположенных нуклеотидах не всегда препятствуют взаимодействию комплекса Cas9-sgRNA с ДНК (Endo et al., 2014). Это требуется принимать во внимание при оценке потенциальной специфичности sgRNA. На культуре клеток человека было показано, что снижению уровня нецелевых модификаций может способствовать укорачивание варибельной последовательности sgRNA с 20 до 17–18 нуклеотидов (Fu et al., 2014).

Структура sgRNA оказывает влияние не только на специфичность, но и на эффективность редактирования. Образование варибельной частью вторичных структур может снижать эффективность редактирования (Ma et al., 2015). Обнаружена положительная корреляция между эффективностью редактирования и содержанием гуанина и цитозина в варибельной области sgRNA (Zhang et al., 2014; Ma et al., 2015). На примере *Danio rerio* было показано, что эффективность редактирования также зависит от нуклеотидного состава последовательности PAM: она выше при наличии цитозина на месте «N» в PAM NGG (Gagnon et al., 2014). В качестве последовательности PAM могут выступать мотивы NAG и NGA, однако эффективность редактирования при этом существенно снижается (Hsu et al., 2013; Mao et al., 2013).

Для дизайна sgRNA создан ряд биоинформатических приложений (Ding et al., 2016; Periwai, 2016). В наиболее простых алгоритмах при подборе целевого участка для sgRNA учитываются два параметра: уникальность участка в геноме и наличие примыкающей последовательности PAM. В более сложные алгоритмы включены дополнительные параметры, в частности GC-состав варибельного участка sgRNA, а также влияние последовательности варибельного участка на фолдинг sgRNA. В последнее время появились алгоритмы, использующие данные экспериментального сравнения эффективности различных sgRNA при редактировании генома животных (Labun et al., 2016). Биоинформатические приложения позволяют не только подобрать sgRNA, но и выявить для этой sgRNA вероятные сайты off-target эффекта (Periwai, 2016).

Вариант нуклеазы

В технологии CRISPR/Cas в качестве нуклеазы обычно используется Cas9 из *Streptococcus pyogenes* (SpCas9). В настоящее время открыто множество других бактериальных белков-ортологов Cas9 с аналогичными функциями (Fonfara et al., 2014). Белки-ортологи взаимодействуют с различными последовательностями PAM, что расширяет спектр возможных последовательностей-мишеней в геномной ДНК. Кроме того, использование белков с более длинными последовательностями PAM позволяет повысить специфичность редактирования. Для редактирования растительного генома применялись три ортолога SpCas9:

SaCas9 из *Staphylococcus aureus*, Blat Cas9 из *Brevibacillus laterosporus* и StCas9 из *Streptococcus thermophilus* (Karvelis et al., 2015; Steinert et al., 2015). Эти белки кодируются генами меньшего размера (соответственно 3.2, 3.3 и 3.4 вместо 4.2 т.п.н.), что облегчает создание генетических векторов и повышает эффективность трансфекции ими растительных клеток.

На основе нуклеазы Cas9 путем точечного мутагенеза был создан новый тип фермента для редактирования генома – никаза nCas9 (Mali et al., 2013). Комплекс, состоящий из nCas9 и sgRNA, вносит в ДНК не двунитевые, а однонитевые разрывы. В отличие от двунитевых разрывов, однонитевые («ники») репарируются в клетке с высокой точностью, что делает практически невозможной модификацию генома одиночным комплексом nCas9-sgRNA (Fauser et al., 2014). Для создания двунитевых разрывов с помощью никазы nCas9 требуется использовать две sgRNA, комплементарные близкорасположенным последовательностям нуклеотидов в обеих цепях ДНК. Комплекс nCas9 с первой sgRNA вносит разрыв в одну из цепей ДНК, комплекс со второй sgRNA вносит разрыв в комплементарную цепь в непосредственной близости от первого разрыва. При репарации полученного таким образом двунитевого разрыва обычно происходит делеция нуклеотидов, расположенных между сайтами связывания двух sgRNA (Schiml et al., 2014). Необходимость координированного функционирования двух комплексов nCas9 с различными sgRNA для внесения двунитевого разрыва в геномную ДНК существенно снижает уровень нецелевых модификаций (Mikami et al., 2016).

Все варианты белка Cas9, предназначенные для редактирования эукариотического генома, должны содержать сигнал ядерной локализации (nuclear localisation signal – NLS). В растениях повышенную активность демонстрировал вариант Cas9 с двумя сигналами ядерной локализации, расположенными на N- и C-конце белковой молекулы (Cong et al., 2013).

Донорная ДНК

Два основных компонента системы CRISPR – Cas и sgRNA – необходимы и достаточны для получения нокаут-мутаций, а также делеций участков генома различной длины. В случае, если требуется заменить эндогенную последовательность в геноме на экзогенную, необходим также третий компонент – донорная ДНК. Донорная ДНК содержит на 5'- и 3'-конце последовательности нуклеотидов, идентичные участкам геномной ДНК, фланкирующим область вставки (Jasin, Haber, 2016). Процесс встраивания последовательностей в геном основан на рекомбинации между участком генома и экзогенной молекулой ДНК. Было показано, что частота рекомбинации, обычно очень низкая, повышается на порядки при внесении разрыва в ДНК, что позволяет использовать технологию CRISPR/Cas для встраивания экзогенных последовательностей в геном (Puchta et al., 1993). Репарация на основе гомологичной рекомбинации может стимулироваться образованием не только двунитевого, но и однонитевого разрывов в геномной ДНК; установлено, что для стимуляции этого пути репарации никаза nCas9 может быть не менее эффективна, чем нуклеаза Cas9, при

меньшем уровне нецелевых модификаций (Fauser et al., 2014). Для повышения частоты репарации по механизму гомологичной рекомбинации в растительной клетке также может применяться ингибирование экспрессии генов, продукты которых вовлечены в процесс репарации путем нехомологичного воссоединения концов (Qi et al., 2013).

Стабильная трансформация растительных клеток компонентами системы CRISPR/Cas

Для получения растений с отредактированным геномом требуется взаимодействие комплексов Cas9-sgRNA с геномной ДНК. Наиболее распространенный метод доставки компонентов системы CRISPR/Cas – стабильная трансформация Т-ДНК, содержащей гены Cas и sgRNA. В настоящее время существует два основных метода трансформации растений: биобаллистика и агробактериальная трансформация. Метод биобаллистики применялся при редактировании генома ряда сельскохозяйственных культур – пшеницы, риса, кукурузы, сои (Shan et al., 2013; Wang et al., 2014; Li et al., 2015; Svitashv et al., 2015). В качестве объектов трансформации использовались незрелые зародыши или каллусная ткань. Гены, кодирующие Cas9 и sgRNA, могли находиться в составе одного генетического вектора или содержаться в двух разных векторах (Li et al., 2015; Svitashv et al., 2015).

Наиболее часто для доставки компонентов системы CRISPR/Cas в растительные клетки применяется агробактериальная трансформация генетическими конструкциями, несущими гены Cas9 и sgRNA в области Т-ДНК. С применением такого подхода удалось добиться высокой эффективности получения нокаут-мутантов (Miao et al., 2013).

Одним из основных факторов, влияющих на эффективность редактирования, является уровень экспрессии Cas9 и sgRNA в клетке (Ma et al., 2015; Mikami et al., 2015b). В подавляющем большинстве работ по редактированию геномов различных видов растений применялись стандартные «сильные» конститутивные промоторы, способные обеспечить высокий уровень экспрессии белка Cas9 в растительной клетке. К недостаткам использования конститутивных промоторов относятся высокая вероятность получения химерных растений, содержащих различные варианты модификации целевой последовательности в геноме, а также низкая эффективность передачи модификации в последующее поколение при семенном размножении (Fauser et al., 2014). Кроме того, с использованием конститутивного промотора для гена Cas9 обычно не удавалось добиться высокой эффективности редактирования при трансформации растений методом погружения соцветий, что, по всей вероятности, объясняется малой активностью этих промоторов в зародышевых тканях (Luo et al., 2016). Эта проблема была решена применением тканеспецифичных промоторов, обеспечивающих высокий уровень экспрессии Cas9 в зародышевых клетках (рис. 2) (Hyun et al., 2015; Wang et al., 2015; Yan et al., 2015; Mao et al., 2016). Использование таких промоторов позволяет получать отредактированные растения в первом поколении трансгенных растений. Помимо промотора, существенное влияние на эффективность редактирования могут оказывать и другие функциональные области гена, кодирующего

Cas9: 5'-нетранслируемая область и терминатор (Ma et al., 2015; Wang et al., 2015).

Еще одним способом повышения эффективности функционирования системы CRISPR/Cas в растительных клетках является оптимизация кодонного состава гена, кодирующего нуклеазу Cas9. К настоящему времени создано несколько различных вариантов гена Cas9, оптимизированного для экспрессии в клетках арабидопсиса, табака, риса, однодольных, двудольных, а также растений в целом (Baltes et al., 2014; Schaeffer, Nakata, 2016; Song et al., 2016). В большинстве исследований оптимизация кодонного состава показала себя достаточно эффективным средством повышения уровня экспрессии Cas9 и увеличения эффективности редактирования, хотя некоторыми исследовательскими группами получены экспериментальные данные, свидетельствующие об обратном (Johnson et al., 2015).

В целях повышения эффективности редактирования оптимизации подвергалась экспрессия не только Cas9, но и sgRNA. В настоящий момент для экспрессии sgRNA чаще всего используются промоторы типа U3 и U6 для РНК-полимеразы III (RNAPol III), обеспечивающие высокую экспрессию малых РНК в различных растительных тканях. Молекулы РНК, транскрибирующиеся с промотора U3, должны содержать на 5'-конце аденин, с промотора U6 – гуанин, что надо учитывать при дизайне sgRNA. Добавление соответствующего нуклеотида (А или Г) на 5'-конец sgRNA не оказывает негативного влияния на эффективность редактирования (Xie, Yang, 2013). В исследовании, проведенном на рисе, была показана большая эффективность промотора OsU6 по сравнению с OsU3, однако систематического сравнительного анализа эффективности промоторов U3 и U6 применительно к геномному редактированию растений не проводилось (Mikami et al., 2015a). Обычно для экспрессии sgRNA применяются собственные промоторы U3 и U6 растения – объекта редактирования; использование гетерологичных промоторов из других видов растений может сопровождаться снижением эффективности редактирования (Jiang et al., 2013; Sun et al., 2015).

Редактирование генома растений посредством стабильной интеграции генов Cas9 и sgRNA в геномную ДНК имеет два основных недостатка. Для получения нетрансгенных растений с отредактированным геномом, несущих необходимые модификации и не содержащих вставок Т-ДНК, необходимо проводить отбор в последующих поколениях (Schiml et al., 2014). В то же время получение сортов культурных растений с отредактированным геномом требует удаления области Т-ДНК, поскольку постоянное функционирование системы CRISPR/Cas в растительных клетках приведет к накоплению нецелевых мутаций, которые могут оказать негативное влияние на формирование хозяйственно ценных признаков. Это увеличивает длительность и трудоемкость экспериментальной работы; кроме того, такой прием нецелесообразен для вегетативно размножаемых культурных растений, в частности картофеля, вследствие потери сортовых качеств при семенном размножении.

Вторым недостатком является сложность применения этого подхода для замещения участков геномной ДНК на

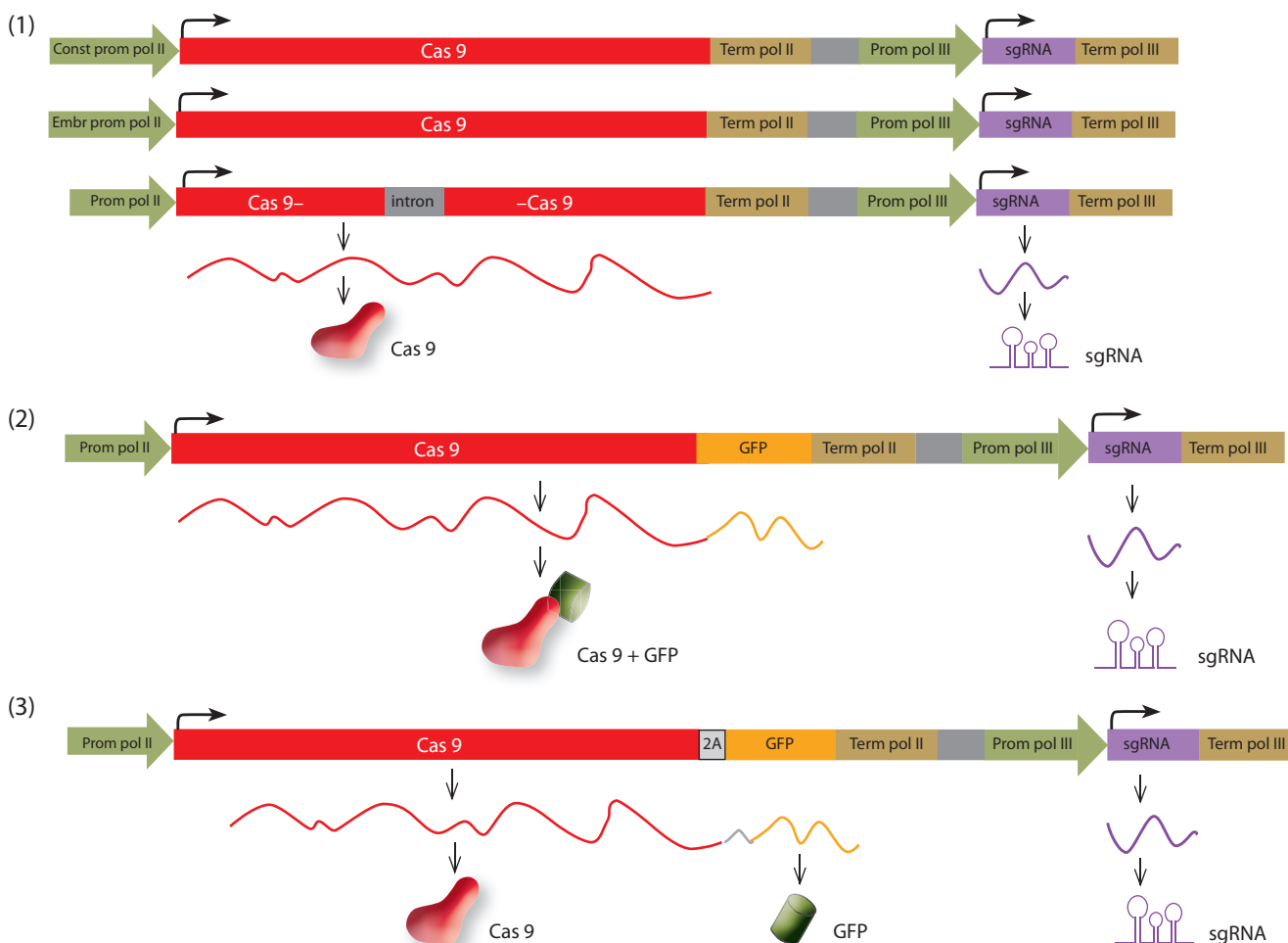


Fig. 2. Genetic tools for plant genome editing.

Prom pol II is the promoter for RNA polymerase II (const, constitutive; embr, expressing in embryo cells); Term pol II is the terminator for RNA polymerase II; Prom pol III, promoter for RNA polymerase III; Term pol III, terminator for RNA polymerase III; 2A, ribosome skipping sequence.

экзогенные последовательности (gene replacement). Было показано, что последовательность донорной ДНК может быть включена в состав Т-ДНК генетического вектора для агробактериальной трансформации растений (Fauser et al., 2012), однако эффективность получения растений со вставкой экзогенной ДНК в геном при этом невысока, что, вероятно, объясняется малой копийностью донорной ДНК в ядре клетки (Schiml et al., 2014; Čermák et al., 2015; Paul, Qi, 2016). Частично эта проблема может быть разрешена путем доставки донорной ДНК с помощью биобаллистики (Sun et al., 2016). Для повышения копийности донорная ДНК может также быть встроена в самореплицирующийся вектор на основе геномной ДНК джеминивирuсов (*Geminiviridae*). Повышение эффективности редактирования при использовании такого подхода продемонстрировано, в частности, на табаке, томате и картофеле (Baltes et al., 2014; Čermák et al., 2015; Butler et al., 2016).

Транзиентная экспрессия компонентов CRISPR/Cas в растительной клетке

Альтернативой стабильной трансформации является транзиентная экспрессия элементов системы CRISPR/Cas

в растительных клетках. Именно с помощью транзиентной экспрессии была впервые показана возможность редактирования генома растений с помощью технологии CRISPR/Cas (Li et al., 2013; Shan et al., 2013; Xie et al., 2013). Гены, кодирующие Cas9 и sgRNA, могут быть встроены в векторы для транзиентной экспрессии и доставлены в ядро растительной клетки с помощью биобаллистики, агроинфильтрации или трансфекции протопластов (Li et al., 2013; Shan et al., 2013). Данные многочисленных исследований демонстрируют высокую эффективность этого подхода для редактирования генома в различных видах растений. Использование вышеперечисленных методов трансфекции позволяет эффективно доставлять в растительную клетку не только генетические конструкции, кодирующие Cas9 и sgRNA, но и высокие концентрации донорной ДНК в составе плазмид или в виде линейных молекул (Li et al., 2015; Svitashv et al., 2015). Таким образом, транзиентная экспрессия компонентов технологии CRISPR/Cas в растительных клетках — высокоэффективное средство как получения нокаут-мутаций, так и встраивания экзогенных последовательностей в растительный геном. Кроме того, этот подход позволяет

относительно быстро и просто оценить эффективность различных вариантов генетического инструментария для редактирования генома растений, что не только облегчает подбор оптимального инструментария для выполнения конкретной экспериментальной задачи, но и способствует оптимизации технологии CRISPR/Cas в целом.

Трансфекция протопластов генетическими векторами для транзистентной экспрессии используется наиболее часто благодаря своей универсальности и относительной простоте применения. Гены, кодирующие Cas9 и sgRNA, могут как входить в состав одного вектора, так и находиться в двух разных векторах (Li et al., 2013; Xing et al., 2014). Преимуществом второго подхода является большая эффективность трансфекции протопластов плазмидной ДНК меньшего размера; с другой стороны, необходимость котрансфекции индивидуального протопласта генетическими конструкциями обоих типов ведет к снижению эффективности редактирования.

Очевидно, что эффективность редактирования повышается с увеличением доли трансфицированных протопластов, которая может существенно варьировать от эксперимента к эксперименту. Для контроля эффективности трансфекции протопластов обычно применяются генетические конструкции, кодирующие репортерные флуоресцентные белки. Было показано, что Cas9, находящийся в составе химерного белка с GFP, сохраняет свою активность (Nekrasov et al., 2013). Использование генетических конструкций, содержащих химерный ген Cas9+GFP, делает возможным контроль эффективности трансфекции в каждом эксперименте. Между Cas9 и GFP может быть размещена последовательность 2A, которая при трансляции химерной мРНК приводит к «проскакиванию» рибосомы (ribosome skipping) и образованию двух независимых белков (см. рис. 2) (Osakabe et al., 2016).

Из протопластов могут быть регенерированы растения с отредактированным геномом. В частности, таким способом был получен картофель с повышенным содержанием амилопектина в крахмале (Andersson et al., 2016). Этот подход особенно перспективен для создания новых сортов картофеля, поскольку позволяет получать растения с отредактированным геномом без вставок Т-ДНК.

Заключение

Относительная простота и низкая себестоимость технологии CRISPR/Cas сделали геномное редактирование доступным для широкого круга исследователей, владеющих базовыми методами генетической инженерии растений. Технология CRISPR/Cas в настоящее время активно развивается, что выражается не только в постоянном повышении ее эффективности, но и в разработке новых приложений этой технологии, выходящих за рамки редактирования генома. В частности, создание трансгенных растений, экспрессирующих Cas и sgRNA, комплементарную определенному участку в геноме патогена, является принципиально новой перспективной стратегией повышения устойчивости сельскохозяйственных культур к биотическим стрессам (Zaidi et al., 2016). Варианты Cas с точковыми мутациями, нарушающими нуклеазную активность, могут быть использованы для регуляции экспрессии генов, а также прижизненного окрашивания

целевых участков геномной ДНК (Bortesi, Fischer, 2015; Paul, Qi, 2016). Разработка эффективных вариантов генетического инструментария для решения различных задач позволит ускорить реализацию потенциала технологии CRISPR/Cas, превратив ее в один из базовых инструментов биологии и биотехнологии растений.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Reference

- Andersson M., Turesson H., Nicolai A., Fält A.S., Samuelsson M., Hofvander P. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Reports*. 2016;1-12. DOI 10.1007/s00299-016-2062-3.
- Baltes N.J., Gil-Humanes J., Cermak T., Atkins P.A., Voytas D.F. DNA replicons for plant genome engineering. *Plant Cell*. 2014;26(1):151-163. DOI 10.1105/tpc.113.119792.
- Bortesi L., Fischer R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol. Advances*. 2015;33(1):41-52. DOI 10.1016/j.biotechadv.2014.12.006.
- Butler N.M., Baltes N.J., Voytas D.F., Douches D.S. Geminivirus-mediated genome editing in potato (*Solanum tuberosum* L.) using sequence-specific nucleases. *Front. Plant Sci*. 2016;7:1045. DOI 10.3389/fpls.2016.01045.
- Čermák T., Baltes N.J., Čegan R., Zhang Y., Voytas D.F. High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biology*. 2015;16(1):1. DOI 10.1186/s13059-015-0796-9.
- Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339(6121):819-823. DOI 10.1126/science.1231143.
- Chugunova A.A., Dontsova O.A., Sergiev P.V. Methods of genome engineering: a new era of molecular biology. *Biomeditsinskaya Khimiya = Biomedical Chemistry (Moscow)*. 2016;81(7):662-677. DOI 10.1134/S0006297916070038. (in Russian)
- Ding Y., Li H., Chen L.L., Xie K. Recent advances in genome editing using CRISPR/Cas9. *Front. Plant Sci*. 2016;7:703. DOI 10.3389/fpls.2016.00703.
- Endo M., Mikami M., Toki S. Multi-gene knockout utilizing off-target mutations of the CRISPR/Cas9 system in rice. *Plant Cell Physiol*. 2014;56(1):41-47. DOI 10.1093/pcp/pcu154.
- Fausser F., Roth N., Pacher M., Ilg G., Sánchez-Fernández R., Biesgen C., Puchta H. In planta gene targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012;109(19):7535-7540. DOI 10.1073/pnas.1202191109.
- Fausser F., Schiml S., Puchta H. Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 2014;79(2):348-359. DOI 10.1111/tpj.12554.
- Fonfara I., Le Rhun A., Chylinski K., Makarova K.S., Lécrivain A.L., Bzdrenga J., Koonin E.V., Charpentier E. Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. *Nucl. Acids Res*. 2014;42(4):2577-2590. DOI 10.1093/nar/gkt1074.
- Fu Y., Sander J.D., Reyon D., Cascio V.M., Joung J.K. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature Biotechnol*. 2014;32(3):279-284. DOI 10.1038/nbt.2808.
- Gagnon J.A., Valen E., Thyme S.B., Huang P., Ahkmetova L., Pauli A., Montague T.G., Zimmerman S., Richter C., Schier A.F. Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide RNAs. *PLoS ONE*. 2014;9(5):e98186. DOI 10.1371/journal.pone.0098186.
- Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., Ran F.A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E.J., Wu X., Shalem O., Cradick T.J., Marraffini L.A., Bao G., Zhang F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnol*. 2013;31(9):827-832. DOI 10.1038/nbt.2647.

- Hyun Y., Kim J., Cho S.W., Choi Y., Kim J.S., Coupland G. Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using dividing tissue-targeted RGEN of the CRISPR/Cas system to generate heritable null alleles. *Planta*. 2015;241(1):271-284. DOI 10.1007/s00425-014-2180-5.
- Jasin M., Haber J.E. The democratization of gene editing: Insights from site-specific cleavage and double-strand break repair. *DNA Repair*. 2016;44:6-16. DOI 10.1016/j.dnarep.2016.05.001.
- Jiang W., Zhou H., Bi H., Fromm M., Yang B., Weeks D.P. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucl. Acids Res.* 2013; 41(20):e188. DOI 10.1093/nar/gkt780.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-821. DOI 10.1126/science.1225829.
- Johnson R.A., Gurevich V., Filler S., Samach A., Levy A.A. Comparative assessments of CRISPR-Cas nucleases' cleavage efficiency in planta. *Plant Mol. Biol.* 2015;87(1-2):143-156. DOI 10.1126/science.1225829.
- Karvelis T., Gasiunas G., Young J., Bigelyte G., Silanskas A., Cigan M., Siksnys V. Rapid characterization of CRISPR-Cas9 protospacer adjacent motif sequence elements. *Genome Biol.* 2015;16(1):1. DOI 10.1186/s13059-015-0818-7.
- Labun K., Montague T.G., Gagnon J.A., Thyme S.B., Valen E. CHOP-CHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucl. Acids Res.* 2016;44(W1):W272-6. DOI 10.1093/nar/gkw398.
- Li J.F., Norville J.E., Aach J., McCormack M., Zhang D., Bush J., Church G.M., Sheen J. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnol.* 2013;31(8):688-691. DOI 10.1038/nbt.2654.
- Li Z., Liu Z.B., Xing A., Moon B.P., Koellhoffer J.P., Huang L., Ward R.T., Clifton E., Falco S.C., Cigan A.M. Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiol.* 2015;169(2):960-970. DOI 10.1104/pp.15.00783.
- Lowder L.G., Zhang D., Baltes N.J., Paul III J.W., Tang X., Zheng X., Voytas D.F., Hsieh T.-F., Zhang Y., Qi Y. A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation. *Plant Physiol.* 2015;169(2):971-985. DOI 10.1104/pp.15.00636.
- Luo M., Gilbert B., Ayliffe M. Applications of CRISPR/Cas9 technology for targeted mutagenesis, gene replacement and stacking of genes in higher plants. *Plant Cell Reports*. 2016;35:1-12. DOI 10.1007/s00299-016-1989-8.
- Ma X., Zhang Q., Zhu Q., Liu W., Chen Y., Qiu R., Wang B., Yang Z., Li H., Lin Y., Xie Y., Shen R., Chen S., Wang Z., Chen Y., Guo J., Chen L., Zhao X., Dong Z., Liu Y.G. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol. Plant*. 2015;8(8):1274-1284. DOI 10.1016/j.molp.2015.04.007.
- Mali P., Aach J., Stranges P.B., Esvelt K.M., Moosburner M., Kosuri S., Yang L., Church G.M. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nature Biotechnol.* 2013;31(9):833-838. DOI 10.1038/nbt.2675.
- Mao Y., Zhang H., Xu N., Zhang B., Gou F., Zhu J.K. Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants. *Mol. Plant*. 2013;6(6):2008-2011. DOI 10.1093/mp/sst121.
- Mao Y., Zhang Z., Feng Z., Wei P., Zhang H., Botella J.R., Zhu J.K. Development of germ-line-specific CRISPR-Cas9 systems to improve the production of heritable gene modifications in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol. J.* 2016;14(2):519-532. DOI 10.1111/pbi.12468.
- Miao J., Guo D., Zhang J., Huang Q., Qin G., Zhang X., Wan J., Gu H., Qu L.J. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Research*. 2013;23(10):1233-1236. DOI 10.1038/cr.2013.123.
- Mikami M., Toki S., Endo M. Comparison of CRISPR/Cas9 expression constructs for efficient targeted mutagenesis in rice. *Plant Mol. Biol.* 2015a;88(6):561-572. DOI 10.1007/s11103-015-0342-x.
- Mikami M., Toki S., Endo M. Parameters affecting frequency of CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis in rice. *Plant Cell Reports*. 2015b;34(10):1807-1815. DOI 10.1007/s00299-015-1826-5.
- Mikami M., Toki S., Endo M. Precision targeted mutagenesis via Cas9 paired nickases in rice. *Plant Cell Physiol.* 2016;57(5):1058-1068. DOI 10.1093/pcp/pcw049.
- Nekrasov V., Staskawicz B., Weigel D., Jones J.D., Kamoun S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnol.* 2013;31(8):691-693. DOI 10.1038/nbt.2655.
- Nishimasu H., Ran F.A., Hsu P.D., Konermann S., Shehata S.I., Dohmae N., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. 2014;156(5):935-949. DOI 10.1016/j.cell.2014.02.001.
- Osakabe Y., Watanabe T., Sugano S.S., Ueta R., Ishihara R., Shinozaki K., Osakabe K. Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing to modify abiotic stress responses in plants. *Sci. Reports*. 2016;6:26685. DOI 10.1038/srep26685.
- Paul III J.W., Qi Y. CRISPR/Cas9 for plant genome editing: accomplishments, problems and prospects. *Plant Cell Reports*. 2016;1-11. DOI 10.1007/s00299-016-1985-z.
- Periwal V. A comprehensive overview of computational resources to aid in precision genome editing with engineered nucleases. *Brief. Bioinform.* 2016;1-14. DOI 10.1093/bib/bbw052.
- Puchta H., Dujon B., Hohn B. Homologous recombination in plant cells is enhanced by *in vivo* induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucl. Acids Res.* 1993;21(22):5034-5040. DOI 10.1093/nar/21.22.5034.
- Puchta H., Fauser F. Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future. *Plant J.* 2014;78(5):727-741. DOI 10.1111/tpj.12338.
- Qi Y., Zhang Y., Zhang F., Baller J.A., Cleland S.C., Ryu Y., Starkner C.G., Voytas D.F. Increasing frequencies of site-specific mutagenesis and gene targeting in *Arabidopsis* by manipulating DNA repair pathways. *Genome Res.* 2013;23(3):547-554. DOI 10.1101/gr.145557.112.
- Savitskaya E.E., Musharova O.S., Severinov K.V. Diversity of CRISPR-Cas-mediated mechanisms of adaptive immunity in prokaryotes and their application in biotechnology. *Biomeditsinskaya Khimiya = Biomedical Chemistry (Moscow)*. 2016;81(7):653-661. DOI 10.1134/S0006297916070026. (in Russian)
- Schaeffer S.M., Nakata P.A. The expanding footprint of CRISPR/Cas9 in the plant sciences. *Plant Cell Reports*. 2016;35(7):1451-1468. DOI 10.1007/s00299-016-1987-x.
- Schimpl S., Fauser F., Puchta H. The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for *in planta* gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in *Arabidopsis* resulting in heritable progeny. *Plant J.* 2014;80(6):1139-1150. DOI 10.1111/tpj.12704.
- Shan Q., Wang Y., Li J., Zhang Y., Chen K., Liang Z., Zhang K., Liu J., Xi J.J., Qiu J.L., Gao C. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnol.* 2013;31(8):686-688. DOI 10.1038/nbt.2650.
- Song G., Jia M., Chen R., Kong X., Khattak B., Xie C., Li A., Mao L. CRISPR/Cas9: A powerful tool for crop genome editing. *Crop J.* 2016;4(2):75-82. DOI 10.1016/j.cj.2015.12.002.
- Steinert J., Schimpl S., Fauser F., Puchta H. Highly efficient heritable plant genome engineering using Cas9 orthologues from *Streptococcus thermophilus* and *Staphylococcus aureus*. *Plant J.* 2015;84(6):1295-1305. DOI 10.1111/tpj.13078.
- Sun X., Hu Z., Chen R., Song G., Zhang H., Xi Y. Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system. *Sci. Reports*. 2015;5:10342. DOI 10.1038/srep10342.
- Sun Y., Zhang X., Wu C., He Y., Ma Y., Hou H., Guo X., Du W., Zhao Y., Xia L. Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. *Mol. Plant*. 2016;9(4):628-631. DOI 10.1016/j.molp.2016.01.001.
- Svitashev S., Young J.K., Schwartz C., Gao H., Falco S.C., Cigan A.M. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene

- insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant Physiol.* 2015; 169(2):931-945. DOI 10.1104/pp.15.00793.
- Wang Y., Cheng X., Shan Q., Zhang Y., Liu J., Gao C., Qiu J.L. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnol.* 2014;32(9):947-951. DOI 10.1038/nbt.2969.
- Wang Z.P., Xing H.L., Dong L., Zhang H.Y., Han C.Y., Wang X.C., Chen Q.J. Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation. *Genome Biol.* 2015;16(1):144. DOI 10.1186/s13059-015-0715-0.
- Xie K., Yang Y. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol. Plant.* 2013;6(6):1975-1983. DOI 10.1093/mp/sst119.
- Xie K., Zhang J., Yang Y. Genome-wide prediction of highly specific guide RNA spacers for CRISPR-Cas9-mediated genome editing in model plants and major crops. *Mol. Plant.* 2014;7(5):923-926. DOI 10.1093/mp/ssu009.
- Xing H.L., Dong L., Wang Z.P., Zhang H.Y., Han C.Y., Liu B., Wang X.C., Chen Q.J. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol.* 2014;14(1):1. DOI 10.1186/s12870-014-0327-y.
- Yan L., Wei S., Wu Y., Hu R., Li H., Yang W., Xie Q. High-efficiency genome editing in *Arabidopsis* using *YAO* promoter-driven CRISPR/Cas9 system. *Mol. Plant.* 2015;8(12):1820-1823. DOI 10.1016/j.molp.2015.10.004.
- Zaidi S.S.E.A., Mansoor S., Ali Z., Tashkandi M., Mahfouz M.M. Engineering plants for geminivirus resistance with CRISPR/Cas9 system. *Trends Plant Sci.* 2016;21(4):279-281. DOI 10.1016/j.tplants.2016.01.023.
- Zhang H., Zhang J., Wei P., Zhang B., Gou F., Feng Z., Mao Y., Yang L., Zhang H., Xu N., Zhu J.K. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol. J.* 2014;12(6):797-807. DOI 10.1111/pbi.12200.

Перспективы метаболомных исследований растений картофеля

Р.К. Пузанский^{1, 2}, В.В. Емельянов², Т.А. Гавриленко^{1, 2}, М.Ф. Шишова^{1, 2} 

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова» (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

По данным FAO, картофель представляет собой четвертую по объемам производства продовольственную культуру после риса, пшеницы, кукурузы и первую среди клубнеплодных и корнеплодных культур. Он служит ценным источником углеводов, антиоксидантов и витаминов. Огромное число работ сфокусировано на изучении метаболических процессов, происходящих в растениях картофеля, с тем чтобы расшифровать механизмы, отвечающие за продуктивность и накопление соединений, определяющих вкусовые и питательные качества, продолжительность периода покоя клубней, устойчивость растений и др. Результатом функционирования метаболических сетей является совокупность метаболитов, которую принято называть метаболомом. Комплексные исследования метаболического разнообразия с применением самых современных методов хроматографического анализа и детекции индивидуальных соединений выявили специфичность метаболомных спектров от субклеточного до организменного уровня, удивительную пластичность этих спектров при действии самых разнообразных факторов среды и внутренних стимулов. Уже сейчас метаболомные методы используют для фенотипирования линий, сортов и образцов диких и культурных видов картофеля, для изучения устойчивости растений к факторам окружающей среды и оценки изменений, происходящих в клубнях в процессе хранения. Метаболомный анализ активно применяется для изучения отличий генетически модифицированных форм картофеля от исходных растений. Даже небольшое число системных исследований, проведенных к настоящему времени и сочетающих оценку метаболома с изучением генома, транскриптома и протеома, указывает на значимую роль генетических факторов в определении интенсивности метаболизма растений картофеля. Очевидно, что поиск биохимических маркеров зависит от стандартизации методов выращивания, пробоподготовки и последующего анализа, от тех унифицирующих подходов, которые позволили достичь огромного прогресса в геномных и транскриптомных исследованиях. В перспективе анализ метаболома картофеля может дополнить традиционные и молекулярно-генетические методы селекции, направленные на создание новых гибридов, доноров ценных признаков, инбредных линий и сортов.

Ключевые слова: картофель; метаболомика; системная биология; селекция.

The perspectives of metabolomics studies of potato plants

R.K. Puzanskiy^{1, 2}, V.V. Yemelyanov²,
T.A. Gavrilenko^{1, 2}, M.F. Shishova^{1, 2} 

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

² St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

According to FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nation), potato is the fourth crop in terms of food production after rice, wheat and maize, and the first among the tubers and roots. The importance of potato is difficult to overestimate; it is a valuable source of carbohydrates, antioxidants and vitamins. A huge number of investigations are focused on the study of metabolic processes occurring in the potato plant in order to elucidate the mechanisms responsible for productivity and accumulation of compounds that determine taste and nutritional quality, keeping quality of tubers, plant resistance, etc. The sum of metabolites, which is produced as a result of metabolic network activity, is defined as metabolome. Complex studies of metabolic diversity with the use of modern state-of-the-art chromatography approaches and highly precise detection of individual compounds revealed specificity of metabolic spectra from sub-cellular to organism levels and its amazing plasticity under the influence of a variety of internal and external stimuli. Metabolomic approaches are already in use for phenotyping available species, lines and varieties as well as for evaluation of potato plant resistance to environmental challenges and for detection of changes in tubers during storage. Metabolome profiling is widely employed to study differences between genetically modified forms of potatoes from untransformed relatives. A limited number of systemic studies on potatoes combines metabolome investigation with genome, transcriptome and proteome analysis and suggests an important role of the genome in the determination of metabolic rates. It is obvious that the search for biochemical markers depends on standardization of cultivation techniques, sample preparation and subsequent analysis similar to what has been developed for progress in genomic and transcriptomic studies. In the future, potato metabolome studies might complete classical and molecular approaches to develop new lines and varieties.

Key words: potato; metabolomics; system biology; breeding.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Пузанский Р.К., Емельянов В.В., Гавриленко Т.А., Шишова М.Ф. Перспективы метаболомных исследований растений картофеля. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(1):112-123. DOI 10.18699/VJ17.229

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Puzanskiy R.K., Yemelyanov V.V., Gavrilenko T.A., Shishova M.F. The perspectives of metabolomics studies of potato plants. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):112-123. DOI 10.18699/VJ17.229

В числе ста наиболее актуальных для общества вопросов биологии растений, сформулированных учеными, работниками сельского хозяйства и прессы, можно выделить и такие, в решении которых важную роль будет играть метаболомика (Grierson et al., 2011). Первая группа вопросов связана с созданием растений-продуцентов, разработкой методов кардинального повышения продуктивности растений и выявлением различий между генно-модифицированными и обычными сортами растений. Вторая нацелена на раскрытие механизмов взаимодействия растений с окружающей средой и с другими организмами. Третья группа проблем связана с изучением и сохранением биоразнообразия растений (Grierson et al., 2011). В последние годы появляется все больше исследований по перечисленным выше направлениям, которые выполняются не на модельных объектах (например, арабидопсисе), а с использованием генетических ресурсов культурных растений (пшеницы, риса, картофеля, гороха, кукурузы и др.). Накопленные данные свидетельствуют о метаболических перестройках, происходящих в растениях в ходе развития, а также при действии биотических и абиотических факторов и т. д. В ряде работ продемонстрирована значимая роль межвидовых и межсортных различий в качественных и количественных изменениях состава метаболитов. В связи с этим актуальность метаболомных исследований постоянно возрастает.

Методы анализа метаболитного состава, основанные на хроматографии, стали применяться в клинических исследованиях еще в 1960–1970-х гг. (Dalglish et al., 1966; Horning E., Horning M., 1971; Pauling et al., 1971). Но только в 1990-е гг. были разработаны методы на основе экстракции, силилирования и газовой хроматографии, применимые для изучения растений (Sauter et al., 1991). С развитием системного подхода в биологии по аналогии с терминами «геном» и «протеом» в 1998 г. был предложен термин «метаболом» для обозначения совокупности всех метаболитов биологической системы (Oliver et al., 1998; Tweeddale et al., 1998). Практически одновременно появился термин «метаболическое профилирование» для обозначения методов, позволяющих проанализировать большой спектр метаболитов в одной пробе (Trethewey et al., 1999). С 2000 г. начался экспоненциальный рост исследований, направленных на изучение метаболома растений (Fiehn et al., 2000).

В настоящее время существует широкий выбор технологических платформ, применяемых для метаболомных исследований. Наиболее распространенным методом детекции является масс-спектрометрия, в том числе квадрупольные масс-селективные детекторы и время-пролётные масс-анализаторы. Детекторы могут быть сопряжены с системами разделения метаболитов, в том числе с газовой хроматографией (ГХ-МС, или GC-MS), высокопроизводительной жидкостной хроматографией (ЖК-МС, HPLC-MS), ультрапроизводительной жидкостной хроматографией (УВЖХ-МС, UPLC-MS), капиллярным электрофорезом (КЭ-МС, CE-MS). Реже применяется масс-анализатор ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (МА-ИЦР-МС, FT-ICR-MS) и спектроскопией ядерного магнитного резонанса (ЯМР, NMR).

Значимость результатов, получаемых с использованием этих методов, определяется прежде всего тем, что они позволяют охарактеризовать динамические преобразования в растениях от организменного до клеточного уровня, а также тем, что метаболом можно рассматривать в качестве конечного звена последовательных изменений транскриптома и протеома (Shepherd et al., 2011; Carrero-Quintero et al., 2013; Wolfender et al., 2013; Пузанский и др., 2015; Boughton et al., 2016). К настоящему времени уже созданы многочисленные базы данных, в которых аккумулированы результаты самых разных масс-спектрометрических и хроматографических исследований, необходимых для идентификации метаболитов (Frank, Engel, 2013; Fukushima, Engel, 2013). Интерпретация совокупности метаболических данных невозможна без соответствующих математических и программных инструментов. Применение методов мультивариантной статистики (с обучением и без) позволяет перейти от холистических данных к выявлению конкретных биомаркеров процессов, происходящих в клетке (Wolfender et al., 2013). На сегодня самый распространенный метод обработки – это метод главных компонент (principal component analysis – PCA), который представляет собой один из методов без обучения (Stacklies et al., 2007). Для классификации данных применяются различные методы с обучением, например метод проекций на латентные структуры (projection on latent structures – PLS) и его модификация – ортогональный PLS (OPLS) (Wold et al., 2001; Bylesjö et al., 2006; Wiklund et al., 2008). Другой широко используемый для классификации полученных данных метод – Random Forest (RF), с помощью которого обрабатываются данные с большим числом объектов и признаков (Breiman, 2001). Тандемное использование высокотехнологичных методов хроматографического анализа с математическими методами обработки данных привело к резкому всплеску интереса к метаболомным исследованиям.

При помощи перечисленных выше подходов удалось показать, что метаболом является важным биохимическим признаком фенотипа растений, позволившим выявить скрытые различия генотипов, морфологически и физиологически не различающихся между собой (Raamsdonk et al., 2001; Weckwerth et al., 2004; Liebeke et al., 2014). Успехи последних лет в области геномики инициировали новое направление в метаболомных исследованиях, направленное на поиск генетических факторов, определяющих химический состав растений. Весьма перспективен поиск локусов количественных признаков (QTL), контролирующих размеры пулов метаболитов. На сегодняшний день идентифицированы сотни QTL, определяющих содержание десятков метаболитов (Fernie, Schauer, 2009; Ruan, Teixeira da Silva, 2011; Joseph et al., 2014; Hill et al., 2015). Опубликованы первые работы, в которых рассматривается возможность использования метаболома как важного критерия оценки фенотипического проявления признака у аллоплазматических форм картофеля с различным составом органелльных геномов (Joseph et al., 2013, 2015). Исследования по метаболитному фенотипированию трансгенных растений открывают новые перспективы тестирования нежелательных последствий генетических модификаций (Hoekenga, 2008; Stewart, Shepherd, 2013).

Все эти результаты в значительной степени расширили функциональную значимость метаболомики.

Метаболомное профилирование нашло практическое применение в прикладных исследованиях, направленных на решение задач сельского хозяйства и пищевой промышленности. Информация о качестве и безопасности продуктов питания становится все более актуальной для потребителей и, соответственно, востребована производителями пищевых продуктов. Она позволяет совершенствовать существующие технологии выращивания растений, сбора, транспортировки, хранения и производства растительных продуктов, делая их безопаснее, полезнее и вкуснее (Dixon et al., 2006; Hall et al., 2008; Stewart et al., 2011; Chin, Slupsky, 2013). Особый интерес в последние годы представляет применение метаболомных данных в селекционных исследованиях по интрогрессивной межвидовой гибридизации (Schauer et al., 2006; López-Caamal, Tovar-Sánchez, 2014). Объектом изучения стали различные культурные растения, включая горох, капусту, кукурузу, люцерну, маш, пшеницу, рис, сою, томат, ячмень и др. (Frank, Engel, 2013). Предлагаемый обзор обобщает метаболомные исследования по ряду перечисленных направлений, выполненные на картофеле, который по данным FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nation, <http://www.fao.org/faostat/ru/#data/QC>), представляет собой четвертую по объемам производства продовольственную культуру.

Разнообразие метаболома картофеля

В 2000 г. метод ГХ-МС был впервые применен для метаболомного профилирования клубней картофеля (Roessner et al., 2000). В одной пробе этот метод позволил детектировать в общей сложности 150 соединений, 77 из которых были химически идентифицированы. Полученные результаты отличались высокой воспроизводимостью. Их незначительная вариабельность, обусловленная процедурами экстракции, химической модификации и анализа, оказалась несущественной по сравнению с биологической изменчивостью образцов. Следует подчеркнуть, что, помимо описания совокупности метаболитов, в этой работе было опровергнуто мнение, основанное на многочисленных биохимических, морфологических и молекулярных исследованиях, о том, что микроклубни, полученные в культуре *in vitro*, представляют собой фенотипы клубней, выращенных в почве (Visser et al., 1994; Desire et al., 1995; Debon et al., 1998; Veramendi et al., 1999). ГХ-МС выявила различия в содержании аминокислот, синтезируемых из альфа-кетоглутарата и оксалоацетата: в микроклубнях их содержание было в 10 раз и более выше, тогда как содержание тирозина, глицина, аланина, β-аланина и фенилаланина было во столько же раз ниже. Еще одно важное отличие микроклубней заключалось в повышенном содержании соединений, связанных с осмотическим стрессом, таких как глицерин, маннит, инозит и пролин. Авторы предположили, что причиной возможного осмотического стресса могло быть высокое содержание сахарозы в культуральной среде (Roessner et al., 2000). В следующей работе была продемонстрирована роль экзогенных соединений в модуляции метаболитического профиля клубней картофеля на примере глюкозы.

Показано, что только при концентрации моносахарида не менее 200 мМ между образцами клубней картофеля выявляются различия по сравнению с контролем. Наибольшими изменениями характеризовались аспарагин, глюкоза, мальтоза, пролин и триптофан. Анализ совокупности полученных данных методом PCA выявил четкую тенденцию к усилению различий между образцами, полученными из интактных клубней, и образцами, проинкубированными в средах с увеличением концентрации глюкозы (Roessner et al., 2001). Тем самым еще в начале 2000-х гг. были получены данные о разнообразии метаболитного профиля растений картофеля и доказана его функциональная значимость.

Тканевая гетерогенность метаболома

Высшие растения представляют собой дифференцированные организмы, обладающие осевой и радиальной полярностью, что может определять метаболомную гетерогенность. Метаболитное профилирование образцов, отобранных из различных зон клубней картофеля (сердцевина, внутренняя кора, внешняя кора и кожура), показало наличие как радиальных, так и аксиальных градиентов метаболитов (от апекса клубня до столона). В основном градиенты концентраций метаболитов были радиальными (Shepherd et al., 2007). Например, ряд аминокислот, таких как метионин, треонин, тирозин и аланин, преимущественно содержался во внутренних зонах клубня. Напротив, содержание аспарагина было максимальным в кожуре и снижалось к сердцевине. Положительный градиент концентрации, направленный к центру, был свойствен сахарам (фруктоза, глюкоза), а противоположный – целому ряду соединений вторичного метаболизма (путресцину, кофейной и хлорогеновой кислотам и т.д.). Продольный градиент выявлен только для аланина, лимонной кислоты и малата. Эти соединения имели максимальную концентрацию на апикальном конце клубня по сравнению с его основанием (Shepherd et al., 2007).

Анализ методами ГХ-МС и ЖХ-МС клубней картофеля исходных растений сорта Desiree и полученных на его основе генетически модифицированных линий показал, что тканеспецифичность – важнейший фактор, определяющий концентрацию большого числа метаболитов. Из 90 метаболитов 63 демонстрировали значимые различия в содержании в зависимости от типа ткани. Концентрация 40 метаболитов была выше в кожуре. Среди них: 12 жирных кислот, 9 жирных спиртов, гликоалкалоиды, фитостерины, сахара, органические кислоты. Кожура отличалась повышенным содержанием хлорогеновой и кофейной кислот, являющихся защитными веществами, а также антиоксидантами, а картофель, как известно, представляет собой богатый источник антиоксидантов полифенольной природы в рационе человека (Lachman et al., 2000; Lachman, Hamouz, 2005; Shepherd et al., 2016). Среди метаболитов, концентрации которых были выше в сердцевине клубня, преобладали аминокислоты (почти все протеиногенные), гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), пантотеновая кислота (витамин B5), сахара (фруктоза и сахароза), галактозил-глицерин и антиоксидант глутатион (Shepherd et al., 2016).

Клеточная компартментализация метаболома

Большим достижением метаболомных исследований можно считать появление подходов, позволяющих анализировать метаболитные профили отдельных компартментов клетки. Они не только указывают на метаболическое значение каждой отдельной органеллы, но и позволяют установить связи между компартментами при формировании внутриклеточных метаболических сетей (Geigenberger et al., 2011; Tiessen et al., 2012; Fly et al., 2015).

Углеводный обмен, несомненно, играет важнейшую роль в формировании клубней картофеля. В начале формирования клубней происходит ряд метаболических перестроек, в том числе изменение баланса сахаров на клеточном уровне. Показано усиление активности сахарозосинтазы и снижение активности кислой инвертазы (Ferne, Willmitzer, 2001). Для выявления роли инвертаз в регуляции углеводного метаболизма был проведен сравнительный анализ клубней исходных растений сорта Désirée и двух трансгенных линий: U-IN2-30, экспрессирующей ген, кодирующий дрожжевую инвертазу, и линии U-IN1-33, экспрессирующей ген, кодирующий инвертазу, но содержащий последовательность апопластной локализации фермента. Сравнительный анализ продемонстрировал, что внутриклеточное перераспределение фермента оказывало значительное действие как на фенотип, так и на биохимические характеристики клубней (Farre et al., 2008). Метаболитный ГХ-МС профайлинг в сочетании с субклеточным фракционированием (non-aqueous fractionation) позволил выявить неравное распределение 50 метаболитов между компартментами в клетках клубней картофеля. Драматические изменения наблюдались в субклеточном распределении сахаров. Например, если в клетках исходных и трансгенных растений, экспрессирующих ген инвертазы апопластной локализации, глюкоза содержалась главным образом в вакуоли, то сверхэкспрессия гена цитозольной инвертазы у трансгенных растений приводила к росту содержания глюкозы в цитоплазме до уровня, свойственного вакуоли. С другой стороны, если в клубнях исходных растений сахароза была локализована преимущественно в вакуоли, то при экспрессии трансгенов инвертазы происходило резкое увеличение доли сахарозы, содержащейся в цитоплазме и пластидах, за счет снижения ее содержания в вакуоли и роста в других компартментах, причем в случае апопластной формы инвертазы эффект проявлялся заметно сильнее. Некоторые сахара, такие как мальтоза, изомальтоза, мальтит и трегалоза, были обнаружены только в клетках трансгенной линии, экспрессирующей ген цитозольной инвертазы. Существенные различия наблюдались в субклеточных концентрациях производных сахаров. Так, наблюдалось увеличение цитозольной концентрации глюкозо-6-фосфата, фруктозо-6-фосфата, 3-фосфоглицерата и общей концентрации маннита при экспрессии гена, кодирующего цитозольную инвертазу. Наряду с этим усиление экспрессии генов цитозольной, но не апопластной инвертазы вызывало значительное перераспределение пула инозита из вакуоли в цитоплазму (Farre et al., 2008).

Снижение вакуолярного и увеличение цитозольного пулов фумарата и сукцината при сверхэкспрессии гена цитозольной инвертазы было единственным значительным

изменением субклеточного распределения органических кислот в клетках трансгенных растений (Farre et al., 2008). Следует отметить, что в клетках листа аминокислоты были преимущественно локализованы в цитозоле (Leidreiter et al., 1995; Benkeblia et al., 2007), а в клетках клубней определялись в вакуоли, что может свидетельствовать о специализации клеток клубней к депонированию (Farre et al., 2008). Экспрессия гена цитозольной инвертазы приводила к снижению содержания в вакуолях гомосерина, лизина, метионина, 5-оксопролина и росту содержания триптофана. Экспрессия гена апопластной инвертазы сопровождалась увеличением пластидного и уменьшением вакуолярного пула аланина, валина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, триптофана, фенилаланина и тирозина. В отличие от линии с апопластной формой фермента, трансгенная линия, экспрессирующая цитоплазматическую форму инвертазы, характеризовалась увеличенным содержанием во всех компартментах нескольких основных аминокислот, таких как аспарагин, ГАМК и глутамат, тогда как увеличение содержания триптофана было ограничено вакуолью.

Таким образом, комплексные метаболомные изменения происходят не только на уровне отдельного организма и/или органа, но и на субклеточном органелльном уровне.

Суточные колебания метаболома

Накопленные данные позволяют сделать вывод о том, что изменения метаболомных профилей могут носить достаточно динамичный характер. Суточные колебания содержания углеводов и широкого спектра метаболитов в листьях картофеля (*Solanum tuberosum*, сорт Désirée) были проанализированы с помощью метода ГХ-МС. Данное исследование представляет особый интерес, так как в тандеме с метаболомным анализом проводился анализ транскриптома с использованием микрочипов (Urbanczyk-Wochniak et al., 2005). Установлено, что некоторые метаболиты (глутаровая кислота, мальтоза, сахароза, изомальтоза) имели сравнительно большую связь с первой главной компонентой, в пространстве которой временные кластеры отделены друг от друга. Содержание интермедиатов фотодыхания, таких как глицин и серин, а также многих других аминокислот, например тирозина, достигало максимума в конце светового периода. В то же время интермедиаты цикла Кребса характеризовались различной динамикой их содержания. Так, для цитрата и изоцитрата отмечено уменьшение пулов в течение светового периода и увеличение – в темное время суток, тогда как содержание малата росло в течение светового периода и снижалось в темноте. При освещении наблюдалось резкое увеличение пулов фруктозо-6-фосфата, глюкозо-6-фосфата и множества сахаров и сахароспиртов, в темное время суток накапливались мальтоза, мальтит и урацил. Выявленные суточные изменения содержания углеводов, аминокислот и органических кислот в листьях картофеля во многом аналогичны тем, которые ранее наблюдались у табака и арабидопсиса (Urbanczyk-Wochniak et al., 2005).

Обращаясь к системному анализу изменений на метаболомном и транскриптомном уровнях, следует отметить, что в течение суточного периода было зарегистрировано 56 значимых различий в содержании метаболитов и

832 значимых различия в уровнях транскриптов. Необходимо подчеркнуть, что лишь относительно небольшое число изменений в экспрессии генов сильно коррелирует с изменениями в уровнях метаболитов. Полученные результаты подтверждают метаболическую регуляцию на геномном уровне (Urbanczyk-Wochniak et al., 2005).

Генотип и метаболитный профиль

Общеизвестно, что картофель был domesticiрован в Южной Америке. Центром происхождения и разнообразия аборигенных южноамериканских сортов является бассейн оз. Титикака. По мнению отечественных систематиков, второй независимый центр происхождения картофеля находился на территории Южного Чили (Юзепчук, Букасов, 1929). Разнообразие культурных видов картофеля представлено аборигенными (местными) южноамериканскими сортами четырех уровней плоидности. Среди исследователей существуют глубокие разногласия по вопросам происхождения и таксономического состава группы культурных видов картофеля (Spooner et al., 2014). Огромное разнообразие местных южноамериканских сортов (в генбанках сохраняются тысячи образцов) по самому широкому спектру признаков на протяжении нескольких столетий активно используется в селекционных программах разных стран.

Селекционные сорта картофеля характеризуются узким спектром генетического разнообразия, что связано с историей интродукции картофеля в европейские и североамериканские страны. Малочисленные южноамериканские аборигенные сорта были интродуцированы в Европу начиная с конца XVI в. При этом в новой среде (обстановке) отбирались формы, способные формировать клубни в условиях длинного летнего дня умеренных и северных широт, что привело к резкому сужению генетического разнообразия селекционных сортов, выведенных за пределами Южной Америки в XVII – начале XX в. Расширение генетического разнообразия современных селекционных сортов достигается применением методов межвидовой гибридизации, хромосомной, клеточной и генной инженерии.

О возможности использования результатов метаболомного профилирования для дифференциации сортов картофеля и поиска у них специфических метаболитов свидетельствуют данные, полученные в последние годы. С использованием ГХ-МС было изучено фитохимическое разнообразие низкомолекулярных полярных и неполярных метаболитов в клубнях 27 тетраплоидных сортов картофеля (включая аборигенные чилийские, а также старые европейские и современные селекционные сорта) и двух диплоидных сортов Inca Sun и Mayan Gold, полученных на основе *S. phureja* (Dobson et al., 2008).

