

DOI: 10.30901/2227-8834-2017-1-92-103

УДК 632.938.1

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

В. А. Бирюкова<sup>1</sup>,  
И. В. Шмыгля<sup>1</sup>,  
С. Б. Абросимова<sup>1</sup>,  
В. В. Мананков<sup>1</sup>,  
А. В. Митюшкин<sup>1</sup>,  
Е. В. Rogozina<sup>2</sup>,  
С. Д. Киру<sup>2</sup>,  
Н. А. Чалая<sup>2</sup>,  
А. А. Мелешин<sup>1</sup>,  
В. А. Жарова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства имени А. Г. Лорха 140051, Россия, Московская область, пос. Красково, ул. Лорха, д. 23 e-mail: vika\_biryukova@inbox.ru

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова, 190000 Санкт-Петербург, ул. Б. Морская д. 42, 44, Россия, e-mail: rogozinaelena@gmail.com

**Ключевые слова:**

картофельная цистообразующая нематода, молекулярные маркеры, гены устойчивости, маркер опосредованная селекция (МОС)

**Поступление:**

10.12.2016

**Принято:**

06.03.2017

### ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ В СЕЛЕКЦИИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К КАРТОФЕЛЬНОЙ ЦИСТООБРАЗУЮЩЕЙ НЕМАТОДЕ

**Актуальность.** Картофельные цистообразующие нематоды (КЦН) – являются объектами внешнего и внутреннего карантина растений. Выведение устойчивых сортов – основной способ борьбы с данными паразитами. Для повышения эффективности селекции на устойчивость к КЦН в последнее время широко используются молекулярные маркеры. Во Всероссийском научно-исследовательском институте картофельного хозяйства (ВНИИКХ) ДНК-маркеры генов устойчивости к КЦН применяются на разных этапах селекционных программ. **Материал и методика.** Проведен скрининг более 450 образцов из коллекций ВНИИКХ и Всероссийского института генетических ресурсов растений (ВИР) на устойчивость к КЦН с помощью классических и молекулярных подходов. Исследованы 57 образцов генетической коллекции ВИР; 144 образца из признаковых коллекций и 160 перспективных гибридов ВНИИКХ; более 90 генотипов из разных гибридных популяций. **Результаты и выводы.** Согласованность между результатами молекулярного анализа и фенотипической устойчивостью к нематоде составила для маркеров гена *HI*: 96% для 57R, 91% для N146, 90% для N195, 64% для TG689 и для маркеров гена *Gro1-4*: 81% для Gro1-4 и 78% для Gro1-4-1. Выявлены случаи «ложноотрицательными» (когда есть устойчивость, и нет маркера) и «ложноположительными» (есть маркер, но нет устойчивости) результатами исследований. Наиболее эффективным маркером для селекции картофеля на устойчивость к *Globodera rostochiensis* (Woll.) Behrens является – 57R, характеризующийся высоким уровнем корреляции с признаком устойчивости к нематоде. Изучено наследование ДНК-маркеров генов *HI* и *Gro1-4* в F<sub>1</sub> поколении, полученном от разных комбинаций скрещивания. В потомстве как по гену *HI*, так и по гену *Gro1-4* наблюдалось расщепление 1:1. На основе маркер опосредованной селекции выделены гибриды картофеля, обладающие более высокой системой защиты к КЦН, – 2646-11, происхождение: 92.13-186 (*Gro1-4*) × 91.30-66 [Россиянка (*HI*, *Gpa2*) × 88.34/14] и 1327-1, происхождение: Лира (*Gro1-4*) × Raja (*HI*, *Gpa2*). Оба гибрида содержат по три гена – *HI*, *Gro1-4*, *Gpa2* и являются источниками устойчивости к нескольким патотипам КЦН.

DOI: 10.30901/2227-8834-2017-1-92-103

ORIGINAL ARTICLE

V. A. Biryukova<sup>1</sup>,  
I. V. Smiglya<sup>1</sup>,  
S. B. Abrosimova<sup>1</sup>,  
V. V. Manankov<sup>1</sup>,  
A. V. Mityushkin<sup>1</sup>,  
E. V. Rogozina<sup>2</sup>,  
S. D. Kiru<sup>2</sup>,  
N. A. Chalaya<sup>2</sup>,  
A. A. Meleshin<sup>1</sup>,  
V. A. Zharova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>A. G. Lorch All-Russian  
Institute of Potato Research, 23,  
Lorch St., Kraskovo,  
Moscow region,  
140051 Russia, e-mail:  
vika\_biryukova@inbox.ru

<sup>2</sup>The N. I. Vavilov  
All-Russian Institute  
of Plant Genetic Resources,  
42, 44, Bolshaya Morskaya str.,  
St. Petersburg,  
190000 Russia,  
e-mail: rogozinaelena@gmail.com