Показано, что отдельные сорта анализируемой выборки отличались по содержанию ряда соединений. Например, сорта Glena и Morag имели разный профиль полярных метаболитов. В частности, сорт Glena содержал больше фруктозы, глюкозы, глюкаровой и галактаровой кислот и меньше глицериновой, фумаровой и треоновой кислот, инозита, мочевины, и R-глицерофосфата. Метаболитные профили клубней сорта Pentland Javelin отличались от других повышенным содержанием аминокислот – ала-

нина, валина, изолейцина, тирозина, лейцина, глицина, оксипролина, метионина, фенилаланина и лизина. Анализ профилей неполярных метаболитов выявил своеобразие сорта Mayan Gold, характеризовавшегося большим, по сравнению с другими культурными и аборигенными сортами, содержанием минорных жирных кислот (15:0, 17:0, 15:1, 19:1) (Dobson et al., 2008).

Однако различия между группами селекционных и аборигенных сортов были невелики и в ряде случаев сравнимы с межсортными и межклональными, а также сопоставимы с различиями, выявляемыми при анализе растений, выращенных в разных условиях. Такой результат мог быть обусловлен неравным физиологическим состоянием анализируемых растений, поскольку скорость развития растений, в том числе клубней, различается в зависимости от генотипа (Dobson et al., 2008), а в процессе формирования клубней наблюдаются изменения баланса метаболитов, например, отмечено снижение содержания фруктозы, глюкозы и сахарозы в клубнях (Richardson et al., 1990; Kolbe, Stephan-Beckmann, 1997). Тем не менее совокупный анализ данных с использованием метода главных компонент показал, что вариабельность метаболитных профилей (между повторностями) у сортов была различной, что свидетельствует о разной степени влияния окружающей среды на метаболитный профиль растений с различным генотипом.

Позже в этой же лаборатории было проведено аналогичное исследование по изучению профилей метаболитов клубней 46 коллекционных образцов, представленных тетраплоидными (группы *Tuberosum*, *Andigena*) и диплоидными (группы *Phureja*, *Stenotomum*) аборигенными сортами картофеля из групп *Tuberosum* и *Andigena*, собранных в различных эколого-географических условиях. Были выявлены значимые различия в содержании 24 из 43 неполярных метаболитов и 17 из 49 полярных метаболитов. Иерархическая кластеризация на основе сравнения четырех исследованных групп выявила восемь групп метаболитов, различающихся паттерном содержания (Dobson et al., 2010). Однако применение метода PCA не обнаружило существенного влияния географического происхождения на метаболитный профиль в объеме всей выборки. В то же время некоторые различия были найдены для местных сортов группы *Andigena*, имеющих разное географическое происхождение. Так, боливийские сорта группы *Andigena* содержали больше аминокислот (глицина, аланина и ГАМК) и сахаров (фруктозы и глюкозы) по сравнению с эквадорскими сортами. Установлено, что метаболитные профили местных сортов, принадлежащих к группам *Phureja* и *Stenotomum*, имели достаточно большое сходство между собой, но отличались от таковых у сортов из группы *Tuberosum* и большинства представителей *Andigena* (Dobson et al., 2010). В работе (Dobson et al., 2010) использована классификация культурных видов K. Dodds (1962).

О значимости генотипа в определении метаболомного профиля свидетельствуют выявленные различия между отдельными сортами. Изучение клубней шести селекционных сортов картофеля методом ГХ-МС в сочетании с PCA показало, что в пространстве первых двух главных компонент сорт Hópehely отличается от остальных сортов по содержанию пальмитиновой, стеариновой кислот и

ГАМК, уровень которых был относительно высок именно в клубнях этого сорта. Последующее сравнение метаболомов показало, что к вариабельным можно отнести и сорта Somogyi kifli и Katica. Однако сорта Venusz Gold, Lorett и White Lady были довольно однородными по метаболитному составу клубней. По-видимому, существуют как метаболитически однородные, так и гетерогенные сорта (Uri et al., 2014).

Метаболомные различия, выявленные как между группами сортов, так и между сортами одной группы, указывают на генетическую регуляцию метаболитических процессов. При этом следует учитывать, что наличие вариабельности метаболитного профиля при различных условиях выращивания растений тоже зависит от генотипа исследуемых сортов. Проблема генетической детерминации метаболома, безусловно, требует дальнейших исследований.

Метаболом при изменении количественных признаков

Наиболее распространенный подход для поиска генетических факторов, влияющих на проявление сложных количественных признаков организма, – картирование локусов количественных признаков (quantitative trait loci – QTL). QTL-картирование основано на интеграции молекулярно-генетических и фенотипических данных, обработанных методами статистического анализа (Doerge, 2002). В последние годы этот подход начал применяться и в исследованиях по метаболомному профилированию клубней, что позволило у картофеля картировать ряд mQTL (metabolic quantitative trait locus), ассоциированных с метаболомными признаками.

Заметных успехов в этой области достигли исследователи Университета Вагенингена, что во многом связано с их предыдущими работами по картированию многочисленных QTL, детерминирующих признаки качества клубней, выполненными с использованием различных систем ДНК-маркеров, геномных и транскриптомных подходов (van Eck et al., 1994; Kloosterman et al., 2010). Созданные в этих исследованиях картирующие диплоидные высокогетерозиготные популяции, полученные в межвидовых скрещиваниях дигампоидов картофеля (*S. tuberosum*) с культурным (*S. phureja*) и диким (*S. vernei*) видами, были использованы и для метаболитного профилирования методом GC-TOF-MS, что позволило выявить генетические факторы (mQTL), определяющие изменчивость первичного метаболизма картофеля. В общей сложности в ходе анализа было детектировано 139 полярных метаболитов. Анализ генетической информации с применением машинного обучения, методом Random Forest, позволил выявить локусы mQTL для 72 % метаболитов (Carreno-Quintero et al., 2012). Эти результаты были сопоставлены с данными по QTL-картированию 26 признаков качества клубней (например, окраска мякоти и кожуры, пригодность к определенному типу приготовления, продолжительность периода покоя клубней и др.). В ходе исследования удалось показать, что большое число признаков колокализовано с локусом, детерминирующим продолжительность вегетации растения на хромосоме 5. Однако ряд mQTL был картирован за пределами этой области, что косвенно указывает на наличие регуляторных сетей, независимых

от стадии развития растений. Изменчивость признака «размер зерен крахмала», например, определяется QTL на хромосоме 8, где также локализируются mQTL целого ряда аминокислот, органических кислот и углеводов. Признаки, детерминирующие окраску чипсов, колокализованы с mQTL органических кислот сукцината, фумарата и бутирата на хромосомах 2 и 9. Еще один признак – уровень фосфорилирования крахмала – определяет его вязкость и ряд химических свойств клубней и, соответственно, имеет большое значение для последующего использования картофеля в пищу. QTL данного признака локализован на хромосомах 2, 9 и 5 вместе с mQTL аланина, бутирата, ГАМК, сукцината, 5-оксопролина, фенилаланина, глутамина, тирозина, триптофана и галактинола (Carreno-Quintero et al., 2012).

Выявленные факты колокализации QTL и mQTL позволили авторам статьи высказать предположение об общих регуляторных факторах, контролирующих синтез ряда метаболитов и одновременно детерминирующих изменчивость ряда признаков качества клубней.

Метаболомика и фенотип картофеля

Вкус. Изолейцин, лейцин, тирозин и фенилаланин – важные предшественники ароматических соединений, определяющих вкус вареного картофеля (Duckham et al., 2001; Martin, Ames, 2001). Именно изолейцин, лейцин и тирозин являются основными субстратами для реакций Стрекера, в результате которых выделяются летучие альдегиды (метилбутаналь и бензальдегид), которые придают «миндальный» и «поджаренный/сладкий» аромат вареному картофелю. Свободный тирозин также служит основным субстратом для полифенолоксидазы (Corsini et al., 1992), которая ответственна за нежелательный биосинтез меланина в механически поврежденных клубнях картофеля. В свою очередь хлорогеновая кислота не только является субстратом для полифенолоксидазы в клубнях некоторых сортов, но и вместе со своими предшественниками фенилаланином, хинатом и кофеатом вовлечена в неферментные реакции, вызывающие потемнение картофеля после приготовления (Dao, Friedman, 1992). Тем самым метаболом растений определяет потребительские свойства картофеля. Выявление и описание свойств различных сортов сельскохозяйственных культур, связанных с хозяйственно важными признаками, может быть проведено с использованием недавно разработанного метода FIE-MS (flow infusion electrospray ionization mass spectrometry). В исследовании клубней нескольких сортов картофеля (Agria, Desiree, Granola, Linda, Solara) с помощью метода FIE-MS и последующего RF-анализа удалось выявить лишь 24 значимых метаболита, характеризующих метаболитический профиль сорта. К их числу можно отнести тирозин, рафинозу, фенилаланин, ГАМК, глюконат, изолейцин, лейцин, метионин и аспартат. Например, сорт Desiree отличается от других высоким содержанием тирозина. Следовательно, метаболитный профиль можно рассматривать в качестве ключевого показателя, характеризующего вкусовые качества клубней картофеля у различных сортов (Beckmann et al., 2007).

В работе (Uri et al., 2014) методом ГХ-МС проведен анализ метаболитных профилей клубней шести селекци-

онных сортов картофеля (Hópehely, Katica, Lorett, Somogyi kifli, Vénusz Gold, White Lady), различающихся содержанием крахмала, продолжительностью периода покоя клубней, окраской мякоти клубней и рассыпчатостью тканей клубня, пригодных к разным способам приготовления. По результатам исследований сделан вывод о том, что в целом изменчивость метаболитного профиля клубней не связана с принадлежностью сортов к определенным группам по содержанию крахмала или по типу приготовления. Отметим, что данные выводы можно считать предварительными, так как в каждой группе было проанализировано не более одного-двух сортов. В то же время в этой работе выявлены межсортовые различия в профилях метаболитов как свежесобранных клубней (значимые отличия для сорта Hópehely), так и клубней в процессе хранения (в темноте при 20–22 °C). У всех сортов, кроме Somogyi kifli, были выявлены значимые межсортовые различия в динамике изменений многих метаболитов, которые не зависели от продолжительности периода покоя клубней. Относительная стабильность метаболитного состава клубней отмечена только у сорта Somogyi kifli, в родословной которого не участвовали дикие виды, в то время как остальные пять сортов получены на основе интрогрессивной гибридизации (Uri et al., 2014).

Окраска кожуры и мякоти. Транскриптомное и метаболомное (LC-MS) профилирование клубней родительских диплоидных селекционных клонов С (USW533.7) и Е (77.2102.37), а также гибридной С × Е расщепляющейся популяции позволило прояснить механизмы формирования важных качественных признаков, таких как окраска кожуры и мякоти клубней, а также ферментативное обесцвечивание клубней после очистки (Acharjee et al., 2011). Применение RF для установления связи метаболома и окраски мякоти клубней выявило несколько значимых метаболитов. Набор этих метаболитов объяснял 77 % дисперсии признака окраски клубней. Этот список включал каротиноиды – виолоксантин и зеаксантин, а также ряд неидентифицированных соединений. Спектр метаболитов, статистически связанный с ферментативным обесцвечиванием клубней после очистки, отличался от предыдущего, однако 6 метаболитов были общими для обоих признаков, в том числе виолоксантин. Интеграция метаболомных и транскриптомных данных позволила существенно увеличить выявляемую долю дисперсии признаков клубней, объясняемую при RF-анализе, по сравнению с рассчитанными отдельно – либо в транскриптомном, либо в метаболомном анализе: 82 % дисперсии для окраски клубней и 51 % для признака обесцвечивания клубней после очистки (Acharjee et al., 2011).

В следующей работе этого коллектива авторов для выявления связей генетических и метаболических факторов с фенотипическими, в том числе хозяйственно ценных признаков, было проведено системное исследование диплоидной расщепляющейся популяции, включающее анализ экспрессии генов, метаболитное профилирование (ГХ-МС и ЖХ-МС) и протеомный анализ (Acharjee et al., 2016). Оказалось, что профили метаболитов слабо связаны с ценными фенотипическими признаками. Полученные методом RF модели для предсказания изменчивости фенотипических признаков на основе ГХ-МС объясняют

не более 12 % дисперсии, а модели на основе ЖХ-МС показали связь содержания метаболитов с фенотипом только для признака окраски клубней (63 % объясненной дисперсии). В то же время объединение всех факторов, определяющих окраску мякоти картофеля, включая изменчивость экспрессии генов, кодирующих бета-каротин-гидроксилазу и зеаксантин-эпоксидазу, метаболиты и белки, объясняет 75 % дисперсии, что лишь немногим больше, чем одиночные данные транскриптомного или ЖХ-МС профилирования. В случае признака формы клубней только транскриптомные данные объясняют существенную долю дисперсии. Изменчивость показателя желатинизации крахмала, измеряемого с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (differential scanning calorimetry – DSC), значимо связана с экспрессией 12 генов, содержанием 5 метаболитов (ЖХ) и 2 белков. Эти 19 переменных объясняли 45 % дисперсии. Транскриптомный и метаболомный анализ изучаемой популяции по изменчивости признака ферментативного обесцвечивания после очистки клубней выявил 420 значимых генов и 8 значимых метаболитов (ЖХ), среди которых два были идентифицированы как хлорогеновая кислота и метиловый эфир тирозина (Acharjee et al., 2016).

Окрашенный картофель содержит антоцианы, обладающие антиоксидантными свойствами (Stushnoff et al., 2010; Truong et al., 2010; Chong et al., 2013). На сегодняшний день известно более 635 антоцианов, содержащихся в различных цветных фруктах, овощах и цветках. Антоцианидины дельфинидин, петунидин и мальвидин окрашивают ткани в темные и фиолетовые цвета, в то время как цианидин и пеларгонидин придают растениям ярко-красную окраску (Jaakola, 2013). Сорта Hongyoung и Jayoung с окрашенными клубнями были получены в скрещиваниях сорта Atlantic с неокрашенной мякотью клубней и селекционного клона AG34314 с темно-пурпурными клубнями (Park et al., 2009a, b). Hongyoung имеет светло-красную кожуру и мякоть, а клубни сорта Jayoung окрашены в темно-фиолетовый цвет. Анализ данных профилирования методом PCA показал, что метаболитные профили этих сортов различаются в пространстве первых двух главных компонент (Cho et al., 2016). В частности, состав флавоноидов сильно различался у сортов Hongyoung и Jayoung, что свидетельствует, возможно, о решающей роли этих метаболитов в определении пигментации картофеля. Апигенин, кемпферол, дигидрокемпферол и производные пеларгонидина содержались в больших количествах у сорта Hongyoung, тогда как производные пеонидина, петунидина и мальвидина – у сорта Jayoung (Cho et al., 2016).

Метаболомика генно-модифицированного картофеля

Особого внимания заслуживает серия работ, в которых рассматриваются метаболические изменения при получении генетически модифицированных растений. Совокупность приведенных в настоящем обзоре данных свидетельствует о том, что метаболом картофеля (как и других видов растений) очень отзывчив на любые изменения на уровне генома. Тогда возникает вопрос, можно ли использовать метаболическое профилирование для

идентификации генно-модифицированных растений, а также для доказательства их безопасности для окружающей среды. Выше мы уже приводили данные о значении модуляции экспрессии инвертазы и ее локализации в клетке на изменение внутриклеточных метаболитических градиентов. Рассмотрим результаты еще нескольких исследований.

Фосфоглюкомутаза (PGM) катализирует взаимопревращение глюкозо-1-фосфата в глюкозо-6-фосфат и является основной точкой бифуркации обмена веществ между депонированием и гликолизом (Ray, Peck, 1973; Guedon et al., 2000). Трансгенный картофель со сниженной экспрессией пластидной фосфоглюкомутазы (PPGM) не демонстрировал никаких внешних фенотипических особенностей, но характеризовался резким снижением накопления крахмала в клубнях и значительным увеличением уровня содержания сахарозы и гексозофосфатов (Tauberger et al., 2000). Снижение активности PPGM приводило к снижению накопления крахмала в листьях картофеля и сопровождалось небольшим уменьшением уровня сахарозы (Lytovchenko et al., 2002a). При репрессии синтеза PPGM снижался объем пулов глюкозо-6-фосфата, фруктозо-6-фосфата и глюкозо-1-фосфата, однако соотношение глюкозо-6-фосфата и глюкозо-1-фосфата существенно не изменялось. Наблюдалось значительное уменьшение содержания триозофосфатов и неорганического фосфата (Φ_n). Рост соотношения фосфосахаров и Φ_n указывает на то, что уровень транспорта фотосинтатов в трансгенных линиях мог быть лимитирован фосфатом. При этом падали концентрации фосфоенолпирувата и пирувата, понижались содержание УДФ-глюкозы и соотношение АТФ/АДФ. В то же время в трансгенных растениях пул аминокислот (аспарагин, глутамат, изолейцин, лизин, фенилаланин, серин, тирозин и валин) увеличивался, а большинства органических кислот (сукцинат, цитрат, α -кетоглутарат, шикимат, бензоат) уменьшался (Lytovchenko et al., 2002a).

В клубнях генно-модифицированных растений со сниженной активностью цитозольной фосфоглюкомутазы (cPGM) наблюдалось падение уровня мобилизации сахарозы и накопления крахмала, и растения демонстрировали малорослый (stunted) фенотип (Fermie et al., 2002). В листьях трансформантов скорость фотосинтеза была снижена, но при этом уровень фотосинтетического синтеза сахарозы менялся слабо (Lytovchenko et al., 2002b). Содержание гексозофосфатов и триозофосфатов снижалось, тогда как размер пула Φ_n не отличался от дикого типа, а соотношение фосфоэфиров сахаров и Φ_n было значительно меньше. Также значительно ниже в трансформантах было содержание фосфоенолпирувата и пирувата. Снижение активности cPGM вызывало снижение уровня аденилатов и в частности АТФ, при этом соотношение АТФ/АДФ немного росло. Пул УДФ-глюкозы существенно снизился. Кроме того, наблюдалось значительное снижение содержания аспарагина, изолейцина, лейцина, лизина, серина, тирозина и валина. При этом росло содержание карбоновых кислот – цитрата и кетоглутарата, а пул шикимата уменьшался (Lytovchenko et al., 2002b).

Другой фермент – фруктокиназа – катализирует фосфорилирование фруктозы с образованием фруктозо-6-фосфата. Трансформация растений картофеля сортов Desiree

и Record смысловой и бессмысловой последовательностями гена фруктокиназы под контролем 35S промотора вызывала изменения количества и активности этого фермента (Davies et al., 2005). Сравнительный анализ листьев и клубней показал, что эта изоформа вносит лишь небольшой вклад в общую фруктокиназную активность в тканях листьев, но является преобладающей в клубнях. Антисмысловое ингибирование фруктокиназы приводило к снижению урожая клубней, напротив, ее избыточная экспрессия не оказывала никакого влияния на этот параметр. Видимо, фруктокиназа не определяет метаболизм крахмала, поскольку модуляция ее активности слабо влияла на метаболизм углеводов, за исключением общего увеличения содержания глюкозы в бессмысловых линиях (Davies et al., 2005). Последующий анализ показал, что изменение активности фруктокиназы вызывало небольшое количество изменений в содержании органических и аминокислот, а также минорных углеводов в клубнях картофеля, причем многие из этих изменений не коррелировали с уровнем экспрессии или зависели от генетического фона. Отмечалась положительная корреляция уровня активности фруктокиназы с содержанием дегидроаскорбата и арабинозы. Другие наблюдаемые различия зависели от генетического фона, т.е. от линии исходного растения. Так, в случае трансгенных растений сорта Record избыточная экспрессия фруктокиназы приводила к увеличению пулов аланина, аспарагина, орнитина и пролина, сахарата, хината, цитрата, фукозы и глицерин-1-фосфата, в то время как подавление экспрессии вызывало увеличение содержания ГАМК, глутамина, лизина, тирозина, валина, fumarата, малата и хината и снижение пула мальтозы. У трансгенных растений сорта Desiree было отмечено меньше изменений, вызванных репрессией фруктокиназы, по сравнению с сортом Record. Растения с репрессией фруктокиназы характеризовались ростом содержания малата, галактозы и маннозы и снижением бета-аланина, тирамина, сахарата и шикимата, тогда как сверхэкспрессия приводила к снижению уровня содержания глицина, тирамина, тирозина и сукцината. Анализ активности метаболитических потоков с использованием меченых субстратов показал, что в метаболизме трансгенных линий происходит заметный сдвиг. Эти данные свидетельствуют о важной роли фруктокиназы, действующей совместно с сахарозосинтазой, в поддержании баланса между синтезом и деградацией сахарозы (Davies et al., 2005).

Анализ метаболома методами ЯМР и ВЭЖХ-УФ клубней 40 генно-модифицированных линий, относящихся к четырем группам образцов, полученных у сортов Record и Desiree и несущих модификации генов первичного метаболизма углерода, синтеза крахмала, процессинга гликопротеинов и метаболизма полиаминов и этилена, в сочетании с мульти- и юнивариантной статистикой выявил существенное влияние генотипа на метаболом (Defernez et al., 2004). Полученные данные неоспоримо свидетельствуют о том, что изменения генотипа могут существенно влиять на метаболическую перестройку растений картофеля.

Важным прикладным направлением в создании ГМО является получение растений, синтезирующих соедине-

ния, полезные для здоровья человека. К числу таких растений относятся сорта картофеля, содержащие инулины. Инулины стимулируют рост бифидобактерий в кишечнике и помогают повысить резистентность пищеварительного тракта к патогенам (Hellwege et al., 2000). Однако создание генно-модифицированных растений требует постоянного контроля за их биохимическим фенотипом. Для этого были исследованы клубни обычных растений и трансгенных линий, полученных на основе сорта Desiree, которые содержат в больших количествах фруктаны инулинового типа. FIE-MS фингерпринтинг 600 образцов, представляющих все генотипы, в сочетании с PCA показал, что по метаболомным признакам можно выделить три основных метакласса генотипов: исходных сортов и трансгенных линий с изменением экспрессии сахароза:сахароза-1-фруктозилтрансферазы (SST) и фруктан:фруктан-1-фруктозилтрансферазы (SST/FFT) (Catchpole et al., 2005).

Еще более масштабное метаболитное профилирование методом GC-TOF-MS с использованием 2182 клубней 12 генотипов с регистрацией 252 метаболитов (90 идентифицированы, 89 отнесены к определенному классу и 73 неизвестны) также показало метаболомные различия генотипов, отличающихся по экспрессии SST и FFT. Таким образом, именно целенаправленные изменения, вызванные генетической трансформацией, определяли главные изменения метаболитного профиля картофеля (Catchpole et al., 2005).

Важным аспектом контроля метаболизма ГМ-растения является выяснение действия на фенотип факторов окружающей среды в условиях реального агробиоценоза в течение длительного времени. Сравнение трех трансгенных линий, синтезирующих инулины, с шестью традиционными полученными показало, что влияние окружающей среды в полевых условиях и особенностей экспериментов, проводившихся в течение двух сезонов, было пренебрежимо мало по сравнению с дисперсией, определяемой генотипом. Данные, полученные в разные годы и с использованием разных инструментов, показали возможность использования метаболомного профилирования не только для быстрой оценки сходства между генотипами растений, но и для выявления метаболитных сигналов, которые могли бы объяснить различия между классами генотипов (Enot et al., 2007).

Другой вектор создания генно-модифицированных линий картофеля обусловлен необходимостью повышения устойчивости растений к вредителям и патогенам. Известно, что стероидные гликоалкалоиды – это природные токсины, вырабатываемые растениями семейства пасленовых. Клубни картофеля накапливают преимущественно два гликоалкалоида – хаконин и соланин (van Gelder, 1990). Функцией этих соединений является защита растения от насекомых и патогенов, однако их накопление снижает качество и безопасность последующего потребления картофеля (Wink, 2003; Friedman, 2006; Nema et al., 2008).

Метаболитное профилирование методами LC-MS и GC-MS было использовано для выявления непреднамеренных изменений химического состава клубней картофеля при генетической модификации, нацеленной на уменьшение содержания гликоалкалоидов, с помощью

репрессии трех генов *SGT1*, *SGT2* и *SGT3*, которые участвуют в их биосинтезе. Показаны не только ожидаемые изменения в содержании гликоалкалоидов в модифицированных линиях, но и значительные изменения содержания других метаболитов (Shepherd et al., 2015). Метаболитное профилирование клубней методом LC-MS выявило 91 соединение, а анализ данных PCA четко разделил образцы на три отдельные группы в соответствии с генотипом в пространстве первых двух главных компонент. В то же время были выявлены изменения в метаболизме растений, трансформированных «пустым» вектором, что говорит о чувствительности метаболомного профилирования, а также заставляет скрупулезно анализировать влияние любых факторов и внимательно подходить к выбору контролей для сравнения (Shepherd et al., 2015).

Заключение

Накопленные данные свидетельствуют о значимой роли генотипа в проявлении такого фенотипического признака, как метаболом. Даже минорные генетические модификации могут инициировать изменения метаболических сетей от субклеточного до организменного уровня. Подводя итог краткому анализу современных направлений метаболомных исследований картофеля, их общетеоретических и прикладных аспектов, следует подчеркнуть, что метаболомное профилирование является перспективным и высокочувствительным методом. Однако очевидно, что поиск биохимических маркеров зависит от стандартизации методов выращивания, пробоподготовки и последующего анализа, а также от тех унифицирующих подходов, которые позволили достичь огромного прогресса в геномных и транскриптомных исследованиях.

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

- Acharjee A., Kloosterman B., de Vos R.C., Werij J.S., Bachem C.W., Visser R.G.F., Maliepaard C. Data integration and network reconstruction with -omics data using Random Forest regression in potato. *Anal. Chim. Acta.* 2011;705(1-2):56-63. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.03.050>.
- Acharjee A., Kloosterman B., Visser R.G., Maliepaard C. Integration of multi-omics data for prediction of phenotypic traits using random forest. *BMC Bioinformatics.* 2016;17(5):180. DOI 10.1186/s12859-016-1043-4.
- Beckmann M., Enot D.P., Overy D.P., Draper J. Representation, comparison and interpretation of metabolome fingerprint data for total composition analysis and quality trait investigation in potato cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 2007;55(9):3444-3451. DOI 10.1021/jf0701842.
- Benkeblia N., Shinano T., Osaki M. Metabolite profiling and assessment of metabolome compartmentation of soybean leaves using non-aqueous fractionation and GC-MS analysis. *Metabolomics.* 2007;3(3):297-305. DOI 10.1007/s11306-007-0078-y.
- Boughton B.A., Thinagaran D., Sarabia D., Bacic A., Roessner U. Mass spectrometry imaging for plant biology: a review. *Phytochem. Rev.* 2016;15(3):445-488. DOI 10.1007/s11101-015-9440-2.

- Breiman L. Random Forests. *Mach. Learn.* 2001;45(1):5-32. DOI 10.1023/A:1010933404324.
- Bylesjö M., Rantalainen M., Cloarec O., Nicholson J.K., Holmes E., Trygg J. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *J. Chemometrics*. 2006;20(8-10): 341-351. DOI 10.1002/cem.1006.
- Carreno-Quintero N., Acharjee A., Maliepaard C., Bachem C.W., Mumm R., Bouwmeester H., Visser R.G., Keurentjes J.J. Untargeted metabolic quantitative trait loci analyses reveal a relationship between primary metabolism and potato tuber quality. *Plant Physiol.* 2012;158(3):1306-1318. DOI 10.1104/pp.111.188441.
- Carreno-Quintero N., Bouwmeester H.J., Keurentjes J.J. Genetic analysis of metabolome-phenotype interactions: from model to crop species. *Trends Genet.* 2013;29(1):41-50. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2012.09.006>.
- Catchpole G., Beckmann M., Enot D., Mondhe M., Zywicki B., Taylor J., Hardy N., Smith A., King R., Kell D., Fiehn O., Draper J. Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005;102(40):14458-14462. DOI 10.1073/pnas.0503955102.
- Chin E., Slupsky C. Applications of metabolomics in food science: food composition and quality, sensory and nutritional attributes. *Metabolomics in Food and Nutrition*. Elsevier, 2013;217-230. DOI <http://dx.doi.org/10.1533/9780857098818.2.217>.
- Cho K., Cho K.S., Sohn H.B., Ha I.J., Hong S.Y., Lee H., Kim Y.M., Nam H.M. Network analysis of the metabolome and transcriptome reveals novel regulation of potato pigmentation. *J. Exp. Bot.* 2016;67(5):1519-1533. DOI 10.1093/jxb/erv549.
- Chong E.S.L., McGhie T.K., Heyes J.A., Stowell K.M. Metabolite profiling and quantification of phytochemicals in potato extracts using ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Sci. Food Agr.* 2013;93(15):3801-3808. DOI 10.1002/jsfa.6285.
- Corsini D.L., Pavsek J.J., Dean B. Differences in free and protein-bound tyrosine among potato genotypes and the relationship to internal blackspot resistance. *Am. Potato J.* 1992;69(7):423-435. DOI 10.1007/BF02852293.
- Dalgliesh C.E., Horning E.C., Horning M.G., Knox K.L., Yarger K. A gas-liquid-chromatographic procedure for separating a wide range of metabolites occurring in urine or tissue extracts. *Biochem. J.* 1966;101(3):792-810. DOI 10.1042/bj1010792.
- Dao L., Friedman M. Chlorogenic acid content of fresh and processed potatoes determined by ultraviolet spectrophotometry. *J. Agric. Food Chem.* 1992;40(11):2152-2156. DOI 10.1021/jf00023a022.
- Davies H.V., Shepherd L.V., Burrell M.M., Carrari F., Urbanczyk-Wochniak E., Leisse A., Hancock R.D., Taylor M., Viola R., Ross H., McRae D., Willmitzer L., Fernie A.R. Modulation of fructokinase activity of potato (*Solanum tuberosum*) results in substantial shifts in tuber metabolism. *Plant Cell Physiol.* 2005;46(7):1103-1115. DOI 10.1093/pcp/pci123.
- Debon S.J.J., Tester R.F., Millam S., Davies H.V. Effect of temperature on the synthesis, composition and physical properties of potato micro-tuber starch. *J. Sci. Food Agric.* 1998;76(4):599-607. DOI 10.1002/(SICI)1097-0010(199804)76:4<599::AID-JSFA995>3.0.CO;2-F.
- Defernez M., Gunning Y.M., Parr A.J., Shepherd L.V., Davies H.V., Colquhoun I.J. NMR and HPLC-UV profiling of potatoes with genetic modifications to metabolic pathways. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52(20):6075-6085. DOI 10.1021/jf049522e.
- Desire S., Couillerot J.P., Hilbert J.L., Vasseur J. Protein changes in *Solanum tuberosum* during *in vitro* tuberization of nodal cuttings. *Plant Physiol. Biochem.* 1995;33(4):303-310.
- Dixon R.A., Gang D.R., Charlton A.J., Fiehn O., Kuiper H.A., Reynolds T.L., Tjeerdema R.S., Jeffery E.H., German J.B., Ridley W.P., Seiber J.N. Applications of metabolomics in agriculture. *J. Agric. Food Chem.* 2006;54(24):8984-8994. DOI 10.1021/jf061218t.
- Dobson G., Shepherd T., Verrall S.R., Conner S., McNicol J.W., Ramsay G., Shepherd L.V., Davies H.V., Stewart D. Phytochemical diversity in tubers of potato cultivars and landraces using a GC-MS metabolomics approach. *J. Agric. Food Chem.* 2008;56(21):10280-10291. DOI 10.1021/jf801370b.
- Dobson G., Shepherd T., Verrall S.R., Griffiths W.D., Ramsay G., McNicol J.W., Davies H.V., Stewart D. A metabolomics study of cultivated potato (*Solanum tuberosum*) groups Andigena, Phureja, Stenotomum, and tuberosum using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2010;58(2):1214-1223. DOI 10.1021/jf903104b.
- Dodds K.S. Classification of cultivated potatoes. The Potato and its Wild Relatives. Ed. D.S. Correll. Contrib. Texas Res. Foundation, Bot. Stud. 1962;4:517-539.
- Doerge R.W. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nature Rev. Genet.* 2002;3(1):43-52. DOI 10.1038/nrg703.
- Duckham S.C., Dodson A.T., Bakker J., Ames J.M. Volatile flavour components of baked potato flesh. A comparison of eleven potato cultivars. *Nahrung*. 2001;45(5):317-323. DOI 10.1002/1521-3803(20011001)45:5<317::AID-FOOD317>3.0.CO;2-4.
- Enot D.P., Beckmann M., Draper J. Detecting a difference – assessing generalisability when modelling metabolome fingerprint data in longer term studies of genetically modified plants. *Metabolomics*. 2007;3(3):335-347. DOI 10.1007/s11306-007-0064-4.
- Farre E.M., Fernie A.R., Willmitzer L. Analysis of subcellular metabolite levels of potato tubers (*Solanum tuberosum*) displaying alterations in cellular or extracellular sucrose metabolism. *Metabolomics*. 2008;4(2):161-170. DOI 10.1007/s11306-008-0107-5.
- Fernie A.R., Schauer N. Metabolomics-assisted breeding: a viable option for crop improvement? *Trends Genet.* 2009;25(1):39-48. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2008.10.010>.
- Fernie A.R., Tauberger E., Lytovchenko A., Roessner U., Willmitzer L., Trethewey R.N. Antisense repression of cytosolic phosphoglucotase in potato (*Solanum tuberosum*) results in severe growth retardation, reduction in tuber number and altered carbon metabolism. *Planta*. 2002;214(4):510-520. DOI 10.1007/s004250100644.
- Fernie A.R., Willmitzer L. Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. *Plant Physiol.* 2001;127(4):1459-1465. DOI 10.1104/pp.010764.
- Fiehn O., Kopka J., Dormann P., Altmann T., Trethewey R.N., Willmitzer L. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnol.* 2000;18(11):1157-1161. DOI 10.1038/81137.
- Fly R., Lloyd J., Krueger S., Fernie A., Van der Merwe M.J. Improvements to define mitochondrial metabolomics using nonaqueous fractionation. *Methods Mol. Biol.* 2015;1305:197-210. DOI 10.1007/978-1-4939-2639-8_14.
- Frank T., Engel K. Metabolomic analysis of plants and crops. *Metabolomics in Food and Nutrition*. Elsevier, 2013;148-191. DOI 10.1533/9780857098818.2.148.
- Friedman M. Potato glycoalkaloids and metabolites: roles in the plant and in the diet. *J. Agric. Food Chem.* 2006;54(23):8655-8681. DOI 10.1021/jf061471t.
- Fukushima A., Engel M. Recent progress in the development of metabolome databases for plant systems biology. *Front. Plant Sci.* 2013;4:73. DOI 10.3389/fpls.2013.00073.
- Geigenberger P., Tiessen A., Meurer J. Use of non-aqueous fractionation and metabolomics to study chloroplast function in Arabidopsis. *Methods Mol. Biol.* 2011;775:135-160. DOI 10.1007/978-1-61779-237-3_8.
- Grierson C.S., Barnes S.R., Chase M.W., Clarke M., Grierson D., Edwards K.J., Jellis G.J., Jones J.D., Knapp S., Oldroyd G., Poppy G., Temple P., Williams R., Bastow R. One hundred important questions facing plant science research. *New Phytol.* 2011;192(1):6-12. DOI 10.1111/j.1469-8137.2011.03859.x.
- Guedon E., Desvaux M., Pettitdémange H. Kinetic analysis of *Clostridium cellulyticum* carbohydrate metabolism: importance of glucose 1-phosphate and glucose 6-phosphate branch points for distribution of carbon fluxes inside and outside cells as revealed by steady-state continuous culture. *J. Bacteriol.* 2000;182(7):2010-2017. DOI 10.1128/JB.182.7.2010-2017.2000.

- Hall R.D., Brouwer I.D., Fitzgerald M.A. Plant metabolomics and its potential application for human nutrition. *Physiol. Plant.* 2008; 132(2):162-175. DOI 10.1111/j.1399-3054.2007.00989.x.
- Hellwege E., Czapla S., Jahnke A., Willmitzer L., Heyer A. Transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesize the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;97(15):8699-8704. DOI 10.1073/pnas.150043797.
- Hill C.B., Taylor J.D., Edwards J., Mather D., Langridge P., Bacic A., Roessner U. Detection of QTL for metabolic and agronomic traits in wheat with adjustments for variation at genetic loci that affect plant phenology. *Plant Sci.* 2015;233:143-154. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.01.008>.
- Hoekenga O.A. Using metabolomics to estimate unintended effects in transgenic crop plants: problems, promises, and opportunities. *J. Biomol. Tech.* 2008;19(3):159-166.
- Horning E.C., Horning M.G. Human metabolic profiles obtained by GC and GC/MS. *J. Chromatogr. Sci.* 1971;9(3):129-140. DOI 10.1093/chromsci/9.3.129.
- Jaakola L. New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends Plant Sci.* 2013;18(9):477-483. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.06.003>.
- Joseph B., Atwell S., Corwin J.A., Li B., Kliebenstein D.J. Meta-analysis of metabolome QTLs in *Arabidopsis*: trying to estimate the network size controlling genetic variation of the metabolome. *Front. Plant Sci.* 2014;5:461. DOI <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00461>.
- Joseph B., Corwin J.A., Kliebenstein D.J. Genetic variation in the nuclear and organellar genomes modulates stochastic variation in the metabolome, growth, and defense. *PLoS Genet.* 2015;11(1):e1004779. DOI 10.1371/journal.pgen.1004779.
- Joseph B., Corwin J.A., Li B., Atwell S., Kliebenstein D.J. Cytoplasmic genetic variation and extensive cytonuclear interactions influence natural variation in the metabolome. *eLife.* 2013;2:e00776. DOI 10.7554/eLife.0077.
- Juzepczuk S.W., Bukasov S.M. K voprosu o proiskhozhdenii kartofelya [A contribution to the question of the origin of potato]. *Trudy Vsesoyuznogo s'ezda po genetike, selektsii, semenovodstvu i plemennomu zhivotnovodstvu* [Proceedings of the All-Union Congress on genetics, seed farming, and livestock breeding]. 1929;3:593-611. (in Russian)
- Kloosterman B., Oortwijn M., uitdeWilligen J., America T., de Vos R., Visser R.G.F., Bachem C.W. From QTL to candidate gene: genetical genomics of simple and complex traits in potato using a pooling strategy. *BMC Genomics.* 2010;11:158. DOI 10.1186/1471-2164-11-158.
- Kolbe H., Stephan-Beckmann S. Development, growth and chemical composition of the potato crop (*Solanum tuberosum* L.). II. Tuber and whole plant. *Potato Res.* 1997;40(2):135-153. DOI 10.1007/BF02358240.
- Lachman J., Hamouz K. Red and purple coloured potatoes as a significant antioxidant source in human nutrition – a review. *Plant Soil Environ.* 2005;51(11):477-482.
- Lachman J., Hamouz K., Orsák M., Pivec V. Potato tubers as a significant source of antioxidants in human nutrition. *Rostlinná Vyroba.* 2000;46(5):231-236.
- Leidreiter K., Kruse A., Heineke D., Robinson D.G., Heldt H.W. Sub-cellular volumes and metabolite concentrations in potato (*Solanum tuberosum* cv. Desiree) leaves. *Bot. Acta.* 1995;108(5):439-444. DOI 10.1111/j.1438-8677.1995.tb00518.x.
- Liebeke M., Bruford M.W., Donnelly R.K., Ebbels T.M.D., Hao J., Kille P., Lahive E., Madison R.M., Morgan A.J., Pinto-Juma G.A., Spurgeon D.J., Svendsen C., Bundy J.G. Identifying biochemical phenotypic differences between cryptic species. *Biol. Lett.* 2014; 10(9):20140615. DOI 10.1098/rsbl.2014.0615.
- López-Caamal A., Tovar-Sánchez E. Genetic, morphological, and chemical patterns of plant hybridization. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 2014; 87:16. DOI 10.1186/s40693-014-0016-0.
- Lytovchenko A., Bieberich K., Willmitzer L., Fernie A.R. Carbon assimilation and metabolism in potato leaves deficient in plastidial phosphoglucomutase. *Planta.* 2002a;215(5):802-811. DOI 10.1007/s00425-002-0810-9.
- Lytovchenko A., Sweetlove L., Pauly M., Fernie A.R. The influence of cytosolic phosphoglucomutase on photosynthetic carbohydrate metabolism. *Planta.* 2002b;215(6):1013-1021. DOI 10.1007/s00425-002-0826-1.
- Martin F., Ames J.M. Formation of Strecker aldehydes and pyrazines in a fried potato model system. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49(8):3885-3892. DOI 10.1021/jf010310g.
- Nema P.K., Ramayya N., Duncan E., Niranjana K. Potato glycoalkaloids: formation and strategies for 392 mitigation. *J. Sci. Food Agr.* 2008;88(11):1869-1881. DOI 10.1002/jsfa.3302.
- Oliver S.G., Winson M.K., Kell D.B., Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol.* 1998;16(9):373-378. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01214-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01214-1).
- Park Y., Cho J., Cho H., Yi J., Seo H., Choung M. A new potato cultivar “Hongyoung”, with red skin and flesh color, and high concentrations of anthocyanins. *Korean J. Breed. Sci.* 2009a;41(4):502-506.
- Park Y., Cho J., Cho H., Yi J., Seo H., Chung M. A new potato cultivar “Jayoung”, with high concentration of anthocyanin. *Korean J. Breed. Sci.* 2009b;41(1):51-55.
- Pauling L., Robinson A.B., Teranishi R., Cary P. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1971;68(10):2374-2376.
- Puzanskiy R.K., Shavarda A.L., Shishova M.F. Dinamika metaboloma kletok avtotrofnoy kul'tury *Chlamydomonas reinhardtii* v period eksponentsial'noy i statsionarnoy fazy rosta. [Dynamics of autotrophic *Chlamydomonas reinhardtii* metabolome during exponential and stationary phase]. *Vestnik Leningradskogo gosudarstvennogo universiteta im. A.S. Pushkina* [Vestnik of Pushkin Leningrad State University Ser. 3]. 2015;1:104-121. (in Russian)
- Raamsdonk L.M., Teusink B., Broadhurst D., Zhang N., Hayes A., Walsh M.C., Berden J.A., Brindle K.M., Kell D.B., Rowland J.J., Westerhoff H.V., van Dam K., Oliver S.G. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nature Biotechnol.* 2001;19(1):45-50. DOI 10.1038/83496.
- Ray W.J., Peck E.J. Phosphoglucomutases. *The Enzymes.* New York: Acad. Press, 1973;407-488.
- Richardson D.L., Davies H.V., Ross H.A. Potato tuber sugar content during development and storage (10 °C): possible predictors of storage potential and the role of sucrose in storage hexose accumulation. *Potato Res.* 1990;33(2):241-245. DOI 10.1007/BF02358452.
- Roessner U., Luedemann A., Brust D., Fiehn O., Linke T., Willmitzer L., Fernie A.R. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *Plant Cell.* 2001;13(1):11-29. DOI 10.1105/tpc.13.1.11.
- Roessner U., Wagner C., Kopka J., Trethewey R.N., Willmitzer L. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant J.* 2000;23(1):131-142. DOI 10.1046/j.1365-313x.2000.00774.x.
- Ruan C.J., Teixeira da Silva J.A. Metabolomics: creating new potentials for unraveling the mechanisms in response to salt and drought stress and for the biotechnological improvement of xero-halophytes. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2011;31(2):153-69. DOI <http://dx.doi.org/10.3109/07388551.2010.505908>.
- Sauter H., Lauer M., Fritsch H. Metabolic profiling of plants a new diagnostic technique. *ACS Symp. Ser.* 1991;443:288-299. DOI 10.1021/bk-1991-0443.ch024.
- Schauer N., Semel Y., Roessner U., Gur A., Balbo I., Carrari F., Pleban T., Perez-Melis A., Bruedigam C., Kopka J., Willmitzer L., Zamir D., Fernie A.R. Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nature Biotechnol.* 2006;24(4):447-454. DOI 10.1038/nbt1192.
- Shepherd L.V., Fraser P., Stewart D. Metabolomics: a second-generation platform for crop and food analysis. *Bioanalysis.* 2011;3(10):1143-1159. DOI 10.4155/bio.11.61.

- Shepherd L.V., Hackett C.A., Alexander C.J., McNicol J.W., Sungurtas J.A., McRae D., McCue K.F., Belknap W.R., Davies H.V. Impact of light-exposure on the metabolite balance of transgenic potato tubers with modified glycoalkaloid biosynthesis. *Food Chem.* 2016; 200:263-273. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.095>.
- Shepherd L.V., Hackett C.A., Alexander C.J., McNicol J.W., Sungurtas J.A., Stewart D., McCue K.F., Belknap W.R., Davies H.V. Modifying glycoalkaloid content in transgenic potato – Metabolome impacts. *Food Chem.* 2015;187:437-443. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.111>.
- Shepherd T., Dobson G., Verrall S., Conner S., Griffiths D., McNicol J., Davies H., Stewart D. Potato metabolomics by GC-MS: what are the limiting factors? *Metabolomics.* 2007;3(4):475-488. DOI [10.1007/s11306-007-0058-2](http://dx.doi.org/10.1007/s11306-007-0058-2).
- Spooner D.M., Ghislain M., Simon R., Jansky S.H., Gavrilenko T. Systematics, diversity, genetics, and evolution of wild and cultivated potatoes. *Bot. Rev.* 2014;80(4):283-383. DOI [10.1007/s12229-014-9146-y](http://dx.doi.org/10.1007/s12229-014-9146-y).
- Stacklies W., Redestig H., Scholz M., Walther D., Selbig J. pcaMethods—a bioconductor package providing PCA methods for incomplete data. *Bioinformatics.* 2007;23(9):1164-1167. DOI [10.1093/bioinformatics/btm069](http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btm069).
- Stewart D., Shepherd L.V.T. Metabolomics for the safety assessment of genetically modified (GM) crops. *Metabolomics in Food and Nutrition.* Elsevier, 2013;192-216. DOI <http://dx.doi.org/10.1533/780857098818.2.192>.
- Stewart D., Shepherd L.V.T., Hall R., Fraser P. Crops and tasty, nutritious food – How can metabolomics help? *Annual Plant Rev.* 2011;43:181-217.
- Stushnoff C., Ducreux L.J., Hancock R.D., Hedley P.E., Holm D.G., McDougall G.J., McNicol J.W., Morris J., Morris W.L., Sungurtas J.A. Flavonoid profiling and transcriptome analysis reveals new gene – metabolite correlations in tubers of *Solanum tuberosum* L. *J. Exp. Bot.* 2010;61(4):1225-1238. DOI [10.1093/jxb/erp394](http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erp394).
- Tauberger E., Fernie A.R., Emmermann M., Renz A., Kossmann J., Willmitzer L., Trethewey R.N. Antisense inhibition of plastidial phosphoglucosyltransferase provides compelling evidence that potato tuber amyloplasts import carbon from the cytosol in the form of glucose-6-phosphate. *Plant J.* 2000;23(1):43-53. DOI [10.1046/j.1365-3113.2000.00783.x](http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3113.2000.00783.x).
- Tiessen A., Nerlich A., Faix B., Hümmer C., Fox S., Trafford K., Weber H., Weschke W., Geigenberger P. Subcellular analysis of starch metabolism in developing barley seeds using a non-aqueous fractionation method. *J. Exp. Bot.* 2012;63(5):2071-2087. DOI [10.1093/jxb/err408](http://dx.doi.org/10.1093/jxb/err408).
- Trethewey R.N., Krotzky A.J., Willmitzer L. Metabolic profiling: a Rosetta Stone for genomics? *Curr. Opin. Plant Biol.* 1999;2(2):83-85. DOI [10.1016/S1369-5266\(99\)80017-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266(99)80017-X).
- Truong V.-D., Deighton N., Thompson R.T., McFeeters R.F., Dean L.O., Pecota K.V., Yencho G.C. Characterization of anthocyanins and anthocyanidins in purple-fleshed sweetpotatoes by HPLC-DAD/ESI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 2010;58(1):404-410. DOI [10.1021/jf902799a](http://dx.doi.org/10.1021/jf902799a).
- Tweeddale H., Notley-McRobb L., Ferenci T. Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool (“Metabolome”) analysis. *J. Bacteriol.* 1998;180(19):5109-5116.
- Urbanczyk-Wochniak E., Baxter C., Kolbe A., Kopka J., Sweetlove L.J., Fernie A.R. Profiling of diurnal patterns of metabolite and transcript abundance in potato (*Solanum tuberosum*) leaves. *Planta.* 2005;221(6):891-903. DOI [10.1007/s00425-005-1483-y](http://dx.doi.org/10.1007/s00425-005-1483-y).
- Uri C., Juhász Z., Polgár Z., Bánfalvi Z. A GC-MS-based metabolomics study on the tubers of commercial potato cultivars upon storage. *Food Chem.* 2014;159:287-292. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.010>.
- van Eck H.J., Jacobs J.M., Stam P., Ton J., Stiekema W.J., Jacobsen E. Multiple alleles for tuber shape in diploid potato detected by qualitative and quantitative genetic analysis using RFLPs. *Genetics.* 1994; 137(1):303-309.
- van Gelder W.M.J. Chemistry, toxicology, and occurrence of steroidal glycoalkaloids: potential contaminants of the potato (*Solanum tuberosum* L.). *Poisonous Plant Contamination of Edible Plants.* Boca Raton, Florida: CRC Press, 1990;117-156.
- Veramendi J., Willmitzer L., Trethewey R. *In vitro* grown potato microtubers are a suitable system for the study of transgenic lines altered in primary carbohydrate metabolism. *Plant Physiol. Biochem.* 1999;37(9):693-697. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)80100-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428(00)80100-X).
- Visser R.G.F., Vreugdenhil D., Hendriks D., Jacobsen T. Gene expression and carbohydrate metabolism during stolon to tuber transition in potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Physiol. Plant.* 1994;90(2):285-292. DOI [10.1111/j.1399-3054.1994.tb00389.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb00389.x).
- Weckwerth W., Loureiro M.E., Wenzel K., Fiehn O. Differential metabolic networks unravel the effects of silent plant phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004;101(20):7809-7814. DOI [10.1073/pnas.0303415101](http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0303415101).
- Wiklund S., Johansson E., Sjöström L., Mellerowicz E.J., Edlund U., Shockcor J.P., Gottfries J., Moritz T., Trygg J. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Anal. Chem.* 2008;80(1):115-122. DOI [10.1021/ac0713510](http://dx.doi.org/10.1021/ac0713510).
- Wink M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry.* 2003;64(1):3-19. DOI [10.1016/S0031-9422\(03\)00300-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00300-5).
- Wold S., Sjöström M., Eriksson L. PLS-regression: A basic tool of chemometrics. *Chemometr. Intell. Lab.* 2001;58(2):109-130. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1).
- Wolfender J.L., Rudaz S., Choi Y.H., Kim H.K. Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. *Curr. Med. Chem.* 2013;20(8):1056-1090. DOI [10.2174/0929867311320080009](http://dx.doi.org/10.2174/0929867311320080009).

Генетическая паспортизация картофеля на основе мультиплексного анализа 10 микросателлитных маркеров

О.С. Колобова¹✉, О.П. Малюченко¹, Т.В. Шалаева¹, Е.П. Шанина², И.А. Шилов¹, Я.И. Алексеев¹, Н.С. Велишаева¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Уральский научно-исследовательский институт сельского хозяйства», пос. Исток, Екатеринбург, Россия

Генетическая паспортизация сортов картофеля является востребованным инструментом для усовершенствования системы регистрации и сертификации, защиты прав селекционеров и контроля генетической однородности сортов. Наиболее перспективным подходом для различения и идентификации сортов на генетическом уровне продолжает оставаться использование микросателлитных маркеров на основе коротких tandemных повторов STR. Их амплификация с последующим электрофорезом высокого разрешения позволяет получить индивидуальную характеристику сорта – ДНК-профиль. При анализе большого количества образцов методика получения генетических профилей требует создания мультиплексных систем фрагментного анализа, что повышает требования как к отбору маркеров, так и к протоколу анализа. Для генотипирования сортов картофеля были отобраны 10 информативных STR-маркеров: STI0032, STG0016, STI0001, STI0004, STM1104, STM5127, STI0030, STI0033, STI0014, STM5114, проведен дизайн праймеров с разделением локусов по длинам и флуоресцентным меткам, разработан протокол выделения ДНК из клубней и других частей растений картофеля на основе СТАВ-метода, оптимизирован состав реакционной смеси и условия ПЦР для эффективной мультиплексной амплификации и анализа локусов методом капиллярного электрофореза. Использование генетического анализатора позволяет определять длину аллелей с точностью до одного нуклеотида и получать оцифрованные генетические профили. В исследование были включены 41 сорт отечественной и зарубежной селекции и 26 селекционных образцов. Получены уникальные профили для каждого генотипа, позволяющие различать и идентифицировать сорта и сортообразцы, для 8 сортов проведена оценка однородности. Предложенная методика генетической паспортизации позволяет провести анализ большого количества образцов в формате 96-луночного планшета в короткие сроки.

Ключевые слова: *Solanum*; картофель; фрагментный анализ; STR; генетическая идентификация.

Multiplexed set of 10 microsatellite markers for identification of potato varieties

O.S. Kolobova¹✉, O.P. Maluchenko¹, T.V. Shalaeva¹, E.P. Shanina², I.A. Shilov¹, Ya.I. Alekseev¹, N.S. Velishaeva¹

¹ All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

² Ural Research Institute of Agricultural Science, Istok, Ekaterinburg, Russia

Genetic identification of potato varieties is a demanded instrument for development of new cultivars registration system, protection of plant breeders' rights, and variety homogeneity control. The most perspective approach for distinction and identification of varieties continues to remain the use of short tandem repeats. STR amplification with the subsequent high resolution electrophoresis allows such a unique characteristic of a variety to be obtained as the DNA profile. A large scale of samples requires the creation of a robust and time-saving technique based on fragment sizing. We selected 10 polymorphic STR loci of potato: STI0032, STG0016, STI0001, STI0004, STM1104, STM5127, STI0030, STI0033, STI0014, STM5114 and designed a multiplex panel for potato DNA profiling. Fluorescent labelling of primers and size distinction of amplicons allowed us to use one tube for PCR and capillary electrophoresis. We also modified the CTAB-protocol for DNA extraction from tubers and other parts of potato plants, the PCR mix recipe and the amplification protocol for good results. Using Genetic Analyzer allows the length of alleles to be defined with an accuracy of one nucleotide and digitized genetic profiles to be developed. We created a unique DNA profile for each of 40 varieties and 23 breeding lines from Russia and other countries and evaluated the homogeneity of 8 varieties. The proposed technique of potato DNA profiling allows a large number of samples to be rapidly analyzed in the 96-well plate format.

Key words: *Solanum*; potato; fragment analysis; STR; genetic identification.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Колобова О.С., Малюченко О.П., Шалаева Т.В., Шанина Е.П., Шилов И.А., Алексеев Я.И., Велишаева Н.С. Генетическая паспортизация картофеля на основе мультиплексного анализа 10 микросателлитных маркеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(1):124-127. DOI 10.18699/VJ17.230

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kolobova O.S., Maluchenko O.P., Shalaeva T.V., Shanina E.P., Shilov I.A., Alekseev Ya.I., Velishaeva N.S. Multiplexed set of 10 microsatellite markers for identification of potato varieties. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):124-127. DOI 10.18699/VJ17.230

Received 09.01.2017

Accepted for publication 24.01.2017

© AUTHORS, 2017

 e-mail: iab@iab.ac.ru

На конец 2016 г. в «Государственном реестре селекционных достижений РФ, допущенных к использованию» (2016) находилось 410 сортов картофеля. Разработка методов генетической идентификации расширяет возможности регистрации, экспертизы и защиты прав в селекции и семеноводстве. Особенно актуальными методы генотипирования становятся при идентификации материала, размножаемого и сохраняемого *in vitro*, где морфологические сортовые признаки могут быть неярко выражены (Антонова и др., 2016).

Наиболее удобная и доступная технология генотипирования – использование микросателлитных маркеров на основе коротких tandemных повторов (short tandem repeat – STR). Эффективность этого метода для генотипирования сортов картофеля была неоднократно показана различными авторами (Велишаева и др., 2006; Reid, Kerg, 2007; Gishlan et al., 2009; Рыжова и др., 2010; Есимсеитова и др., 2015; Антонова и др., 2016). Однако предложенные ранее методики получения генетических профилей растений по каждому локусу отдельно являются трудоемкими и дорогостоящими для селекционной и хозяйственной практики, так как требуют большого числа постановок электрофореза с ограниченной емкостью геля и нередко затрудненной интерпретацией вследствие низкого разрешения или артефактов электрофореза. Для доступной и надежной идентификации сортов необходимо создание мультиплексных (определяющих генетический профиль по нескольким локусам одновременно) систем, адаптированных для работы на современном автоматическом оборудовании в формате 96-луночного планшета. Это предъявляет высокие требования к отбору маркеров и разработке технологии анализа.

Чаще всего для генетической идентификации применяются ядерные микросателлиты с три- или тетра-нуклеотидными повторами. Маркер должен содержать достаточное количество (от 2 до 20) простых повторов, иметь высокий уровень полиморфизма (5–8 аллельных состояний), не быть сцепленным с другими маркерами, не давать нуль-аллелей, т.е. отсутствия ПЦР-продукта в качестве признака.