**Key words:**  
*potato cyst nematode, molecu-  
lar markers, resistance gene,  
marker-mediated breeding*

**Received:**  
10.12.2016

**Accepted:**  
06.03.2017

## APPLICATION OF MOLECULAR MARKERS IN BREEDING FOR RESISTANCE TO POTATO CYST NEMATODE

**Background.** Potato cyst nematodes (PCN) are objects of external and internal plant quarantine. Breeding of resistant varieties is the basic way to control these pathogens. Of late, molecular markers have been widely used to improve the efficiency of breeding for resistance to PCN. At the All-Russian Institute of Potato Research DNA markers of PCN resistance genes are applied at different stages of breeding programs. **Materials and methods.** Screening of more than 450 accessions of genetic collections and promising hybrids from the All-Russian Institute of Potato Research and the Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources for resistance to PCN has been carried out using classical and molecular approaches. The studied material included 57 accessions from the genetic collection of potato maintained at VIR, 144 accessions from the trait-targeted working collections, 160 promising hybrids from the Institute of Potato Research, and over 90 genotypes from various hybrid populations. **Results and conclusions.** Consistency between the results of molecular analysis and phenotypic resistance to the nematode was with the *H1* gene markers: 96% for 57R, 91% for N146, 90% for N195, and 64% for TG689; and with the *Gro1-4* gene markers: 81% for Gro1-4, and 78% for Gro1-4-1. There were identified cases of "pseudonegative" (when resistance exists, but there is no marker) and "pseudopositive" (there is a marker, but no resistance) research results. The most effective marker in potato breeding for resistance to *Globodera rostochiensis* (Woll.) Behrens is 57R characterized by a high level of correlation with the PCN resistance trait. Inheritance of DNA markers of the *H1* and *Gro1-4* genes in F<sub>1</sub> obtained from different crossing combinations was studied. Segregation in the progeny was 1:1 for both genes – *H1* and *Gro1-4*. Such marker-mediated breeding process helped to identify potato hybrids with a stronger protection system against PCN: 2646-11 originated from 92.13-186 (*Gro1-4*) × 91.30-66 [Rossiyanka (*H1*, *Gpa2*) × 88.34/14], and 1327-1 originated from Lira (*Gro1-4*) × Raja (*H1*, *Gpa2*). Both hybrids contain all three genes – *H1*, *Gro1-4* and *Gpa2* – and are sources of resistance to multiple PCN pathotypes.

## Введение

Картофельные цистообразующие нематоды (КЦН) – золотистая картофельная нематода *Globodera rostochiensis* (Woll.) Behrens и бледная картофельная нематода *Globodera pallida* (Stone) Behrens, которые включают восемь патотипов (Ro1–Ro5 и Pa1–Pa3), являются карантинными объектами и считаются наиболее вредоносными патогенами картофеля. Создание и возделывание сортов устойчивых к нематодам является одним из основных, экологически безопасных и экономически выгодных способов борьбы с ними. Успех селекции в этом направлении во многом зависит от изучения, подбора и систематизации исходного материала, мобилизации в селекционных программах культурных и дикорастущих видов *Solanum* L. – генетических источников устойчивости, создания на их основе эффективных доноров (межвидовых гибридов или предсортов), а также применения современных биотехнологий таких как маркер-опосредованная селекция (МОС), основанная на применении ДНК-маркеров тесно сцепленных с генами устойчивости. МОС на устойчивость к нематоде особенно актуальна, т. к. традиционная селекция, основанная на лабораторно-полевом тестировании образцов картофеля, является достаточно затратным и трудоемким процессом, требующим годы испытаний. Молекулярные маркеры значительно интенсифицируют поиск селекционно-ценных генотипов, позволяют существенно расширить выборку анализируемого материала и выявлять генотипы с комплексом генов устойчивости к КЦН (Gebhart et al., 2006). В результате исследований по картированию и секвенированию генома картофеля были разработаны молекулярные маркеры основных генов устойчивости к КЦН. Одним из первых был клонирован ген *Gro1*, детерминирующий устойчивость ко всем тестируемым патотипам *G. rostochiensis* (Ro1, Ro2, R3, Ro4, Ro5) и интрогрессированный в сорта картофеля от гибрида культурного картофеля с видом *S. spegazzinii* Bitter ( $2n = 2x = 24$ ). На

молекулярном уровне, локус *Gro1* принадлежит к классу NB-LRR генов. Представитель этого семейства генов – *Gro1-4* – был отселектирован с помощью специфических праймеров (*Gro1-4*-маркер) (Gebhart et al., 2006). Наряду с *Gro1-4* широкое применение в практической селекции получил SCAR-маркер TG689, сцепленный с локусом гена *H1*, обеспечивающим защиту картофеля от золотистой картофельной нематоды (De Jong, неопубликованные данные). Пригодность маркеров *Gro1-4* и TG689 для выявления генотипов устойчивых к *G. rostochiensis* подтверждена рядом независимых исследований (Biryukova et al., 2008; Galek et al., 2011; Milczarek et al., 2011). В целях оптимизации процедуры МОС D. Milczarek с соавторами (Milczarek et al., 2012) использовали метод мультиплексной ПЦР для обнаружения генов *H1* и *Gro1-4* в одной ПЦР-реакции.