Целью настоящей работы была разработка методики генотипирования сортов картофеля на основе мультилокусного фрагментного анализа с флуоресцентной детекцией, позволяющей быстро и точно проводить анализ большого количества образцов в формате 96-луночного планшета.

Материалы и методы

Исследование проводилось на 41 сорте отечественной и зарубежной селекции и 26 селекционных образцах картофеля, предоставленных Е.П. Шаниной (Уральский НИИСХ), В.И. Бирюковой (ВНИИКХ им. А.Г. Лорха), Ф.Ф. Замалиевой (Татарский НИИСХ): Алмаз, Амур, Барон, Бержерак, Бонни, Бордо, Браво, Вализа, Вега, Взрыв, Гала, Галактика, Горняк, Демон, Айл оф Джура, Инара, Ирбитский, Каменский, Карлингфорд, Катика, Ла Страда, Леон Хайт, Лидер, Люкс, Манхеттен, Маяк, Мишка, Молии, Монреаль, Монте Карло, Оригинал, Отрада, Пароли, Пироль, Рубес, Старт, Табор, Торонто, Чудесник, Эскуиза, Югра. В исследование бралось по три фрагмента биологического материала от разных растений одного сорта.

ДНК была выделена из листьев и клубней СТАВ-методом (Doyle J.J., Doyle J.L., 1987) с нашими модификациями, позволяющими проводить успешную экстракцию из любых частей растений картофеля. Выделение ДНК из молодых зеленых листьев не представляет проблемы, но для листьев в поздних стадиях вегетации и особенно клубней не получалось получить препараты достаточной спектрофотометрической чистоты, что отражалось на результатах амплификации локусов. Замена хлороформа на фенол-хлороформ в протоколе позволила решить эту проблему и получать препараты ДНК с количеством 100–150 нг/мкл и чистотой $A_{260/280}$ 1.8–2.0. Протоколы выделения ДНК, амплификации и фрагментного анализа приведены в Доп. материалах¹. Последовательности праймеров являются интеллектуальной собственностью авторов и предоставляются по запросу. Флуоресцентные метки были введены на 3'-конец обратных праймеров. Дендрограмма построена по методу UPGMA с использованием пакета статистических программ Statistica 6.0. Для создания аллельной лестницы ПЦР-продукты очищали на колонках, используя набор Cleanup Standart (Евроген, Россия), и клонировали с использованием вектора pAL2-T по инструкции к набору Quick-TA kit (Евроген, Россия). Первичную последовательность нуклеотидов определяли на генетическом анализаторе ABI PRISM 3130XL (ЦКП «Биотехнология» ФБГНУ ВНИИСБ).

Результаты и обсуждение

Разными исследователями были рекомендованы панели для генотипирования картофеля, включающие 24 локуса (Gishlan et al., 2009), 12 локусов (Есимсеитова и др., 2015), 14 локусов (Антонова и др., 2016), 9 локусов (Рыжова и др., 2010), 6 локусов (Reid, Kerg, 2007). Однако в этих работах локусы амплифицировались индивидуально и фрагменты анализировались в ПААГ (Велишаева и др., 2006; Рыжова и др., 2010; Есимсеитова и др., 2015) или смешивались и разгонялись попарно на системе генотипирования Li-Cor (Gishlan et al., 2009; Антонова и др., 2016), что создавало проблемы при анализе большого числа образцов. В начале нашего исследования мы выбрали 16 локусов, имеющих наибольший PIC и рекомендованных для генотипирования. По результатам эксперимента на 20 сортах картофеля мы исключили мономорфные, дающие артефакты и плохо амплифицирующиеся локусы и оставили 10 наиболее информативных локусов (см. таблицу).

Анализ 41 сорта картофеля и 26 селекционных образцов обнаружил значительное генетическое разнообразие по исследуемым локусам. Количество выявленных аллелей составляло 5–8 на локус. Поскольку геном картофеля является тетраплоидным, мы получали от 1 до 4 фрагментов ДНК в каждом локусе. Размер аллелей варьировал от 69 до 313 п. н. Все локусы имели четкие профили амплификации без образования статторов – дополнительных пиков, отличающихся на плюс-минус повтор, и других артефактов ПЦР (рис. 1). Основные аллели были секвенированы, подтверждена генетическая структура повторов и выявлен точный размер аллелей. Для проверки вос-

¹ Дополнительные материалы см. в Приложении 3 по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2017-21/appx3.pdf>

Loci involved in the system for multiplex potato variety genotyping

No.	Locus	Dye	Length, bp	Repeat	Number of alleles detected	PIC*	Chromosome
1	STI0032	FAM	69–90	(GAG)n	6	0.699	V
2	STG0016	FAM	120–153	(AGA)n	7	0.761	I
3	STI0001	FAM	175–193	(AAT)n	6	0.645	IV
4	STI0004	R6G	82–109	(AAG)n	6	0.673	VI
5	STM1104	R6G	167–191	(TTC)n	5	0.774	VIII
6	STM5127	R6G	239–269	(CTT)n	5	0.735	I
7	STI0030	ROX	88–121	(AAT)n	8	0.801	XII
8	STI0033	ROX	128–149	(AGG)n	7	0.790	VII
9	STI0014	ROX	172–190	(AGG)n	5	0.683	IX
10	STM5114	ROX	289–313	(TCT)n	6	0.781	II

* PIC, polymorphic index content according to (Nei, 1973).

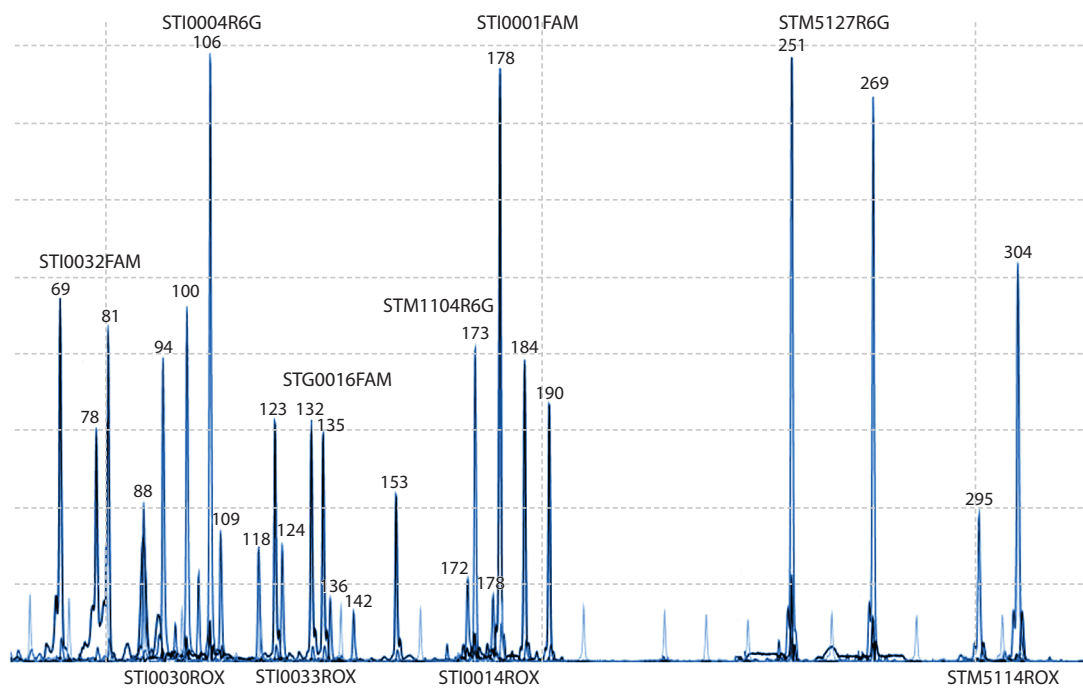


Fig. 1. Exemplary multiplex analysis of potato cv. Start. Locus designations are provided nearby peak clusters. Numerals indicate peak sizes, bp.

производимости результатов было проанализировано по 10 клубней от разных растений каждого сорта для 8 сортов Уральского НИИСХ. Для 23 сортообразцов исследовано по 5 растений, выращенных на различных селекционных участках двух учреждений и после процедуры оздоровления и получения генерации мини-клубней *in vitro*. Воспроизводимость составила 100 %.

Результаты кластерного анализа (рис. 2) показали выделение с высокой вероятностью селекционных образцов, происходящих от *S. bulbocastanum*. С высокой степенью поддержки сформировали отдельную кладу сорта цветного картофеля Bergerac и Чудесник, а также других селек-

ционных образцов с фиолетовой мякотью. Наблюдается кластеризация сортов, выведенных в одном селекционном учреждении и имеющих в родословной общих родителей (Табор, Bravo, Амур, Люкс или Взрыв и Маяк, Ирбитский и Старт). В отдельную группу попали сорта Bordeaux и Rubesse с красной кожурой и белой мякотью. Таким образом, несмотря на интенсивный обмен селекционным материалом в современной селекции картофеля и низкую степень кластеризации сортов по странам (Антонова и др., 2016), наблюдается выделение сортов с окрашенной кожурой или мякотью, содержащих относительно недавно привнесенный генетический материал диких андийских форм.

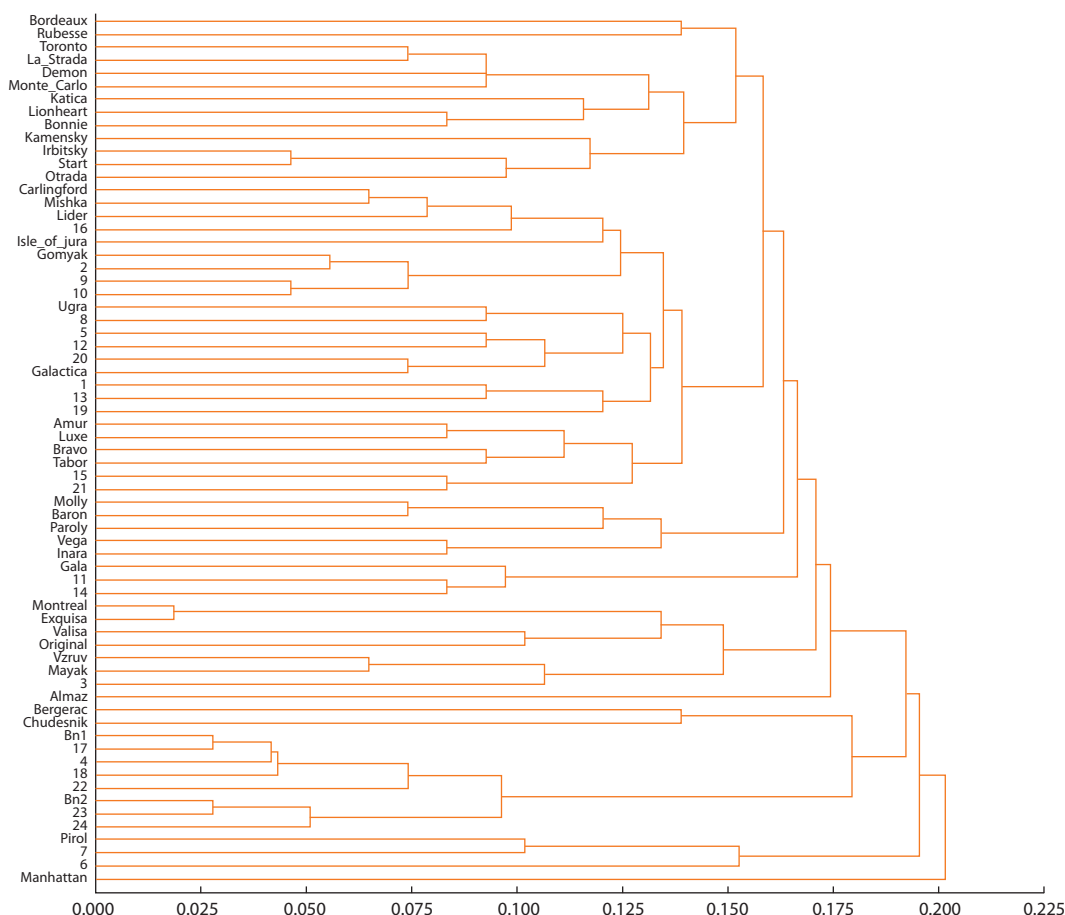


Fig. 2. UPGMA clustering dendrogram (Statistica 6.0).

Заключение

Предложенный способ генотипирования может быть использован для генетической паспортизации картофеля. Достаточное количество определяемых локусов и разнообразие аллелей позволяют получить уникальные профили по каждому сорту. Методика мультилокусного анализа дает возможность провести исследование в короткие сроки и минимизировать издержки на анализ. Клонирование основных фрагментов, изучение структуры повтора и создание аллельной лестницы – контрольного образца, содержащего смесь ДНК наиболее распространенных аллелей, позволяют получать точные аллельные профили сортов и снижают вероятность ошибок генотипирования.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0574-2015-0001 “Development of New Generation Technologies for Large-Scale Genetic Analysis of Crop Forms for Breeding Acceleration”.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

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 Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):596-606. DOI 10.18699/VJ16.181. (in Russian)

Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 1987;19:11-15.

Gishlan M., Nunez J., Herrera M., Pignataro J., Guzman F., Bonierbale M., Spooner D.M. Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. Mol. Breeding. 2009;23:377-388. DOI 10.1007/s11032-008-9240-0.

Gosudarstvennyy reestr selektsionnykh dostizheniy, dopushchennykh k ispol'zovaniyu. T. 1. Sorta rasteniy (ofitsial'noe izdanie) [State Register of Breeding Achievements Approved for Use. Varieties of Plants (official publication). V. 1. Plant cultivars]. Moscow: Rosinformagrotekh Publ., 2016; http://reestr.gossort.com/docs/reestr_2016.pdf. (in Russian)

Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1973;70:3321-3323.

Reid A., Kerr E.M. A rapid simple sequence repeat (SSR)-based identification method for potato cultivars. Plant Genet. Resources. 2007; 5(1):7-13. DOI 10.1017/S1479262107192133.

Ryzhova N.N., Martirosyan E.V., Kochieva E.Z. Analysis of microsatellite locus polymorphism in potato (*Solanum tuberosum*) cultivars of Russian breeding. Genetika = Genetics (Moscow). 2010;46(4):425-430. (in Russian)

Velishaeva N.S., Khavkin E.E., Shilov L.A. Genotyping of potato and its wild relatives by microsatellite analysis. Doklady Rossiyskoy Akademii Selskokhozyaystvennykh Nauk = Proceedings of the Russian Academy of Agricultural Sciences. 2006;5:35. (in Russian)

Yessimseitova A.K., Shustov A.V., Ahmetollaev I.A., Krassavin V.F., Kakimzhanova A.A. Molecular-genetic certification of potato varieties and forms using SSR-markers. Eurasian J. Appl. Biotechnol. (Biotechnology: Theory and Practice). 2015;2. Available at: <http://www.biotechlink.org/2-2015/article6>. (in Russian)

Plant diversity and transcriptional variability assessed by retrotransposon-based molecular markers

R.N. Kalendar , K.S. Aizharkyn, O.N. Khapilina, A.A. Amenov, D.S. Tagimanova

Republican State Enterprise "National Center for Biotechnology" under the Science Committee of Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, Astana, Kazakhstan

Molecular markers have become crucial part of genetics due to their use in various branches of it, such as positional cloning, which includes identification of genes responsible for desired traits and management of backcrossing programs, as well as in modern plant breeding, and human forensics. Retrotransposons are a major component of all eukaryotic genomes, which makes them suited as molecular markers. The retrotransposons comprise most of large genomes among plants; differences in their prevalence explain most of the variation in genome size. These ubiquitous transposable elements are scattered in all of genome and their replicative transposition allows insert itself into a genome without deletion of the original elements. Retrotransposon activity can occur during development, cell differentiation and stress, and a source of chromatin instability and genomic rearrangements. Both the overall structure of retrotransposons and the domains responsible for the various phases of their replication are highly conserved in all eukaryotes. A high proportion of the retroelements have lost their autonomous transposition ability, either by point mutations and/or deletions, many of them seem to embody defective elements with deletions. Various molecular marker systems have been developed that exploit the ubiquitous nature of these genetic elements and their property of stable integration into dispersed chromosomal loci that are polymorphic within species. The utility of LTR-retrotransposon-based markers, not only for genetic analysis and map construction, in addition also for the isolation and characterization of LTR retrotransposons, such as the long terminal repeats or the internal genes they contain. This review encompasses description of the range of retrotransposon-based marker systems established for plants and evaluation of the role of retrotransposon markers in genetic diversity analysis of plant species.

Key words: plants; polymorphism; molecular marker; repeats; retrotransposon; transposable element.

Оценка разнообразия растений и изменчивости транскрипционной активности с использованием молекулярных маркеров на основе ретротранспозонов

Р.Н. Календарь , К.С. Айжаркын, О.Н. Хапилина, А.А. Аменов, Д.С. Тагимамова

Республиканское государственное предприятие «Национальный центр биотехнологии» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, Астана, Казахстан

Молекулярные маркеры играют важную роль в генетике, поскольку используются в исследованиях различных уровней: при позиционном клонировании, которое включает определение генов, контролирующих желаемые признаки, при беккроссировании, а также в современной селекции и судебной медицине. Ретротранспозоны являются основными компонентами эукариотических геномов, что делает их удобными для использования в качестве молекулярных маркеров. Они составляют основную часть хромосом крупных геномов растений; различия в размерах геномов объясняются разным количеством ретротранспозонов. Распространенность этих мобильных элементов по всему геному объясняется их способностью к репликативной транспозиции, т.е. возможностью встраивания в геном без удаления исходного элемента. Структура ретротранспозонов в целом и их доменов, отвечающих за различные фазы их репликации, являются высококонсервативными для эукариот. Значительная часть ретротранспозонов утратила способность перемещаться самостоятельно по причине накопления множественных точечных мутаций и/или делеций. Активность ретротранспозонов может проявляться в процессе развития, на этапе дифференциации клеток, при воздействии стресса, а также может быть источником нестабильности хроматина и геномных перестроек. Для детекции генетического полиморфизма были разработаны различные системы молекулярных маркеров, основанных на распространенности ретротранспозонов по всему геному и их способности к стабильной интеграции в любые локусы хромосом. Маркеры на основе ретротранспозонов целесообразно использовать не только для проведения генетического анализа или картирования, но и для выделения, клонирования и характеристики ретротранспозонов или генов, содержащихся в них. В настоящем обзоре описаны маркерные системы, созданные на основе ретротранспозонов для исследования растений, и оценена их роль в генетическом анализе разнообразия видов растений.

Ключевые слова: растения; полиморфизм; молекулярный маркер; повторы; ретротранспозон; мобильный элемент.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Календарь Р.Н., Айжаркын К.С., Хапилина О.Н., Аменов А.А., Тагимамова Д.С. Оценка разнообразия растений и изменчивости транскрипционной активности с использованием молекулярных маркеров на основе транспозонов. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(1):128-134. DOI 10.18699/VJ17.231

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kalendar R.N., Aizharkyn K.S., Khapilina O.N., Amenov A.A., Tagimanova D.S. Plant diversity and transcriptional variability assessed by retrotransposon-based molecular markers. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):128-134. DOI 10.18699/VJ17.231

DNA markers have become a key part of genetic variability and diversity research. Scope of their usage includes creating linkage maps, diagnosis of individuals or lines carrying certain linked genes. The DNA marker system is tightly linked to developments in molecular biology and biochemistry (Lewontin, Hubby, 1966). Due to shortcomings of biochemically based markers, development of markers based on DNA polymorphisms have emerged (Kan, Dozy, 1978). This DNA marker system utilizes “fingerprints”, distinctive patterns of DNA fragments resolved by electrophoresis and detected by staining or labelling. Molecular markers work by finding nucleotide sequence variation at a particular location in the genome and when this nucleotide sequence is different between the parents of the chosen cross to be distinguishable between plant accessions and to finally study its pattern of inheritance. Molecular marker technologies experienced a huge progress when polymerase chain reaction (PCR) was introduced, enabling execution of many fingerprinting methods. Two categories can be distinguished depending on number of loci detections: single or multiplex.

Large portion of many eukaryotic organisms' genome consists of interspersed repetitive sequences, transposable elements (TEs) in particular. Interspersed repeats in most of studies species weren't distributed uniformly, but rather unevenly, with some of them being clustered around telomeres or centromeres. Variation in copy number of repeat elements and internal rearrangements on both homologous chromosomes occur after the induction of recombinational processes during the meiotic prophase. The resulting heterogeneity in the arrangement of distinguishable repeats is used for certain molecular markers techniques by targeting mentioned repeat elements.

In eukaryotic genome retrotransposons are two major transposable elements, which are defined according to their mode of propagation. They fall under class I TEs and transpose via RNA intermediate, in contrast to other transposons of class II that don't involve RNA intermediate (Finnegan, 1990). Depending on their structure and transposition cycle, retrotransposons can be classified into two main subclasses: LTR retrotransposons and the non-LTR retrotransposons: long interspersed repetitive elements (LINE) and short interspersed nuclear elements (SINE), determined by the presence or absence of long terminal repeats (LTRs) at their ends. All groups are accompanied by their respective non-autonomous forms that lack one or more of the genes essential for transposition: MITEs (miniature inverted-repeat tandem elements) for class II, SINEs for non-LTR retrotransposons, and TRIMs (terminal-repeat retrotransposons in miniature) and LARDs (large retrotransposon derivatives) for LTR retrotransposons (Kalendar et al., 2004, 2008).

Retrotransposons and retroviruses share common similarities, such as overall structural features and basic stages of the life cycle (Frankel, Young, 1998; Vicient et al., 2001; Mita, Boeke, 2016). However, unlike retroviruses, retrotransposons don't leave genome in order to infect new individuals, but insert the new copies only into their host genomes. If integration appears within a cell lineage from which pollen or egg cells are ultimately derived, new polymorphism is formed. These newly integrated copies are useful for discriminating breeding lines, varieties, or populations of plants from each other.

Retrotransposon-based marker systems

Retrotransposons are one the most fluid genomic components, fluctuating immensely in copy number over relatively short evolutionary timescale and represent a major component of the structural evolution of plant genomes (Flavell et al., 1992; Voytas et al., 1992; Macas et al., 2015). In plants, LTR retrotransposons tend to be more abundant than non-LTR (Macas et al., 2011). In many crop plants between 40–70 % of the total DNA is comprised of LTR retrotransposons (Pearce et al., 1996; Goke, Ng, 2016). Most of retrotransposons are nested, mixed, inverted or truncated in chromosomal sequences. Fragments of LTR with retrotransposons internal part are located near other retrotransposons, which allows the use LTR sequences for PCR amplification. Sites of genome with high density of retrotransposons can be used to detect their chance association with other retrotransposons. Event in which new genome integrations result from retrotransposon activity or recombination can be used for distinguishing reproductively isolation plant line. In this case, amplified bands derived from new insert or recombination will be polymorphic, appearing only in plant lines in which the insertions or recombination have taken place.

Different ways of using transposable elements as molecular markers have been designed. Their qualities such as abundance, general dispersion, and activity allow perfect conditions for developing molecular markers. By using retrotransposon sequences as molecular markers, many methods were developed as primers in the polymerase chain reaction (Kalendar, 2011; Kalendar et al., 2011). The inter-repeat amplification polymorphism techniques such as inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP), retrotransposon microsatellite amplification polymorphisms (REMAP) or inter-MITE amplification have used abundant dispersed repeats such as the LTRs of retrotransposons and SINE-like sequences (inter-SINE amplified polymorphism – ISAP) (Bureau, Wessler, 1992; Kalendar, Schulman, 2006; Wenke et al., 2011; Seibt et al., 2012), also called Alu-PCR or SINE-PCR (Charlieu et al., 1992).

Positive correlation was detected between the genome size of studied organisms and the efficiency of repeat-based amplification techniques. The larger the genome, the easier it is to develop good primers for revealing multiple bands for polymorphism detection (main cereals); organisms with small genome, such as *Brachypodium distachyon* or *Vitis vinifera*, are the hardest examples for PCR marker development (Kalendar, Schulman, 2014).

It has been proven that TE families evolve with different profiles, so TE marker systems based on different TEs show different levels of resolution and can be chosen to fit with the required analysis (Leigh et al., 2003; Kalendar, Schulman, 2006; Smykal et al., 2009; Hosid et al., 2012). Retrotransposons insertions behave as Mendelian loci (Manninen et al., 2006; Tanhuanpaa et al., 2008). Thus, retrotransposon-based markers would be expected to be co-dominant and involve a different level of genetic variability, i.e. transposition events, then arbitrary markers systems such as RAPD or AFLPs, which detect polymorphism from simple nucleotide changes to genomic rearrangements. Depending on method and primer combinations polymorphism detection tools can further be expanded knowing nearby TEs that are found in

different orientations in the genome (head-to-head, tail-to-tail, or head-to-tail).

PCR primers from one species can be used on others because related species have phylogenetically related TE sequences (retroelements or transposons), in which scenario primers designed to conservative TE sequences are advantageous. Being scattered at whole chromosome, TEs often are mixed with other elements and repeats; thus, PCR fingerprints can be improved if combination of PCR primers is used.

Following retrieval of LTR sequences of a selected family of retrotransposon, their alignment can be made to find out the most conserved region in them. The related plant species have conservative regions in LTR for identical retroelement; therefore, conservative regions can be identified through alignment of a few LTR sequences from one species or mixture with sequences from the related species (Kalendar et al., 2004; Yin et al., 2013; Moisy et al., 2014). The conservative parts of retrotransposon regions are used for the design of inverted primers for long distance PCR, for cloning of whole element and also for IRAP techniques.

Most of the retrotransposon techniques are anonymous, producing fingerprints from multiple sites of retrotransposon insertion in the genome. All of them use the combination of a known retrotransposon sequence and a variety of adjacent sequences. Target for primers are usually designed for LTRs near to the joint, in domains that are conserved within families but that differ between families. Despite regions internal to the LTR containing conserved segments could be used for this purpose, commonly to minimize size of the target to be amplified choice falls on LTR. Primer facing outward from the left or 5' LTR will necessarily face inward from the right, or 3' LTR because of LTRs being direct repeats. Depending on the nature of the second primer, the inward facing primer will either not amplify a product, produce a monomorphic band, or will detect polymorphism resulting from a nested insertion pattern. By using infrequent cutting enzyme, removal of internal amplicon can be done. To simplify the process, transposon specific primer can be obtained from an internal sequence present only once per element for retrotransposons with relatively short LTRs. Also, simplified digestion and amplification protocols can be used for S-SAP (sequence-specific amplified polymorphism) with low copy number elements. S-SAP is a modified AFLP method based on BARE-1 retroelement. The core of this method is shredding genomic DNA by using two different enzymes that produce a template for the specific primer PCR: amplification between retrotransposon and adaptors ligated at restriction sites (usually *MseI* and *PstI* or any other restriction enzyme) using selective bases in the adaptor primer. Normally LTR regions is the site where primers are produced; however, in some cases it can take place at internal part of the element, such as polypurine tract (PPT) that is located internal to the 3'-LTR in retrotransposons.

Generally, compared to AFLP, S-SAP displays more polymorphism, more chromosomal distribution, and more co-dominance, but in order to provide sites for adapter ligation as in AFLP method, for S-SAP method restriction digestion of genomic DNA is required. False genotyping results could be caused by sensitivity of commonly used restriction enzymes to DNA methylation. When the same technique used for retrotransposons is applied to DNA transposons, it is named

transposon display (TD) (Van den Broeck et al., 1998). In the *Oryza* genus, Rim2/Hipa-TD produced highly polymorphic profiles with ample reproducibility within a species as well as between species (Kwon et al., 2005).

IRAP and REMAP methods have been used in gene mapping in cereals (Manninen et al., 2000; Boyko et al., 2002; Tanhuanpaa et al., 2007), in studies of genome evolution in the Solanaceous crop species (Tek et al., 2005; Tam et al., 2009), in a variety of applications, including measurement of genetic diversity and population structure, chromatin modification and epigenetic reprogramming, similarity and cladistic relationships, determination of essential derivation, marker-assisted selection, detection of somaclonal variation (Ishizaki, Kato, 2005; Lightbourn et al., 2007; Tam et al., 2009; Belyayev et al., 2010; Smykal et al., 2011; Wenke et al., 2011; Hosid et al., 2012; Yin et al., 2013; Moisy et al., 2014; Sharma, Nandineni, 2014; Tang et al., 2014; Paz et al., 2015).

Generation of virtually unlimited number of unique markers are gained through combination of different LTR primers or with combinations with microsatellite primers (REMAP). Same primers depending if used alone or in combination produce completely different banding patterns, demonstrating most of IRAP/REMAP bands were derived from sequences bordered by other LTR or a microsatellite on one side, and by an LTR on the other. In general, more variable pattern was shown in REMAP than in ISSR; also, frequently, but not always, depending on LTR sequence, single priming PCR show less variability than IRAP pattern with primer combinations.

LTR amplification technique was derived to reach quick, robust and economic marker system for genotyping in plant breeding and marker-assisted selection (Tam et al., 2009). Genetically inherited retrotransposon families can serve as markers that can ultimately protect the rights of breeders. The pattern obtained will be related to the TE copy number, insertion pattern and size of the TE family. Amplification of a series of bands (DNA fingerprints) using primers homologous to these high copy number repeats is achievable because of association of these sequences with each other and produced markers are very informative genetic markers (Yin et al., 2013).

Transposon display has been used also as a sensitive method for detecting genomic copies of retrotransposons amidst retrotransposon cDNAs (Jaaskelainen et al., 1999), in detecting cDNA polymorphism and clonal differences resulting from retrotransposon activities or retrotransposon recombination after crossing-over (Kalendar et al., 2010; Monden et al., 2014). LTR amplification technique displays is also efficient in examine genome structure and evolution in Solanaceous crop species, and in chromosome structure and transmission (Manetti et al., 2007, 2009; Novakova et al., 2009; Park et al., 2012; Michael, 2014; Na et al., 2014; Tang et al., 2014).

Insertion polymorphism of active retrotransposon families (Rtsp-1 and Lib) was used for DNA fingerprinting in sweet potato (*Ipomoea batatas*). Constructed phylogenetic tree using these insertion sites showed strong correspondence with pedigree information, proving this method could be utilized for genetic diversity studies. Thus, without a need for whole genome sequence information genome-wide comparative analysis of active retrotransposon insertion sites is effective approach for DNA fingerprinting. This method could

facilitate development of cultivar diagnostic system based on PCR and determination of genetic relationships (Monden et al., 2014).

Due to abundance of SINE repetitive sequences in almost all plant genomes, it can be effectively used for genotyping (Wenke et al., 2011; Seibt et al., 2012). Potato served as a sample plant to develop ISAP method, and it is also possible to apply this method on another species (Seibt et al., 2012; Wenke et al., 2015). Two selected SINE families, SolS-IIIa and SolS-IV, were shown to be highly but differently amplified in Solanaceae, *Solaneae* tribe, including wild and cultivated potatoes, tomato, and eggplant. Genome-wide distribution of SolS-IIIa and SolS-IV along potato chromosomes, which is the basis for genotype discrimination and differentiation of somaclonal variants by ISAP markers, was shown through fluorescent *in situ* hybridization (Seibt et al., 2012). Study of activity of retrotransposons in inter- and intraspecific hybrids between *Solanum kurtzianum* and *S. microdontum* observed that at morphological level intraspecific hybrids' genotypes remained same as their parents', while genotypes of interspecific hybrids have been altered. Analysis of genotypes showed mobility of both retrotransposons (Tto1 and Tnt1) used, ranging from 0 to 7.8 %. In comparison to their parental genotype, hybrids were epigenetically changed by demethylation in the vicinity of Tnt1 and Tto1, which correlates with the activity of retrotransposons. Those results indicate that retrotransposon activation can lead to genetic variability in tuber-bearing species of *Solanum* via hybridization (Paz et al., 2015).

Retrotransposons and transcriptional variability of genome of *Solanaceous* crop species

Two most important Solanaceae species from *Solaneae* tribe, *Solanum tuberosum* and *S. lycopersicum*, are almost fully sequenced with approximately 85 % of *S. tuberosum* genome and 95 % of *S. lycopersicum* genome being known to this day. Out of total genome size of 810.6 MB, 15.78 % (127,958,425 bp) of *S. tuberosum* has yet to be sequenced, and as for *S. lycopersicum*, 5 % (44,030,063 bp) out of 781.6 MB isn't still sequenced (Mehra et al., 2015). Many plant species contain repetitive elements in their genome, sometimes reaching 80 %, such as wheat. As for *S. tuberosum* and *S. lycopersicum*, ~49 % and ~60 % of their genome is comprised of repetitive elements, respectively. Among other genetic elements, there are 629,713 complex repetitive elements in *S. tuberosum* and 589,561 in *S. lycopersicum*, with both having chromosome 12 as most repeat rich. Among identified repeat families, DNA transposons and retrotransposons are included (Tang et al., 2014). There are increasing number of reports suggesting repetitive elements carry important functions in the genome, for instance, it was detected that they're abundant in gene-coding region. Many repetitive elements have been detected upstream of protein coding genes – regulatory regions. Some are found in introns, where they become exonized or domesticated. Most prevalent repetitive super family in both species is LTR/Gypsy, with 334,474 and 306,511 repetitive elements in *S. tuberosum* and *S. lycopersicum*, respectively. Following LTR Gypsy, other super families, such as LTR Copia and LINE elements L1, occupy much of both species' genome. Thus, LTR is the most abundant complex repetitive element in *S. tuberosum* and *S. lycopersicum*. Twelve chromosomes of both species

are highly syntenic to each other, having high similarity for genes and repeats distribution (Mehra et al., 2015).

The study of genic regions has shown that, 99.29 % (38,740 genes out of 39,021 genes) of *S. tuberosum* genes had repeats overlapping either with their coding sequence or with the 5 kb upstream region, whereas in *S. lycopersicum* 98.92 % (34,303 genes out of 34,675 genes) genes had repeats overlapping with their genic regions and/or with the 5 kb upstream region. These results suggest that in both species repetitive sequences have impact on majority of protein coding genes. Analysis of various repeat families (LINE elements RTE-BovB, SINE elements and DNA transposon Stowaway) in *S. tuberosum* indicated big portion of repetitive elements are located within genic regions, as well as in *S. lycopersicum*, where the DNA transposons hAT-Tag1, hAT-Tip100, PIF-Harbinger, RC Helitron and SINEs were found in abundance in genic region, while genic region showed notable preference for LTR/ERV1 repeat family (Mehra et al., 2015).

Introns with repetitive elements have shown to impact the spatio-temporal expression of genes, creation of cryptic splices sites and other effects, while insertion of repetitive elements is thought to be more destructive, and associated with many disease conditions. Thus, detailed study of insertion of repetitive elements is crucial to further understand mechanism that lets repetitive elements influence genes and their products. In *S. tuberosum*, insertion preference of repeat families in either exonic or intronic regions wasn't noticed, whereas in *S. lycopersicum* DNA transposon MULE/MuDR and LTR/ERV1 prevailed in exonic region and DNA transposons, TcMar-Stowaway, LINE elements RTE-BovB and SINE elements accumulated in intronic regions.

Epigenetic control and retrotransposon activity

Methylation status of TEs in plants was correlated with lower transcription of genes with TE insertions. Also, more systematic knowledge about the influence of stress or environmental cues on epigenetic control of retrotransposons as well as impact of TEs on phenotypic plasticity is still unclear (Hollister, Gaut, 2009). The stochastic and sometime incomplete nature of epigenetic silencing of retrotransposons may help explain stress surviving, heterosis and the genome dominance phenomenon for intraspecific cross hybrids. Repetitive element mobilization represents a destabilizing process for the host cell. Several mechanisms such as DNA and histone methylation and RNAi, actively suppress retrotransposon expression (Vetukuri et al., 2011). The epigenetic mechanisms controlling retroelements may well follow retrotransposons during their movement 'around' the genome and thereby modify the epigenetic control of retrotransposition targeted loci.

In the plant genome, insertional inactivation and other genome rearrangements lead to a wide spectrum of recombination and chromosomal instability (Belyayev et al., 2010). Retroelement-induced genetic rearrangements can lead to non-allelic homologous recombination or insertional mutagenesis due to the 'hopping' of retrotransposons within gene coding sequences; it causes diverse effects on target gene expression depending on intragenic location, orientation, length of the inserted sequence and other factors, or activation mobilization of small RNAs.

Studies have suggested repetitive elements cause speciation through regulatory variability. It was found that transcription factors (TFs) that partake in main metabolic pathways and defence response are associated with repetitive elements. In *S. tuberosum*, out of total binding sites of I-box, member of Myb-group of transcription factors, gained/lost in the 2 kb upstream region of the genes, around 36 % were found to be overlapping with repetitive elements. I-box promoter motif is considered to be involved in response mechanism to light and another TF SORLIP2 (sequences over-represented in light-induced promoters – SORLIPs) has been linked to light-induced genes in some plants, which was found to have significant gain of their TF binding sites in the orthologous genes of *S. tuberosum* with ~23 % of them occurring in repetitive region. Similarly, other TFs, such as G-Box and MADS, were associated with repetitive regions. Functions of these TFs include response to stress, light, abscisic acid, and other metabolites as well as taking part in development processes (flower development and gametophyte, embryo and seed development). Above examples indicate integration of repetitive sequences in plants is beneficial for their survival purposes, as opposed to initial speculations of them being “junks” (Mehra et al., 2015).

In addition, repetitive elements have been found to be associated with miRNAs, small non-coding RNAs responsible for regulation of 60–70 % genes in an organism. Examining multiple loci of miRNA in both species showed that most of them were overlapping with different repetitive elements, 242 and 77 miRNA in *S. tuberosum* and *S. lycopersicum*, respectively. Most prevalent repeat families were found to be LTR/Gypsy in *S. tuberosum*, and DNA transposons in *S. lycopersicum*. By performing binomial test, probability of miRNA enrichment was calculated, where *p*-values of *S. tuberosum* (4.136×10^{-10}) and *S. lycopersicum* (1.819×10^{-12}) were obtained. Calculated numbers indicate miRNAs were enriched around repetitive elements.

Another small non-coding RNAs repetitive elements have been associated with are siRNA, which can silence repetitive elements through post transcriptional gene silencing mechanisms (PTGS) by creating feed-back-loop. Transcriptional activity of repetitive elements besides controlling repetitive elements, can as well provide tissue specific expression of certain genes (Mehra et al., 2015). A fair number of expressive repetitive elements have been linked to small RNAs/siRNA biogenesis, some of which are involved in gene regulation in either *cis* or *trans* manner. While some sRNAs partake in post transcriptional gene silencing, other such RNAs are involved in *de novo* DNA methylation in plant genome. With increasing number of reports, sRNAs are now thought to be core members of post transcriptional as well as RdDM based transcriptional gene regulatory processes. Involvement of repetitive elements in biogenesis of sRNAs indicate their importance in gene regulatory system of *Solanum* species.

Perspectives and implications

Many features of retrotransposons, such as ubiquity and dispersion in eukaryotic genome, make them appealing as the basis of molecular marker systems. Because of their repetitive nature, retrotransposons are a source of chromatin instability and genomic rearrangements with deleterious consequences

(Belyayev et al., 2010). Newly inserted retrotransposons created instability and influence gene expression of flanking regions by modifying their methylation status. Retrotransposons can also impact gene regulation simply by inserting their own internal regulatory sequences (promoters, enhancers) in new genomic loci upon retrotransposition. A high proportion of the retroelements have lost their autonomous transposition ability, either by point mutations and/or deletions, many of them seem to embody defective elements with deletions.

Genome diversification results from their past activity and by recombination events, which provides a means of its detection. Their integration can be detected by conserved sequences. Retrotransposons are long and produce a large genetic change at the point of insertion, thereby providing conserved sequences that can be used to detect their own integration. This event isn't related to deletion of the transposable element from another locus, as it is for DNA transposons. Even the loss of the core domain of a retrotransposon by LTR-LTR recombination is invisible to the marker methods using outward-facing LTR primers. The ancestral state of a retrotransposon insertion is obvious – it is the empty site, which is very useful in pedigree and phylogenetic analyses. Original empty sites are unlikely to be regenerated by later recombination processes at a full site. Retroelements were used to clarify the relationships between related species.

Previously mentioned DNA markers based on LTR retrotransposons are usually referred to as “transposon display”. The applications range from investigations of retrotransposon activation and mobility to studies of biodiversity, genome evolution, chromatin modification, epigenetic reprogramming, mapping of genes and the estimation of genetic distance, to assessment of essential derivation of varieties, detection of somaclonal variation and cDNA fingerprinting. Only those retrotransposon insertions are useful, which are passed into the egg cells and pollen. Thus, they could possibly be considered as sexually transmitted diseases, but that moves by a cellular, rather than extracellular, pathway into the new host.

The utility of LTR-retrotransposon-based markers, not only for genetic analysis and map construction, in addition also for the isolation and characterization of LTR retrotransposons, such as the long terminal repeats or the internal genes they contain.

In plants, analogous approaches have been adopted to the non-LTR retrotransposons, specifically to SINE elements. The insertion pattern of the human Alu, a SINE and the most prevalent transposable element in the human genome, were not only used for research on human population structure, but as well as in studies of heritable diseases. In essence, effective application of retrotransposon- or endogenous retrovirus-based molecular markers could be established for use on animals, including mammals and birds.

Platforms for commercial next-generation DNA sequencing techniques (NGS) of have been developed and found wide range of use for major crops, domestic animals, and humans. Abundance of sequence data is crucial for the development of new molecular markers. While genetic analysis by shotgun sequencing appears to be a promising method, cost is still the limit; therefore, cheap, generic, easily applied retrotransposon marker systems will stay as most applicable method for the foreseeable future.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Belyayev A., Kalendar R., Brodsky L., Nevo E., Schulman A.H., Raskina O. Transposable elements in a marginal plant population: temporal fluctuations provide new insights into genome evolution of wild diploid wheat. *Mobile DNA*. 2010;1(6):1-16. DOI 10.1186/1759-8753-1-6.
- Boyko E., Kalendar R., Korzun V., Fellers J., Korol A., Schulman A.H., Gill B.S. A high-density cytogenetic map of the *Aegilops tauschii* genome incorporating retrotransposons and defense-related genes: insights into cereal chromosome structure and function. *Plant Mol. Biol.* 2002;48(5):767-790. DOI 10.1023/A:1014831511810.
- Bureau T.E., Wessler S.R. Tourist: a large family of small inverted repeat elements frequently associated with maize genes. *Plant Cell*. 1992;4(10):1283-1294. DOI 10.1105/tpc.4.10.1283.
- Charlier J.P., Laurent A.M., Carter D.A., Bellis M., Roizes G. 3' Alu PCR: a simple and rapid method to isolate human polymorphic markers. *Nucl. Acids Res.* 1992;20(6):1333-1337. DOI 10.1093/nar/20.6.1333.
- Finnegan D.J. Transposable elements and DNA transposition in eukaryotes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1990;2(3):471-477. DOI 10.1016/0955-0674(90)90130-7.
- Flavell A.J., Dunbar E., Anderson R., Pearce S.R., Hartley R., Kumar A. Ty1-copia group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants. *Nucl. Acids Res.* 1992;20(14):3639-3644. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1379359>.
- Frankel A.D., Young J.A. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 1998;67:1-25. DOI 10.1146/annurev.biochem.67.1.1.
- Goke J., Ng H.H. CTRL+INSERT: retrotransposons and their contribution to regulation and innovation of the transcriptome. *EMBO Rep.* 2016;17(8):1131-1144. DOI 10.15252/embr.201642743.
- Hollister J.D., Gaut B.S. Epigenetic silencing of transposable elements: a trade-off between reduced transposition and deleterious effects on neighboring gene expression. *Genome Res.* 2009;19(8):1419-1428. DOI 10.1101/gr.091678.109.
- Hosid E., Brodsky L., Kalendar R., Raskina O., Belyayev A. Diversity of long terminal repeat retrotransposon genome distribution in natural populations of the wild diploid wheat *Aegilops speltoides*. *Genetics*. 2012;190(1):263-274. DOI 10.1534/genetics.111.134643.
- Ishizaki T., Kato A. Introduction of the tobacco retrotransposon Tto1 into diploid potato. *Plant Cell Rep.* 2005;24(1):52-58. DOI 10.1007/s00299-005-0919-y.
- Jaaskelainen M., Mykkanen A.H., Arna T., Vicient C.M., Suoniemi A., Kalendar R., Savilahti H., Schulman A.H. Retrotransposon BARE-1: expression of encoded proteins and formation of virus-like particles in barley cells. *Plant J.* 1999;20(4):413-422. DOI 10.1046/j.1365-3113x.1999.00616.x.
- Kalendar R. The use of retrotransposon-based molecular markers to analyze genetic diversity. *Ratarstvo i Povrtarstvo*. 2011;48(2):261-274. DOI 10.5937/ratpov1102261K.
- Kalendar R., Antonius K., Smykal P., Schulman A.H. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theor. Appl. Genet.* 2010;121(8):1419-1430. DOI 10.1007/s00122-010-1398-2.
- Kalendar R., Flavell A.J., Ellis T.H., Sjakste T., Moisy C., Schulman A.H. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. *Heredity*. 2011;106(4):520-530. DOI 10.1038/hdy.2010.93.
- Kalendar R., Schulman A. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nature Protocols*. 2006;1(5):2478-2484. DOI 10.1038/nprot.2006.377.
- Kalendar R., Schulman A.H. Transposon-based tagging: IRAP, REMAP, and iPBS. *Methods Mol. Biology*. 2014;1115:233-255. DOI 10.1007/978-1-62703-767-9_12.
- Kalendar R., Tanskanen J., Chang W., Antonius K., Sela H., Peleg O., Schulman A.H. *Cassandra* retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008;105(15):5833-5838. DOI 10.1073/pnas.0709698105.
- Kalendar R., Vicient C.M., Peleg O., Ananthawat-Jonsson K., Bolshoy A., Schulman A.H. Large retrotransposon derivatives: abundant, conserved but nonautonomous retroelements of barley and related genomes. *Genetics*. 2004;166(3):1437-1450. DOI 10.1534/genetics.166.3.1437.
- Kan Y.W., Dozy A.M. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1978;75(11):5631-5635. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC393021/>.
- Kwon S.J., Park K.C., Kim J.H., Lee J.K., Kim N.S. Rim 2/Hipa CAC-TA transposon display: a new genetic marker technique in *Oryza* species. *BMC Genet.* 2005;6:15. DOI 10.1186/1471-2156-6-15.
- Leigh F., Kalendar R., Lea V., Lee D., Donini P., Schulman A.H. Comparison of the utility of barley retrotransposon families for genetic analysis by molecular marker techniques. *Mol. Genet. Genomics*. 2003;269(4):464-474. DOI 10.1007/s00438-003-0850-2.
- Lewontin R.C., Hubby J.L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*. 1966;54(2):595-609. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5968643>.
- Lightbourn G.J., Jelesko J.G., Veilleux R.E. Retrotransposon-based markers from potato monolipids used in somatic hybridization. *Genome*. 2007;50(5):492-501. DOI 10.1139/g07-026.
- Macas J., Kejnovsky E., Neumann P., Novak P., Koblikova A., Vyskot B. Next generation sequencing-based analysis of repetitive DNA in the model dioecious [corrected] plant *Silene latifolia*. *PLoS ONE*. 2011;6(11):e27335. DOI 10.1371/journal.pone.0027335.
- Macas J., Novak P., Pellicer J., Cizkova J., Koblikova A., Neumann P., Fukova I., Dolezel J., Kelly L.J., Leitch I.J. In depth characterization of repetitive DNA in 23 plant genomes reveals sources of genome size variation in the legume tribe *Fabeae*. *PLoS ONE*. 2015;10(11):e0143424. DOI 10.1371/journal.pone.0143424.
- Manetti M.E., Rossi M., Costa A.P., Clausen A.M., Van Sluys M.A. Radiation of the Tnt1 retrotransposon superfamily in three Solanaceae genera. *BMC Evol. Biol.* 2007;7:34. DOI 10.1186/1471-2148-7-34.
- Manetti M.E., Rossi M., Nakabashi M., Grandbastien M.A., Van Sluys M.A. The Tnt1 family member Retrosol copy number and structure disclose retrotransposon diversification in different *Solanum* species. *Mol. Genet. Genomics*. 2009;281(3):261-271. DOI 10.1007/s00438-008-0408-4.
- Manninen O., Jalli M., Kalendar R., Schulman A., Afanasenko O., Robinson J. Mapping of major spot-type and net-type net-blotch resistance genes in the Ethiopian barley line CI 9819. *Genome*. 2006;49(12):1564-1571. DOI 10.1139/g06-119.
- Manninen O., Kalendar R., Robinson J., Schulman A. Application of BARE-1 retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley. *Mol. Genet. Genomics*. 2000;264(3):325-334. DOI 10.1007/s004380000326.
- Mehra M., Gangwar I., Shankar R. A deluge of complex repeats: the *Solanum* genome. *PLoS ONE*. 2015;10(8):e0133962. DOI 10.1371/journal.pone.0133962.
- Michael T.P. Plant genome size variation: bloating and purging DNA. *Brief Funct. Genomics*. 2014;13(4):308-317. DOI 10.1093/bfpg/elu005.
- Mita P., Boeke J.D. How retrotransposons shape genome regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2016;37:90-100. DOI 10.1016/j.gde.2016.01.001.
- Moisy C., Schulman A.H., Kalendar R., Buchmann J.P., Pelsy F. The Ttv1 retrotransposon family is conserved between plant genomes separated by over 100 million years. *Theor. Appl. Genet.* 2014;127(5):1223-1235. DOI 10.1007/s00122-014-2293-z.
- Monden Y., Yamamoto A., Shindo A., Tahara M. Efficient DNA fingerprinting based on the targeted sequencing of active retrotransposon insertion sites using a bench-top high-throughput sequencing platform. *DNA Res.* 2014;21(5):491-498. DOI 10.1093/dnares/dsu015.

- Na J.K., Wang J., Ming R. Accumulation of interspersed and sex-specific repeats in the non-recombining region of papaya sex chromosomes. *BMC Genomics*. 2014;15:335. DOI 10.1186/1471-2164-15-335.
- Novakova A., Simackova K., Barta J., Curn V. Potato variety identification by molecular markers based on retrotransposon analyses. *Czech J. Genet. Plant Breeding*. 2009;45(1):1-10. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000264852600001.
- Park M., Park J., Kim S., Kwon J.K., Park H.M., Bae I.H., Yang T.J., Lee Y.H., Kang B.C., Choi D. Evolution of the large genome in *Capsicum annuum* occurred through accumulation of single-type long terminal repeat retrotransposons and their derivatives. *Plant J.* 2012;69(6):1018-1029. DOI 10.1111/j.1365-3113X.2011.04851.x.
- Paz R.C., Rendina González A.P., Ferrer M.S., Masuelli R.W. Short-term hybridisation activates Tnt1 and Tto1 Copia retrotransposons in wild tuber-bearing *Solanum* species. *Plant Biol.* 2015;17(4):860-869. DOI 10.1111/plb.12301.
- Pearce S.R., Harrison G., Li D., Heslop-Harrison J., Kumar A., Flavell A.J. The *Ty1-copia* group retrotransposons in *Vicia* species: copy number, sequence heterogeneity and chromosomal localisation. *Mol. Genet. Genetics*. 1996;250(3):305-315. DOI 10.1007/BF02174388.
- Seibt K.M., Wenke T., Wollrab C., Junghans H., Muders K., Dehmer K.J., Diekmann K., Schmidt T. Development and application of SINE-based markers for genotyping of potato varieties. *Theor. Appl. Genet.* 2012;125(1):185-196. DOI 10.1007/s00122-012-1825-7.
- Sharma V., Nandineni M.R. Assessment of genetic diversity among Indian potato (*Solanum tuberosum* L.) collection using microsatellite and retrotransposon based marker systems. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2014;73:10-17. DOI 10.1016/j.ympev.2014.01.003.
- Smykal P., Bacova-Kertesova N., Kalendar R., Corander J., Schulman A.H., Pavelek M. Genetic diversity of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) germplasm assessed by retrotransposon-based markers. *Theor. Appl. Genet.* 2011;122(7):1385-1397. DOI 10.1007/s00122-011-1539-2.
- Smykal P., Kalendar R., Ford R., Macas J., Griga M. Evolutionary conserved lineage of *Angela*-family retrotransposons as a genome-wide microsatellite repeat dispersal agent. *Heredity*. 2009;103(2):157-167. DOI 10.1038/hdy.2009.45.
- Tam S.M., Lefebvre V., Palloix A., Sage-Palioix A.M., Mhiri C., Grandbastien M.A. LTR-retrotransposons Tnt1 and T135 markers reveal genetic diversity and evolutionary relationships of domesticated peppers. *Theor. Appl. Genet.* 2009;119(6):973-989. DOI 10.1007/s00122-009-1102-6.
- Tang X., Datema E., Guzman M.O., de Boer J.M., van Eck H.J., Bachem C.W., Visser R.G., de Jong H. Chromosomal organizations of major repeat families on potato (*Solanum tuberosum*) and further exploring in its sequenced genome. *Mol. Genet. Genomics*. 2014;289(6):1307-1319. DOI 10.1007/s00438-014-0891-8.
- Tanhuanpaa P., Kalendar R., Schulman A.H., Kiviharju E. A major gene for grain cadmium accumulation in oat (*Avena sativa* L.). *Genome*. 2007;50(6):588-594. DOI 10.1139/g07-036.
- Tanhuanpaa P., Kalendar R., Schulman A.H., Kiviharju E. The first doubled haploid linkage map for cultivated oat. *Genome*. 2008;51(8):560-569. DOI 10.1139/G08-040.
- Tek A.L., Song J., Macas J., Jiang J. Sobo, a recently amplified satellite repeat of potato, and its implications for the origin of tandemly repeated sequences. *Genetics*. 2005;170(3):1231-1238. DOI 10.1534/genetics.105.041087.
- Van den Broeck D., Maes T., Sauer M., Zethof J., De Keuleleire P., D'Hauw M., Van Montagu M., Gerats T. *Transposon Display* identifies individual transposable elements in high copy number lines. *Plant J.* 1998;13(1):121-129. DOI 10.1046/j.1365-3113X.1998.00004.x.
- Vetukuri R.R., Tian Z., Avrova A.O., Savenkov E.I., Dixelius C., Whisson S.C. Silencing of the *PiAvr3a* effector-encoding gene from *Phytophthora infestans* by transcriptional fusion to a short interspersed element. *Fungal Biol.* 2011;115(12):1225-1233. DOI 10.1016/j.funbio.2011.08.007.
- Vicient C.M., Jaaskelainen M.J., Kalendar R., Schulman A.H. Active retrotransposons are a common feature of grass genomes. *Plant Physiol.* 2001;125(3):1283-1292. DOI 10.1104/pp.125.3.1283.
- Voytas D.F., Cummings M.P., Konieczny A., Ausubel F.M., Rodermeel S.R. *copia*-like retrotransposons are ubiquitous among plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992;89(15):7124-7128. DOI 10.1073/pnas.89.15.7124.
- Wenke T., Dobel T., Sorensen T.R., Junghans H., Weisshaar B., Schmidt T. Targeted identification of short interspersed nuclear element families shows their widespread existence and extreme heterogeneity in plant genomes. *Plant Cell*. 2011;23(9):3117-3128. DOI 10.1105/tpc.111.088682.
- Wenke T., Seibt K.M., Dobel T., Muders K., Schmidt T. Inter-SINE Amplified Polymorphism (ISAP) for rapid and robust plant genotyping. *Methods Mol. Biol.* 2015;1245:183-192. DOI 10.1007/978-1-4939-1966-6_14.
- Yin H., Liu J., Xu Y., Liu X., Zhang S., Ma J., Du J. *TARE1*, a mutated *Copia*-like LTR retrotransposon followed by recent massive amplification in tomato. *PLoS ONE*. 2013;8(7):e68587. DOI 10.1371/journal.pone.0068587.



Изменчивость ISSR-маркеров и оценка наследования диагностических признаков у StY-геномных видов *Elymus pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* (Poaceae: Triticeae)

Е.В. Кобозева^{1, 2}✉, С.В. Асбаганов¹, О.В. Дорогина¹, А.В. Агафонов¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск, Россия

В настоящее время предлагаются к признанию три самостоятельных вида рода *Elymus* подсекции *Pendulini* в пределах России: *E. pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus*. Диагностическими признаками для различения видов считаются наличие и типы трихом узлов стебля (УС) и нижних цветковых чешуй (НЦЧ), а также экологические условия произрастания. В Приморском крае и Республике Алтай нами обнаружен ряд смешанных популяций, в которых существует визуально непрерывная изменчивость по типу трихом НЦЧ: от голых и гладких до длинноволосистых. Кроме того, в Приморском крае найден ряд популяций, в которых совместно произрастают особи как с гладкими, так и с волосистыми УС. Изучен полиморфизм ISSR-маркеров среди выборочных образцов трех видов из разных точек ареала вместе с реперными видами *E. ciliaris* и *E. gmelinii*. Консенсусная дендрограмма, построенная по результатам использования ISSR-маркеров, показала отсутствие видовой специфичности у образцов подсекции *Pendulini*. Созданы гибриды между особями разных видов подсекции в шести комбинациях скрещиваний. У всех растений F₁ были нормально развитые открытые пыльники, семенная фертильность в разных комбинациях составляла от 8 до 89 %. В выборках F₂ отсутствовали стерильные особи и наблюдалось увеличение семенной фертильности до нормальных значений. Следовательно, три таксона формируют единый рекомбинационный генпул. Выявлено, что диагностические признаки контролируются одной парой аллелей по опушению УС и одной или двумя парами аллелей (в различных комбинациях скрещивания) по опушению НЦЧ. Данные признаки представляют собой нормальное проявление внутривидовой изменчивости. Предложено рассматривать виды *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* в качестве внутривидовых таксонов *E. pendulinus* s. l. в ранге разновидностей.

Ключевые слова: *Elymus*; таксономия; диагностические признаки; ISSR-маркеры; гибридизация; семенная фертильность.

Variability of ISSR markers and estimation of inheritance of diagnostic characters among StY-genome species of *Elymus pendulinus*, *E. brachypodioides* and *E. vernicosus* (Poaceae: Triticeae)

E.V. Kobozeva^{1, 2}✉, S.V. Asbaganov¹,
O.V. Dorogina¹, A.V. Agafonov¹

¹ Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Novosibirsk, Russia

² National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

Currently three species are recognized in Russia within the genus *Elymus* subsection *Pendulini*, namely, *E. pendulinus*, *E. brachypodioides* and *E. vernicosus*. The degree and quality of lemma and stem node vestitures and ecology are considered important characters for species delineation. In Primorsky krai and Altai Republic we have found a number of mixed populations in which there is visually continuous variation in lemmas vestitures from being completely glabrous to densely puberulent or pilose. Additionally, there are a number of populations in Primorsky krai in which individuals having either smooth or pilous stem nodes grow together. A study of polymorphism of ISSR markers among selective accessions of three species from different locations was carried out together with the reference species *E. ciliaris* and *E. gmelinii*. The consensus dendrogram constructed by results of ISSR markers has shown no taxon specific patterns in accessions of the subsection *Pendulini*. Hybrids between the individuals of different species of the subsection in six cross combinations have been created. All F₁ plants had normally developed open anthers, seed fertility (SF) ranged from 8 % to 89 % in different combinations. In F₂ populations no sterile individuals or increase of SF up to normal values were observed. Hence, three taxa form a unified recombination gene pool. The diagnostic characters were found to be controlled by one pair of alternative alleles for glabrous vs. hairy stem nodes, and by one or two pairs of alleles in different cross combinations for glabrous vs. hairy



lemmas. These characters can be considered as normal inter- and/or intra-population variation. Therefore, *E. brachypodioides* and *E. vernicosus* need to be relegated to infraspecific rank within *Elymus pendulinus* s. l. as varieties.

Key words: *Elymus*; taxonomy; diagnostic features; ISSR markers; hybridization; seed fertility.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Кобозева Е.В., Асбаганов С.В., Дорогина О.В., Агафонов А.В. Изменчивость ISSR-маркеров и оценка наследования диагностических признаков у StY-геномных видов *Elymus pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* (Poaceae: Triticeae). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(1):135-145. DOI 10.18699/VJ17.232

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kobozeva E.V., Asbaganov S.V., Dorogina O.V., Agafonov A.V. Variability of ISSR markers and estimation of inheritance of diagnostic characters among StY-genome species of *Elymus pendulinus*, *E. brachypodioides* and *E. vernicosus* (Poaceae: Triticeae). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(1):135-145. DOI 10.18699/VJ17.232

Проблема критериев таксона любого уровня и в первую очередь критериев вида остается актуальной для эволюционной биологии в целом и особенно для систематики дикорастущих растений. По мнению К.М. Завадского (1968), развившего учение о виде Н.И. Вавилова, характерными признаками, присущими всем видам, являются: численность, дискретность, экологическая и географическая определенность, многообразие форм, целостность и внутренняя структура, единая наследственная основа и эволюционное развитие в виде самостоятельной филогенетической ветви, воспроизводимость, устойчивость существования в природе. Идентифицировать вид только с какой-либо одной позиции было бы ошибочным, поскольку среди перечисленных признаков нет ни одного, который можно было бы использовать как единственный, абсолютный видовой критерий (Завадский, 1968). При изучении популяционной и таксономической структуры, происхождения и эволюции видов необходимо опираться на комплекс признаков и все доступные видовые критерии – морфологический, географический, экологический, биохимический, репродуктивный, генетический и др. (Тахтаджян, 1970).

В последние годы вопрос самостоятельности (обособленности) таксонов видового и подвидового рангов в ботанике становится особенно актуальным. Накопление множества данных, извлекаемых из гербарного материала традиционными методами (сравнительно-морфологическим и эколого-географическим), а также размытость критериев вида ведут к разработке все более субъективных оценок диагностической значимости выявляемых признаков (Агафонов, 2004). Если проанализировать критерии, на основании которых были признаны новые виды рода *Elymus* L. в пределах России за последние десятилетия (Цвелёв, 2008; Цвелёв, Пробатова, 2010), то среди них практически не упоминается репродуктивный критерий (с учетом механизмов изоляции и их последствий в поколениях), так же как какие-либо генетические, цитогенетические или биохимические критерии. По данным Н.Н. Цвелёва и Н.С. Пробатовой (2010), на территории России в составе рода *Elymus* секции *Gouldardia* (Husn.) Tzvelev, подсекции *Pendulini* (Nevski) Tzvelev существуют три близкородственных, но самостоятельных вида: *E. pendulinus* (Nevski) Tzvelev, *E. brachypodioides* (Nevski) Peschkova и *E. vernicosus* (Nevski ex Grubov) Tzvelev. Критериями для выделения этих видов являются их морфологические различия и эколого-географические особен-

ности произрастания. По мнению авторов, *E. pendulinus* распространен в Приморском крае и в бассейне Среднего Амура и представлен главным образом лесными растениями. *E. brachypodioides* приурочен к открытым каменистым местообитаниям юга Сибири от Алтая до Читинской области, с восточной границей ареала в Амурской области, низовье Амура и в Ханкайском районе Приморского края. Наиболее ксерофитный вид *E. vernicosus* в основном распространен в полупустынных районах Центральной Азии, на территории России вид встречается в пограничных районах Горного Алтая, Забайкальского края и Республики Бурятия (Цвелёв, 2008).

Elymus pendulinus, согласно последнему диагнозу (Цвелёв, Пробатова, 2010), отличается от видов *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* наличием жестких щетинок по бокам и в верхней части нижних цветковых чешуй (НЦЧ) и обычно голыми, реже коротковолосистыми узлами стебля (УС). У видов *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* НЦЧ только с шипиками, в верхней части без жестких щетинок, при этом *E. brachypodioides* отличается от *E. vernicosus* наличием коротких волосков на УС, поскольку у последнего они голые. В то же время нами обнаружено, что в пределах дальневосточных фитоценозов существуют особи с различными диагностическими признаками – как с голыми УС, так и с волосистыми (Кобозева и др., 2012). Так, в некоторых гетерогенных популяциях Приморского края были найдены образцы, которые по морфологическим признакам могут быть отнесены ко всем трем видам: *E. pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus*, а в популяциях Горного Алтая – к *E. pendulinus* и *E. vernicosus*. Кроме того, в популяциях Южного Приморья и Горного Алтая обнаружены формы с разным проявлением признака опушения НЦЧ: голые и гладкие, безреснитчатые, длиннощетиныстые с ресничками, а также все переходные фенотипы. По признаку опушения УС в некоторых смешанных популяциях Южного Приморья найдены особи как с голыми, так и с волосистыми в разной степени узлами, в том числе с полуопушенными. В поисках наиболее стабильных признаков, помимо диагностических, нами была изучена изменчивость ряда морфологических признаков (Кобозева и др., 2012), но признаков, которые было бы возможно применять как ключевые для подразделения на отдельные виды, не найдено. Относительно экологической приуроченности каждого из видов мы наблюдали следующее: микропопуляции и отдельные особи, соответствующие по морфотипам *E. pendulinus* и *E. brachypodi-*

oides, в Южном Приморье чаще всего занимали границы лесов и кустарников или нарушенные антропогенные местообитания – обочины дорог и прочие урбанизированные территории. Среди горно-алтайских популяций большинство особей, обитающих во влажных местах, формально следует отнести не к *E. brachypodioides*, а к *E. vernicosus* (гладкие НЦЧ и УС). Образцы *E. vernicosus* были обнаружены в лесных фитоценозах южных районов Бурятии и провинции Китая (Внутренней Монголии), так же как образцы *E. brachypodioides* с гладкими НЦЧ и опушенными УС – в Забайкальском крае.

Для понимания взаимосвязи генотипической и фенотипической изменчивости необходимо изучение генетического сходства между морфотипами с учетом экологических особенностей произрастания и репродуктивных свойств изучаемых таксонов. Если посмотреть на распространение видов *E. pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* через призму «мозаичности фитоценозов» (Работнов, 1972; Миркин, Розенберг, 1978), то можно обнаружить отчетливую экологическую приуроченность этих видов согласно правилам эпизодической и антропогенной мозаичности. Формированию мозаичности способствуют относительно короткий срок жизни (два-три года) особей этих трех видов, а также семенной способ размножения путем автогамии. В результате растения не нуждаются в опылителях и проявляют высокую вариативность в численности микропопуляций, а также в местонахождениях отдельных адвентивных особей. Как правило, популяции с высокой численностью встречаются редко и на нарушенных местообитаниях существуют временно, а отдельные особи можно встретить практически в любом месте в пределах общего ареала видов.

Таким образом, нами установлено, что каждый из трех рассматриваемых видов может занимать в пределах их ареалов различные экологические ниши. Это позволяет предполагать, что *E. pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* могут быть морфотипами одного крупного полиморфного таксона видового ранга без выраженной экологической приуроченности. По нашему мнению, виды *E. pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* образуют единый рекомбинационный генпул, в котором присутствует определенный набор аллельных генов, контролирующих разные морфологические типы. Вероятно, распределение частот аллелей в отдельных частях ареала может существенно различаться. Для понимания взаимоотношений этих морфотипов необходимо провести более глубокие комплексные исследования, включающие помимо классических методов ботаники (сравнительно-морфологического и эколого-географического) современные методы экспериментальной биологии. Одним из современных методов, позволяющих выявить признаки специфичности и генетического полиморфизма близкородственных таксонов, является молекулярно-генетический анализ изменчивости межмикросателлитных последовательностей ДНК (inter-simple sequence repeat – ISSR). Другой эффективный метод для изучения уровней родства растений – межвидовая гибридизация или гибридизация особей, различающихся рядом морфологических признаков. Ранее на примере некоторых видов рода *Elymus* было показано, что дифференциация по уровням скрещиваемо-

сти особей является важным показателем микроэволюционных событий, и этот принцип можно использовать для выяснения уровней родства между близкородственными таксонами (Agafonov, Salomon, 2002).

Цель данного исследования – уточнить микроэволюционные взаимоотношения между видами *E. pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* с помощью молекулярно-генетического и гибридологического анализов.

Материал и методы

Материалом для исследований служили отдельные образцы и популяционные выборки из различных местообитаний Приморского края, Горного Алтая, Бурятии, Забайкальского края и КНР. Для ISSR-анализа в качестве реперного был привлечен образец рода *Leymus* Hochst. из Северо-Восточного Казахстана. Кроме того, для сравнения, помимо исследуемой группы образцов, были взяты образцы видов из секции *Gouldardia* (Husn.) Tzvelev – *E. gmelinii* (Ledeb.) Tzvelev и *E. ciliaris* (Trin.) Tzvelev. Точки сбора природного материала приведены в табл. 1.

Молекулярно-генетический анализ изменчивости межмикросателлитных последовательностей ДНК (ISSR-анализ) проведен с применением праймеров (табл. 2), успешно использованных ранее для маркирования видов рода *Elymus* L. (Кобозева и др., 2015). Для количественной оценки полиморфизма маркеров и определения уровня дивергенции между изученными генотипами полученные данные были представлены в виде матрицы состояний бинарных признаков, в которой наличие или отсутствие ПЦР-фрагментов одинакового размера рассматривалось как состояние 1 и 0. Для статистической обработки данных использовали пакет программ TREECON (version 1.3b) (van de Peer, de Wachter, 1994). Генетические дистанции рассчитывали по методу (Nei, Li, 1979). Для построения дендрограмм применяли метод Neighbor-Joining (NJ) (Nei, 1987), расчет бутстреп-индексов проводили на 100 псевдорепликах.

Родительские биотипы для гибридизации подбирали на основании различающихся морфологических признаков (табл. 3). Кроме диагностических признаков (опушение НЦЧ и УС) были учтены признаки опушения листовых пластинок (ЛП) верхних листьев и опушение влагалищ нижних листьев. Растения для гибридизации выращивали на коллекционном участке или в климатической камере ЦСБС из семян дикорастущих экземпляров, собранных в разных точках ареала. В результате выполнены скрещивания в шести комбинациях.

Гибридизацию растений проводили по ранее разработанной экспресс-методике (Агафонов, 2004). Главным отличием методики от традиционной и преимуществом (Lu, Bothmer, 1990) является стимуляция естественного раскрытия цветков и одновременное удаление еще не лопнувших пыльников. Применение данной методики дает более надежные результаты, поскольку не требует предварительной эмаскуляции нежных незрелых цветков и ведет к повышению эффективности гибридизации.

Семенную фертильность (СФ) растений определяли как отношение выполненных зерновок к общему числу цветков в колосе. Показатели фертильности определяли не менее чем с трех хорошо развитых колосьев, из которых

Table 1. Coordinates (WGS-84) of locations of the *E. pendulinus* complex accessions from Primorskiy krai and Republic Altai and of the reference species from different locations

Accession code*	Location coordinates, collectors**
<i>E. pendulinus</i>, Primorskiy krai	
SHA-0843	Nearby Vladivostok, alt. 71 m, N 43°12.276' E 132°9.047' [1, 4]
VBG-1105	Nearby Vladivostok, alt. 168 m, N 43°13.091' E 131°59.048' [1, 2]
VSE-1018	Nearby Vladivostok, alt. 3 m, N 43°13.169' E 131°57.330' [1]
VOK-0738	Nearby Vladivostok, alt. 7 m, N 43°14.10' E 132°0.19' [1]
VOK-1015	Nearby Vladivostok, alt. 8 m, N 43°13.94' E 131°59.95' [1]
SAD-0841	Nearby Vladivostok, alt. 14 m, N 43°15.850' E 132°1.723' [1]
SAD-0842	Nearby Vladivostok, alt. 6 m, N 43°15.943' E 132°1.103' [1]
SAD-1011	Nearby Vladivostok, alt. 26 m, N 43°15.734' E 132° 2.483' [1]
GTS-1101	Ussuriysk raion, alt. 121 m, N 43°41.650' E 132°09.324' [1, 2]
GTS-1102	Ussuriysk raion, alt. 123 m, N 43°41.617' E 132°09.521' [1, 2]
USS-0720	Ussuriysk outskirts, alt. 49 m, N 43°51.23' E 131°57.60' [1, 4]
<i>E. brachypodioides</i>, Primorskiy krai	
ZAR-0746	Hasanskiy raion, nearby Zarubino Village, alt. 5 m, N 42°38.341' E 131°04.578' [1, 3]
MES-0721	Hasanskiy raion, nearby Andreevka Village, alt. 38 m, N 42°37.306' E 131°08.353' [1, 3]
AND-1107	Hasanskiy raion, nearby Andreevka Village, alt. 38 m, N 42°38.067' E 131°08.179' [1, 2]
SLA-1123	Nearby Slavyanka, alt. 38 m, N 42°52.052' E 131°23.002' [1, 2]
RUS-0716	Russkiy Island, alt. 28 m, N 43°00.894' E 131°53.415' [1, 3]
RUS-0732	
VBG-0722	Nearby Vladivostok, alt. 169 m, N 43°13.137' E 132°59.359' [1, 2]
VLA-0719	Nearby Vladivostok, alt. 17 m, N 43°13.686' E 132°00.035' [1]
BKA-0921	Nearby Bolshoy Kamen, alt. 41 m, N 43°7.301' E 132°25.083' [1]
<i>E. vernicosus</i>, Primorskiy krai	
SAD-1002	Nearby Vladivostok, alt. 26 m, N 43°15.734' E 132° 2.483' [1]
<i>E. pendulinus</i>, Mountain Altai	
CHE-1022–CHE-1028 CHE-1040	Chemalskiy raion, nearby Chemal Village, a transect from point alt. 438 m, N 51°23.919' E 86°00.112' to point alt. 434 m, N 51°23.533' E 86°00.197' [2, 3]
AUS-1015	Shebalinskiy raion, nearby Ust-Sema Village, alt. 345 m, N 51°38.371' E 85°45.384' [1, 2]
<i>E. vernicosus</i>, Mountain Altai	
CHE-1031, CHE-1032, CHE-1034, CHE-1043	Chemalskiy raion, nearby Chemal Village, a transect from point alt. 438 m, N 51°23.919' E 86°00.112' to point alt. 434 m, N 51°23.533' E 86°00.197' [2, 3]
CHE-1044	Chemalskiy raion, nearby Chemal Village, alt. 457 m, N 51°23.481' E 86°00.116' [1, 2]
CHE-1066	Chemalskiy raion, nearby Chemal Village, alt. 391 m, N 51°23.476' E 86°00.127' [1, 2]
Reference accessions	
CHI-0803	<i>E. brachypodioides</i> , Zabaykalskiy krai, nearby Nerchinsk, alt. 690 m, N 51°56.574' E 116°33.634' [5]
BBI-1114	<i>E. vernicosus</i> , Republic of Buryatia, nearby Bichura Village, alt. 710 m, N 50°32.458' E 107°37.216' [1, 2]
CIM-1133	<i>E. vernicosus</i> , People's Republic of China, Inner Mongolia Autonomous Region, alt. 1589 m, N 42°25.991' E 115°42.971' [5]
VBG-0844	<i>E. ciliaris</i> , Primorskiy krai, nearby Vladivostok, alt. 169 m, N 43°13.091' E 131°59.048' [1, 4]
MES-1111	<i>E. ciliaris</i> , Primorskiy krai, Hasanskiy raion, alt. 93 m, N 42° 37.045' E 131° 8.650' [1, 2]
BKA-0962	<i>E. gmelinii</i> , Primorskiy krai, nearby Bolshoy Kamen, alt. 41 m, N 43°7.513' E 132°25.133' [1]
ALK-0678	<i>E. gmelinii</i> , Altai Republic, Ust-Koksinskiy raion, alt. 1476 m, N 50°45.75' E 84°55.38' [3]
KAZ-2011	<i>Leymus</i> sp. , North-East Kazakhstan [3]

* Codes of the accessions included in hybridization are shown in bold.

** Collectors: [1], A.V. Agafonov; [2], E.V. Kobozeva; [3], D.E. Nikonova (Gerus); [4], M.A. Agafonova; [5], O.A. Anenkhonov.

Table 2. The primers used for study of DNA polymorphism among *Elymus* accessions

Primer	Nucleotide sequence 5'- 3'	Tann, °C	Total number of DNA fragments	Fragment sizes, bp
17899B	(CA) ₈ GG	47	47	350–1400
814	(CT) ₈ TG	51	67	250–1700
844A	(CT) ₈ AC	51	45	350–1500
M2	(AC) ₈ YG*	56	72	300–2000
HB14	(CTC) ₃ GC	41	40	450–1700
HB12	(CAC) ₃ GC	42	51	450–1700

* Y = C or T.

Table 3. Morphology of parental plants used in the crosses

No.	Lemma pubescence	Culm node pubescence	Upper leaf pubescence	Lower leaf-sheath pubescence
<i>E. brachypodioides</i> MES-0721 (1) × <i>E. pendulinus</i> USS-0720 (2)				
1	glabrous, short sparse bristles on sides	pilose	glabrous	glabrous
2	long bristles on sides	pilose	glabrous, short- puberulent leaf apex	glabrous
<i>E. brachypodioides</i> ZAR-0746 (3) × <i>E. pendulinus</i> SAD-0842 (4)				
3	glabrous, unciliated	pilose	glabrous	glabrous
4	long-pilose, long-ciliated	glabrous	densely long- puberulent	puberulent
<i>E. brachypodioides</i> BKA-0921 (5) × <i>E. pendulinus</i> SAD-0842 (6)				
5	glabrous, sparse bristles on sides, unciliated	pilose on upper parts	glabrous	glabrous
6	long-pilose, long-ciliated	glabrous	densely long- puberulent	puberulent
<i>E. brachypodioides</i> VLA-0719 (7) × <i>E. pendulinus</i> VOK-0738 (8)				
7	scabrous nerves, short bristles on sides, sparsely ciliated	pilose	glabrous	puberulent, ciliated
8	sparse long-pilose, long-ciliated	glabrous	puberulent	glabrous
<i>E. pendulinus</i> AUS-1015 (9) × <i>E. brachypodioides</i> VBG-0722 (10)				
9	long-pilose, long-ciliated	glabrous	glabrous	glabrous
10	glabrous, sparse bristles on sides, unciliated	pilose	sparse puberulent	glabrous
<i>E. vernicosus</i> CHE-1044 (11) × <i>E. pendulinus</i> AUS-1015 (12)				
11	glabrous, unciliated	glabrous	glabrous	glabrous
12	long-pilose, long-ciliated	glabrous	glabrous	glabrous

учитывалось наивысшее значение СФ. Репродуктивную совместимость генотипов (Cs) с подразделением на $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -уровни определяли согласно (Агафонов, 1997; Агафонов, Salomon, 2002) с позиций принципа рекомбинационных и интрогрессивных генпулов. Оценку наследования морфологических признаков проводили на выборках растений гибридов F_2 , выращенных на открытом участке ЦСБС. Соответствие расщепления гибридов по фенотипу моно- и дигенному контролю признаков проверяли по критерию χ^2 (хи-квадрат) (Лобашев, 1967).

Результаты и обсуждение

Молекулярно-генетический анализ

Для выявления признаков специфичности и генетического полиморфизма у *E. pendulinus*, *E. brachypodioides*, *E. vernicosus* нами использовался анализ изменчивости межмикросателлитных последовательностей ДНК (ISSR). При сравнении ISSR-профилей, полученных с помощью шести эффективных праймеров (17899B, 814, 844A, M2, HB14, HB12), был выявлен высокий полиморфизм меж-

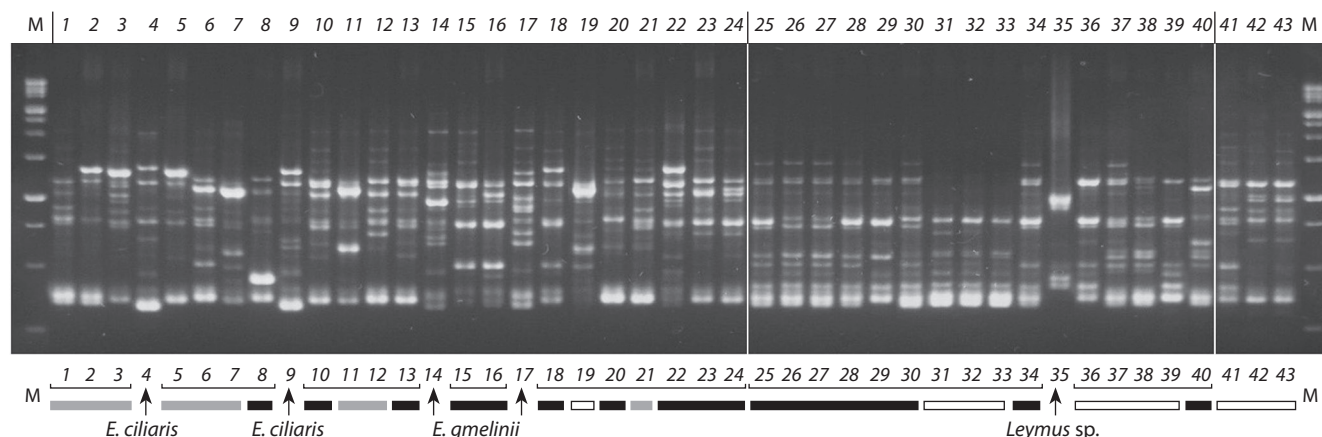


Fig. 1. ISSR variation in accessions of *E. pendulinus* (black), *E. brachypodioides* (grey), *E. vernicosus* (white) and the reference species *E. ciliaris* and *E. gmelinii* as analyzed with the M2 primer: 1–24 – Primorskiy kraj; 25–40 – Altai Republic; 41 – Republic of Buryatia; 42 – Zabaykalskiy kraj; 43 – China, Inner Mongolia.

1 – ZAR-0746; 2 – MES-0721; 3 – AND-1107; 4 – *E. ciliaris* VBG-0844; 5 – SLA-1103; 6 – RUS-0716; 7 – RUS-0732; 8 – SHA-0843; 9 – *E. ciliaris* MES-1111; 10 – VBG-1105; 11 – VBG-0722; 12 – VLA-0719; 13 – VSE-1018; 14 – *E. gmelinii* BKA-0962; 15 – VOK-0738; 16 – VOK-1015; 17 – *E. gmelinii* ALK-0678; 18 – SAD-0841; 19 – SAD-1002; 20 – SAD-1011; 21 – BKA-0921; 22 – GTS-1101; 23 – GTS-1102; 24 – USS-0720; 25 – CHE-1022; 26 – CHE-1023; 27 – CHE-1024; 28 – CHE-1025; 29 – CHE-1027; 30 – CHE-1028; 31 – CHE-1031; 32 – CHE-1032; 33 – CHE-1034; 34 – CHE-1040; 35 – *Leymus* sp.; 36 – CHE-1043; 37 – CHE-1044; 38 – CHE-1066; 39 – AUS-1002; 40 – AUS-1015; 41 – BBI-1114; 42 – CHI-0803; 43 – CIM-1133.

микросателлитных последовательностей ДНК у исследованных видов. Все 322 амплифицируемых фрагмента с длинами, варьирующими в диапазоне от 250 до 2000 пар нуклеотидов, были полиморфны. Наибольшее число ISSR-фрагментов (72) получено при использовании праймера M2 – (AC)₈YG, а наименьшее (40) – при использовании праймера HB14 – (CTC)₃GC. С помощью праймера M2 были выявлены наибольшие различия между приморскими и алтайскими образцами, независимо от их формальной видовой принадлежности (рис. 1).

Консенсусная дендрограмма, построенная по результатам использования шести праймеров, подтвердила наши предположения о взаимоотношениях данных видов (рис. 2). В целом образцы распределились по географическому принципу. Единственным труднообъяснимым фактом является то, что от всех образцов значительно обособились три образца *E. vernicosus* алтайского происхождения. Наибольшее генетическое сходство обнаружено у образцов из смешанных популяций, где чаще произрастают близкородственные особи с одинаковыми морфологическими признаками. Вместе с тем попарно группировались образцы *E. pendulinus* и *E. vernicosus* из Горного Алтая. В Приморском крае значительное генетическое сходство обнаружено между образцами, относящимися к разным видам: *E. pendulinus* группируется с *E. brachypodioides* и *E. vernicosus*. Кроме того, общую кладу с образцами из Приморского края сформировали образцы *E. vernicosus* из Забайкальского края и Китая.

Спектры привлеченных видов *E. gmelinii* и *E. ciliaris* хорошо отличались от видов подсекции *Pendulini*. Образец рода *Leymus* Hochst., взятый в качестве реперного (outgroup) для укоренения дендрограммы, достоверно отделился от изучаемой группы видов (бутстреп-индекс равен 100).

В результате ISSR-анализа выявлена высокая дифференциация образцов из Приморского края, несколько

меньшие различия установлены среди горно-алтайских образцов (см. рис. 1 и 2). Вероятно, это связано с тем, что данные таксоны распространены в Приморском крае значительно шире и представлены в природных сообществах гораздо большим числом микропопуляций, чем в Горном Алтае.

Наряду с отмеченным полиморфизмом приморских и горно-алтайских выборок, выявлены признаки специфичности, вероятно, обусловленные географической изоляцией в течение многих поколений. При этом на дендрограмме (см. рис. 2) не выражено сколько-нибудь заметной корреляции между диагностическими признаками и генетическим расстоянием между образцами подсекции *Pendulini*. Такое распределение образцов, безусловно, свидетельствует о том, что виды *E. pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* являются близкородственными. Тем не менее данные по вариативности любых молекулярных маркеров необходимо подтверждать прямыми гибридологическими опытами.

Гибридизация и оценка наследования диагностических признаков

С целью выяснения репродуктивных отношений близкородственных таксонов нами создана серия гибридов между особями видов *E. pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus*. Ранее было неоднократно показано, что природные растения самоопыляющихся видов рода *Elymus* гомозиготны по многим генам, даже если растут в составе гетерогенных популяций. Можно было бы ожидать, что хазмогамный тип цветения, характерный для большинства видов *Elymus*, должен приводить к перекрестному опылению с высокой частотой. Однако в норме самоопыление обеспечивается рядом факторов (Агафонов, 2007): 1) достаточным количеством собственной пыльцы, которая созревает в цветке одновременно с женскими гаметофитами; 2) отсутствием генетических систем само-

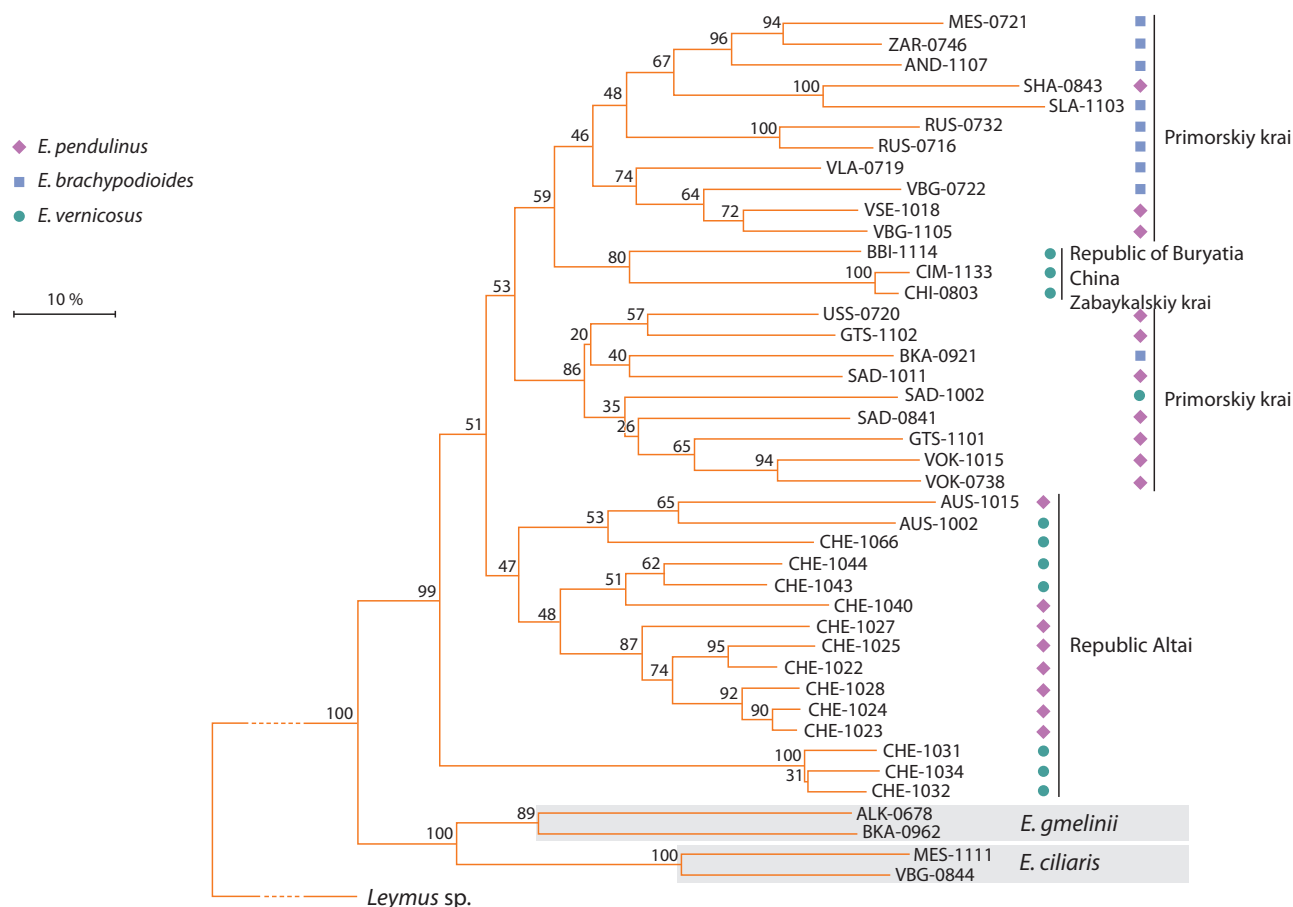


Fig. 2. The consensus NJ dendrogram built with six ISSR markers with bootstrap support values.

несовместимости, функционирующих на презиготических стадиях образования зародышей; 3) аллотетраплоидной природой генома, обеспечивающей при самоопылении необходимый уровень гетерозиготности по большому числу жизненно важных генетических систем.

Поэтому уровень гетерозиготности растений в популяциях довольно низок, а число межвидовых гибридов даже в смешанных местообитаниях относительно невелико. По данным электрофоретического анализа белков эндосперма уровень гетерозиготности составляет от 0 до 2 % (Kostina et al., 1998; Агафонов, Баум, 2000; Агафонов и др., 2008).

Небольшие выборки родительских растений, выращенные для гибридизации (3–5 особей), также не показали расщепления по маркерным признакам. Взятые в гибридизацию родители различались в парах по разным наборам признаков. При этом нами учитывались все наблюдаемые признаки, как диагностические, так и потенциально значимые в таксономии рода. Большее количество данных по различным морфологическим признакам позволяет более детально рассматривать сходство и различия изучаемых видов.

Результаты межвидовой гибридизации в шести комбинациях скрещивания показали высокую репродуктивную совместимость этих видов. Все гибридные растения F_1 обладали нормально развитыми пыльниками (рис. 3) и

относительно высокими значениями семенной фертильности (табл. 4). Репродуктивная совместимость (Cs) большинства биотипов с разной видовой принадлежностью соответствует уровню α_1 и свидетельствует о свободной рекомбинации генетического материала. Условной границей между α_1 - и α_2 -уровнями совместимости было принято значение $CF = 40\%$ (Агафонов, 1997).

В комбинации скрещивания биотипов из отдаленных популяций Приморья и Горного Алтая (*E. pendulinus* AUS-1015 $\times$ *E. brachypodioides* VBG-0722) обнаружены более низкие значения CF, так же как в комбинации биотипов из Приморского края (*E. brachypodioides* BKA-0921 $\times$ *E. pendulinus* SAD-0842). Совместимость родительских биотипов в данных скрещиваниях соответствует уровню α_2 (ограниченная рекомбинация генетического материала).

Анализ расщепления альтернативных признаков гибридов в шести комбинациях скрещивания показал, что моногенно наследуются следующие признаки (табл. 5): наличие ресничек НЦЧ, опушение наружной поверхности влагалищ нижних листьев (НПВНЛ), опушение УС, опушение верхней стороны ЛП перед колосом (флаговый лист). Признак опушения НЦЧ у разных гибридов наследуется то по моногенному, то по дигенному типу. Это объясняется тем, что родительские пары могут различаться как по одному аллелю в гомозиготном состоянии, так и по



Fig. 3. Spike fragments of the F1 hybrids with opened anthers.

Table 4. Highest values of seed fertility (SF) in hybrids and levels of sexual compatibility (Cs) between biotypes *E. pendulinus*, *E. brachypodioides*, and *E. vernicosus* in F₁ and F₂ generations

No	Cross combination	Highest seed fertility (SF) values in hybrid generations, %				Cs level
		F ₁	N _{F₁} [*]	F ₂	N _{F₂} [*]	
1	MES-0721 brach×USS-0720 pend	78.8	3	92.4	80	α1
2	VLA-0719 brach×VOK-0738 pend	75.9	1	84.2	72	α1
3	ZAR-0746 brach×SAD-0842 pend	43.0	1	75.0	43	α1
4	BKA-0921 brach×SAD-0842 pend	18/5 ^{**}	2	73.6	14	α2
5	AUS-1015 pend×VBG-0722 brach	98/18 ^{**}	2	72.2	21	α2
6	CHE-1044 verni×AUS-1015 pend	89.0	2	89.8	78	α1

^{*} N_{F₁} and N_{F₂} – number of plants studied in F₁ and F₂ respectively.

^{**} N/M, number of grains (N) gathered from M spikes.

двум, согласно схемам AAbb × aabb или AABB × aabb. Поскольку одни и те же признаки выражались у родительских особей в разной степени, их распределение в F₂ также различалось. Рассмотрим подробнее результаты расщепления признаков каждой комбинации скрещивания.

В поколении F₂ у гибридов комбинации (1) *E. brachypodioides* MES-0721 × *E. pendulinus* USS-0720 обнаружено расщепление по наличию трихом на НЦЧ (см. табл. 5). По анализируемому признаку растения можно разделить на два класса: шиповатые и щетинистые по бокам НЦЧ (61) и голые, единичные щетинки по жилкам НЦЧ (19), что соответствует гипотезе расщепления 3 : 1. Значение χ² для признака наличия трихом на НЦЧ равно 0.066 при одной степени свободы. Расхождения между теоретическими и экспериментальными значениями допустимы, поскольку они меньше значения χ² для одной степени свободы и 5%-го уровня значимости (теоретическое равно 3.84). Следовательно, данные эксперимента согласуются с гипотезой моногибридного скрещивания и различия между ожидаемыми и наблюдаемыми значениями объясняются случайными причинами. При выяснении наиболее точного уровня значимости или возможной вероятности мы использовали способ математического выражения, где значения пределов вероятностей указывают на соответствие полученных и ожидаемых частот (Лобашов, 1967). Величина критерия χ², равная 0.066, означает, что полученные отклонения случайны (соответствие полученных и ожидаемых частот примерно в одном случае из

двух), и указывает на совпадение фактических данных с теоретически ожидаемыми.

В результате проведенной гибридизации в комбинации (2) *E. brachypodioides* VLA-0719 × *E. pendulinus* VOK-0738 из окрестностей г. Владивостока было получено расщепление ряда качественных признаков у гибридных растений в F₂. Согласно ключам определителя сводки Н.С. Пробатовой (1985), образец VOK-0738 морфологически был похож на *E. kurilensis* Probat., формально отличаясь от него лишь местонахождением. Позднее *E. kurilensis* был обозначен как синоним *E. pendulinus* (Цвелёв, Пробатова, 2010). При анализе растений второго поколения межвидового гибрида VLA-0719 × VOK-0738 нами рассматривались следующие признаки: опушение влагалищ нижних листьев и наличие ресничек по краю влагалища листа; опушение УС; опушение верхней стороны ЛП перед колосом (флаговый лист). Анализируемая выборка первоначально состояла из 95 растений, затем часть растений погибла. Признаки опушения влагалищ и наличия ресничек по краю влагалища листа наиболее хорошо идентифицировались в прегенеративный период на живых растениях, тогда как расщепление остальных признаков было зафиксировано на генеративных побегах у 72 и 69 растений. Этим объясняется разница в числе анализируемых особей F₂.

Множественные варианты распределения признаков опушения поверхности влагалища листа и наличия ресничек по краю влагалища позволили сделать вывод об их

Table 5. Segregation of phenotypes in F_2 populations of interspecific hybrids and χ^2 values

Characters	Total number of individuals	Phenotypes	Number of individuals		χ^2
			expected	observed	
Monogenic inheritance of characters					
1. <i>E. brachypodioides</i> MES-0721 × <i>E. pendulinus</i> USS-0720					
Pubescence of lemmas	80	glabrous, sparse bristles on nerves	20	19	0.066
		scabrous, bristles on lemma sides	60	61	
2. <i>E. brachypodioides</i> VLA-0719 × <i>E. pendulinus</i> VOK-0738					
Pubescence of lemmas	95	glabrous	71.25	67	1.014
		puberulent	23.75	28	
Pubescence of culm nodes	72	glabrous	18	17	0.074
		pilose	54	55	
Pubescence on the abaxial surfaces of upper leaves	69	glabrous	17.25	19	0.236
		puberulent	51.75	50	
Cilia on lemmas	69	unciliated	17.25	15	0.391
		ciliated	51.75	54	
3. <i>E. brachypodioides</i> ZAR-0746 × <i>E. pendulinus</i> SAD-0842					
Pubescence of lemmas	40	glabrous	10	5	3.333
		pilose	30	35	
Cilia on lemmas	40	unciliated	10	5	3.333
		ciliated	30	35	
Pubescence of culm nodes	40	glabrous	10	10	0
		pilose	30	30	
4. <i>E. brachypodioides</i> BKA-0921 × <i>E. pendulinus</i> SAD-0842					
Pubescence of lemmas	13	glabrous	3.25	4	0.23
		pilose	9.75	9	
Cilia on lemmas	13	unciliated	3.25	3	0.025
		ciliated	9.75	10	
Pubescence of culm nodes	13	glabrous	3.25	3	0.025
		pilose	9.75	10	
5. <i>E. pendulinus</i> AUS-1015 × <i>E. brachypodioides</i> VBG-0722					
Pubescence of lemmas	21	scabrous	5.25	8	1.92
		long-pilose	15.75	13	
Pubescence of culm nodes	21	glabrous	5.25	3	1.285
		pilose	15.75	18	
Pubescence on the abaxial surface of upper leaves	21	sparse puberulent	5.25	2	2.682
		glabrous	15.75	19	
Digenic inheritance of characters (15:1)					
2. <i>E. brachypodioides</i> VLA-0719 × <i>E. pendulinus</i> VOK-0738					
Pubescence of lemmas	69	glabrous	4.3125	6	0.704
		pilose	64.6875	63	
6. <i>E. vernicosus</i> CHE-1044 × <i>E. pendulinus</i> AUS-1015					
Pubescence of lemmas	63	sparse scabrous	3.9375	4	0.975
		pilose	59.0625	59	

независимом наследовании и подтвердили необходимость рассматривать эти признаки отдельно друг от друга. Если рассмотреть расщепление гибридов F_2 по признакам опушения поверхности влагалища листа без учета ресничек (см. табл. 5), то проявлялось моногенное наследование, что было подтверждено статистически.

Признак «опушение узлов стебля» проанализирован на генеративных побегах 72 особей. Отмечены растения с разным проявлением признака: голые гладкие УС, коротковолосистые слабоопушенные, длинно-густоопушенные УС, которые составили два фенотипических класса – голые УС и опушенные (см. табл. 5), поскольку идентификация промежуточных форм оказалась весьма затруднительной из-за различной степени выраженности признака. Распределение признаков в фенотипические классы согласуется с нулевой гипотезой о моногенном наследовании признака, о достоверности которой свидетельствует критерий χ^2 .

Признак опушения верхней поверхности ЛП перед колосом характеризовался различной степенью фенотипического проявления: от голых, шероховатых до длинно-густоволосистых ЛП. Особенность ЛП *E. pendulinus* s. l. в том, что она не бывает абсолютно голой и гладкой. На обеих сторонах листа в большей или меньшей степени проявляются мельчайшие шипики, расположенные в основном по жилкам, возможность визуализации которых открывается только при более чем 50-кратном увеличении. Таким образом, при отсутствии опушения на верхней части ЛП мы использовали термин «голые, шероховатые». Нижняя часть ЛП при характеристике признака опушения ЛП не учитывалась, поскольку для всех образцов растений характерна голая, шероховатая поверхность нижней стороны ЛП. По классам выборка распределилась на волосистые и голые фенотипы в численном соотношении 50:19, что соответствует расщеплению 3:1 (см. табл. 5). Вариабельность ресничек НЦЧ невысокая по длине и плотности их расположения, поэтому фенотипические классы определялись по наличию или отсутствию ресничек по краям НЦЧ: реснитчатые и безреснитчатые НЦЧ. Значение критерия χ^2 свидетельствует о достоверности гипотезы моногенного контроля признака.

При анализе расщепления гибридов F_2 по признаку «опушение НЦЧ» мы столкнулись с множеством различающихся фенотипов. Все проявления признака можно распределить по типу трихом на четыре фенотипических класса (голые гладкие НЦЧ, шиповатые, щетинистые, длинноволосистые НЦЧ) и предположить дигенный контроль признака. При этом модель расщепления по фенотипу больше соответствует полимерному взаимодействию генов и проявляется в теоретическом соотношении 15:1, как волосистые и голые. Гипотеза дигенного наследования признака в данной комбинации скрещивания подтвердилась.

Таким образом, в трех вариантах скрещиваний растений из Приморского края выявлено расщепление по признаку «выраженность трихом на НЦЧ» в соответствии с моногенным наследованием, а в одном (2) *E. brachypodioides* VLA-0719 $\times$ *E. pendulinus* VOK-0738 – по дигенному типу.

Успешно была проведена межвидовая гибридизация образцов алтайского и приморского происхождения (5):

E. pendulinus AUS-1015 $\times$ *E. brachypodioides* VBG-0722. Расщепление потомков в F_2 фиксировали по трем признакам (два из которых являются диагностическими): «опушение НЦЧ», «опушение УС» и «опушение ЛП перед колосом». В данной выборке у всех растений присутствовали реснички на НЦЧ. Фертильность растений F_1 была относительно низкой (не выше 10 %). Следовательно, при образовании поколения F_2 прошел более жесткий отбор гамет и зигот, и расщепление признаков нельзя оценивать как свободное. Так, соотношение 19:2 в F_2 между особями с голыми и волосистыми ЛП при столь малой выборке не означает доминирования признака «голые ЛП».

У межвидовых гибридов F_2 между растениями из популяций Горного Алтая (6) *E. vernicosus* СНЕ-1044 $\times$ *E. pendulinus* AUS-1015 обнаружено расщепление по признаку «опушение НЦЧ» на четыре фенотипических класса: редкошиповатые, щетинистые, коротковолосистые и длинноволосистые НЦЧ. Поскольку изменчивость этого признака довольно велика, то граница между опушением, щетинками и короткими волосками в известной степени условна. Здесь также можно предположить полимерное взаимодействие генов, принимая теоретическое соотношение 15:1 между волосистыми в разной степени и редкошиповатыми НЦЧ. Значение критерия χ^2 свидетельствует о достоверности гипотезы дигенного контроля признака (см. табл. 5). Данное расщепление можно объяснить тем, что при наследовании признака «опушение НЦЧ» в ряде случаев имеет место полимерное взаимодействие неаллельных множественных генов. При этом признак проявляется при наличии хотя бы одного из доминантных аллелей полимерных генов. Наследование происходит по дигенному типу и проявляется как соотношение фенотипов 15:1.

Таким образом, по результатам проведенной гибридизации выявлены закономерности, необходимые для понимания структуры и микроэволюционных взаимоотношений среди группы таксономических видов рода *Elymus*. Достаточно высокие значения семенной фертильности гибридов во всех комбинациях свидетельствуют об отсутствии генетической изоляции между биотипами, формально относящимися к разным видам. Примечательно, что у гибрида в комбинации (2) VLA-0719 $\times$ VOK-0738, образованного родительскими биотипами из наиболее отдаленных ветвей NJ-дендрограммы (см. рис. 2), величина СФ близка к нормальной. Анализ расщепления потомств гибридных растений на рекомбинантные фенотипы с разной экспрессией признаков свидетельствует о наличии в генофонде трех таксонов не только множественного аллелизма генов, но и определенного множества генных локусов, ответственных за диагностические признаки.

Заключение

Для самоопыляющихся видов рода *Elymus* при сравнении биологической информативности гибридологического и ISSR-критериев нам видится несравненно более важным репродуктивный критерий. Причина в том, что при полном отсутствии апозиготии точнейший механизм мейотических делений визуализирует уровни гомологии между геномами родительских биотипов, как показано в многочисленных работах по цитогенетике гибридов рода (Dewey, 1984; Lu, von Bothmer, 1993; Lu et al., 1995; и др.).

Любые нарушения в процессе мейотических делений, вызванные ошибками в конъюгации гомологов, неизбежно проявляются в уменьшении пыльцевой и семенной фертильности гибридов. И наоборот, высокие значения СФ свидетельствуют о полной гомологии геномов, а значит, о близком родстве родительских биотипов.

По результатам исследования сделан вывод, что на территории России генотипы видов *E. pendulinus*, *E. brachypodioides* и *E. vernicosus* представляют собой единый рекомбинационный генпул. Характер наследования диагностических признаков подтверждает целесообразность перевода названных видов в ранг разновидностей *E. pendulinus* s. l. Ключ для их определения опубликован в специализированном ботаническом издании (Кобозева, Агафонов, 2015).

Acknowledgments

The authors are grateful to Cand. Sci. (Biol.) D.E. Nikonova (Gerus) and the staff of the Gorny Altay Botanical Garden (Kamlak Village, Altay Republic) for assistance in field studies. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, projects 11-04-00861 and 16-34-00505.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Agafonov A.V., Salomon B. Genepools among SH genome *Elymus* species in boreal Eurasia. *Triticeae* IV. Eds. P. Hernández et al. *Consejería de Agricultura y Pesca*. Spain, Sevilla, 2002;37-41.
- Agafonov A.V. The principle of recombinational (RGP) and introgressive (IGP) gene pools in the taxonomy of the genus *Elymus* L. *Sibirskiy Ekologicheskiy Zhurnal*=Siberian Ecological Journal. 1997;4(1):81-89. (in Russian)
- Agafonov A.V. Intraspecific structure and reproductive relationships between *Elymus mutabilis* and *E. transbaicalensis* (Poaceae) in Southern Siberia from the viewpoint of taxonomical genetics. *Genetika*=Genetics. 2004;40(11):1229-1238. (in Russian)
- Agafonov A.V. Differentiation of the genus *Elymus* L. (Triticeae: Poaceae) in the Asiatic part of Russia in the view of taxonomical genetics. *Sibirskiy botanicheskiy vestnik: elektronnyy zhurnal* = Siberian Botanical Bulletin: online journal. 2007;2(1):5-15. Available at: <http://www.csbg.nsc.ru/uploads/journal.csbg.ru/pdfs/i2.pdf>. (in Russian)
- Agafonov A.V., Baum B.R. Individual variation and reproductive properties of sexual hybrids in the complex of *Elymus trachycaulus* (Poaceae: Triticeae) and closely related taxa. 1. Polymorphism of storage endosperm proteins in biotypes from Northern America and Eurasia. *Turczaninowia*. 2000;3(1):63-75. (in Russian)
- Agafonov A.V., Gerus D.E., Dorogina O.V. Self-pollination in species of the genus *Elymus* (Triticeae: Poaceae) and its reflection in polypeptide patterns of endosperm proteins. *Sibirskiy botanicheskiy vestnik: elektronnyy zhurnal*=Siberian Botanical Bulletin: online journal. 2008;3(1-2):21-26. Available at: <http://www.csbg.nsc.ru/uploads/journal.csbg.ru/pdfs/i4.pdf>. (in Russian)
- Agafonov A.V., Salomon B. Genepools among SH genome *Elymus* species in boreal Eurasia. *Triticeae* IV. Eds. P. Hernández et al. *Consejería de Agricultura y Pesca*. Spain, Sevilla, 2002;37-41.
- Dewey D.R. The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial *Triticeae*. *Gene Manipulation in Plant Improvement*. Ed. J.P. Gustafson. N.Y.: Plenum Publ. Corp., 1984;209-279.
- Kobozeva E.V., Agafonov A.V. Revision of the subsection *Pendulini* (Nevski) Tzvelev of the genus *Elymus* L. (Poaceae). Systematic notes on the materials of P.N. Krylov Herbarium of Tomsk State University. 2015;112:22-31. (in Russian)
- Kobozeva E.V., Olonova M.V., Asbaganov S.V., Agafonov A.V. Polymorphism and specificity of StY-genome species *Elymus gmelinii* and *E. pendulinus* (Triticeae, Poaceae) in the territory of Asian part of Russia. *Rastitel'nyy mir Aziatskoj Rossii* = Plant Life of Asian Russia. 2015;2(18):45-55. (in Russian)
- Kobozeva E.V., Ovchinnikova S.V., Agafonov A.V. Variation and taxonomic relationships between StY-genome species *Elymus pendulinus*, *E. brachypodioides* and *E. vernicosus* (Triticeae: Poaceae). *Rastitel'nyy mir Aziatskoj Rossii* = Plant Life of Asian Russia. 2012;2(10):87-93. (in Russian)
- Kostina E.V., Agafonov A.V., Salomon B. Electrophoretic properties and variability of endosperm proteins of *Elymus caninus* (L.) L. *Triticeae* III. Ed. A.A. Jaradat. Enfield, New Hampshire: Sci. Publ., 1998;265-272.
- Lobashev M.E. *Genetika* [Genetics]. Leningrad, Leningrad State University Publ., 1967. (in Russian)
- Lu B.-R., von Bothmer R. Intergeneric hybridization between *Hordeum* and Asiatic *Elymus*. *Hereditas*. 1990;112:109-116.
- Lu B.-R., von Bothmer R. Meiotic analysis of *Elymus caucasicus*, *E. longearistatus*, and their interspecific hybrids with twenty-three *Elymus* species: *Triticeae* (Poaceae). *Plant Syst. Evol.* 1993;185(1):35-53.
- Lu B.-R., Salomon B., von Bothmer R. Interspecific hybridization with *Elymus confusus* and *E. dolichaterus*, and their genomic relationships (Poaceae: Triticeae). *Plant Syst. Evol.* 1995;197(1):1-17.
- Mirkin B.M., Rozenberg G.S. *Fitotsenologiya. Printsipy i metody* [Phytocenology: Fundamentals and Methods]. Moscow, Nauka, 1978. (in Russian)
- Nei M. *Molecular evolutionary genetics*. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1987.
- Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979;76(10):5269-5273.
- Probatova N.S. *Myatlikovy, ili Zlaki – Poaceae Barnh.* (Gramineae Juss.) Poaceae – Poaceae Barnh. *Sosudistye rasteniya sovetskogo Dal'nego Vostoka* [Vascular plants of the Soviet Far East]. Leningrad, 1985;1:89-382. (in Russian)
- Rabotnov T.A. Mosaic meadow phytocenoses. *Biull. MOIP. otd. biol.* = Bulletin of the Moscow Society of Naturalists. Biological Series, 1. 1972;77(4):104-117. (in Russian)
- Takhtajan A.L. *Biosystematics: the past, present and future*. *Botanicheskiy Zhurnal* = Botanical Journal (St. Petersburg). 1970;55(3):331-345. (in Russian)
- Tzvelev N.N. On the genus *Elymus* (Poaceae) in Russia. *Botanicheskiy Zhurnal* = Botanical Journal (St. Petersburg). 2008;93(10):1587-1596. (in Russian)
- Tzvelev N.N., Probatova N.S. The genera *Elymus* L., *Elytrigia* Desv., *Agropyron* Gaertn., *Psathyrostachys* Nevski, and *Leymus* Hochst. (Poaceae: Triticeae) in the Russian flora [Komarovskie chteniya [V.L. Komarov Memorial Lectures (Vladivostok)]. 2010;57:5-102. (in Russian)
- van de Peer Y., de Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Appl. Biosci.* 1994; 10:569-570.
- Zavadskiy K.M. *Vid i vidoobrazovanie* [Species and speciation]. Leningrad, Nauka, 1968. (in Russian)

Прием статей через электронную редакцию на сайте <http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour>
Предварительно нужно зарегистрироваться как автору, затем в правом верхнем углу страницы выбрать «Отправить рукопись». После завершения загрузки материалов обязательно выбрать опцию «Отправить письмо», в этом случае редакция автоматически будет уведомлена о получении новой рукописи.

«Вавиловский журнал генетики и селекции»/“Vavilov Journal of Genetics and Breeding”
до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС»/
“The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists”.

Регистрационное свидетельство ПИ № ФС77-45870 выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 20 июля 2011 г.

«Вавиловский журнал генетики и селекции» включен ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, Российский индекс научного цитирования, ВИНТИ, базы данных Ebsco, DOAJ, Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar, Russian Science Citation Index на платформе Web of Science.

Открытый доступ к полным текстам:
на сайте ИЦиГ СО РАН – bionet.nsc.ru/vogis/
платформе Elpub – vavilov.elpub.ru/index.php/jour
платформе Научной электронной библиотеки – elibrary.ru/title_about.asp?id=32440

Подписку на «Вавиловский журнал генетики и селекции» можно оформить в любом почтовом отделении России. Индекс издания 42153 по каталогу «Пресса России».

При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна.

✉ e-mail: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Секретарь по организационным вопросам С.В. Зубова. Тел.: (383)3634977.

Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Тел.: (383)3634963*5218.

Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редактор: В.Д. Ахметова. Дизайн: А.В. Харкевич.

Компьютерная графика и верстка: Т.Б. Коняхина, О.Н. Савватеева.

Подписано в печать 21.02.2017. Формат 60 × 84 ¹/₈. Усл. печ. л. 17.0. Уч.-изд. л. 20.7

Тираж 200 экз. Заказ № 56

Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН», Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.