A. M. Finkers-Tomczak с соавторами (Finkers-Tomczak et al. 2011) сконструировали физическую карту области гена *H1* и успешно идентифицировали два SCAR-маркера (57R и 110L), фланкирующие его локус. L. Shultz с соавторами (Shultz et al., 2012) на выборке более чем 300 генотипов картофеля показали, что 57R имеет хороший диагностический потенциал и является более надежным маркером по сравнению с TG689. K. Mori с соавторами (Mori et al. 2011) предложили использовать набор двух ко-сегрегирующих маркеров N146 и N195, тесно сцепленных с геном *H1*, а также внутригенные маркеры, непосредственно амплифицирующие участок гена *Gpa2*, контролирующего устойчивость к *G. pallida* (Mori et al., 2011). K. Asano с соавторами (Asano et al., 2012) на основе выравнивания нуклеотидных последовательностей *Gro1-4* и генов семейства *Gro1* получили более специфический маркер – *Gro1-4-1*. Для удобства они разработали мультиплекс, включающий детекцию сразу трех генов: *H1*, *Gro1-4*, *Gpa2*.

МОС начиналась со всемирного скрининга родительских селекционных линий (Dalamu, 2012). Во Всероссийском научно-исследовательском институте картофельно-

го хозяйства (ВНИИКХ) молекулярные маркеры применяются: на этапе пребридинга для поиска источников устойчивости к КЦН, представляющих интерес в качестве исходного материала для дальнейшей селекции среди образцов генетических коллекций ВНИИКХ и Всероссийского института генетических ресурсов растений (ВИР); на этапе основного испытания для оценки перспективных гибридов картофеля, отобранных по другим хозяйственно ценным признакам; и на ранних этапах селекции для скрининга гибридных популяций с целью изучения закономерностей наследования молекулярных маркеров. В статье представлены результаты МОС на устойчивость к КЦН за 2009–2015 гг. Цель настоящей работы – провести сравнительную оценку эффективности использования в селекции картофеля различных молекулярных маркеров генов устойчивости к КЦН на образцах генетических коллекций и перспективных гибридах ВНИИКХ и ВИР.

#### Материалы и методы

В работе было исследовано более 450 генотипов картофеля, в том числе 144 образца из признаковых коллекций ВНИИКХ, включая гибриды-беккроссы, родительские линии и сорта, полученные на их основе; 37 сложных межвидовых гибридов и 20 форм видов *Solanum* из коллекции ВИР; 160 перспективных гибридов селекции ВНИИКХ, находящиеся на этапе основного испытания; более 90 генотипов из разных гибридных популяций. Молекулярно-генетический анализ проводился на препаратах тотальной ДНК, выделенной из световых ростков клубней и листьев растений в полевых и *in vitro* коллекциях по протоколу, основанному на СТАВ-методе (Sagai-Marouf, 1984). Для оценки генотипов использовались ДНК-маркеры устойчивости к золотистой картофельной нематоды *G. rostochiensis* – SCAR-маркеры гена *H1*: TG689 (Galek et al., 2011), 57 R (Shultz et al., 2012), N146 и N195 (Mori et al., 2011), SCAR-маркер Gro 1-4 (Gebhart, 2006) и STS-маркер Gro1-4-1 гена *Grol-4* (Asano et

al., 2012), STS-маркер Gra2-2 гена *Gpa2* (Asano et al., 2012).

В целях оптимизации процедуры МОС использовали серию трех мультиплексных ПЦР для детекции генов *H1* и *Grol-4*, а также *H1*, *Grol-4* и *Gpa2*. Нуклеотидные последовательности праймеров и условия индивидуальных ПЦР взяты из литературных источников и представлены в таблице 1. Амплификацию ДНК проводили в термоциклере РТС-100 (MJ Research, Inc., США). Стандартная реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 10X буфер для Taq ДНК-полимеразы (Синтол, Россия), 2,5 mM смесь dNTP (Хеликон, Россия), 25 mM водный раствор хлорида магния (Fermentas, Литва), 5–10 пкмоль каждого праймера (Синтол, Россия), 0,5 е.а. Taq ДНК-полимеразы (Синтол, Россия), 20 нг пробы ДНК и 13–10 мкл воды  $\mu$ Q. Присутствие специфического фрагмента детектировали электрофоретическим разделением продуктов амплификации в 1,5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием.

ВСН-маркер, амплифицирующий консервативный участок бета-каротингидроксилазы (Galek et al., 2011) и маркер GBSS1-3 гена *GBSSI* (ген *waxy*), контролирующего содержание амилопектина в крахмале (Mori et al., 2011), использовали как внутренний положительный контроль, свидетельствующий о качестве матрицы ДНК и о правильности проведения ПЦР. Для проверки ассоциации маркер-признак мы сопоставили результаты молекулярного анализа с лабораторно-полевой оценкой образцов картофеля на устойчивость к золотистой картофельной нематоды методом искусственного заражения клубней, которая проводилась на базе «Всероссийского пункта по испытанию устойчивости сортов и гибридов картофеля к раку и картофельной нематоды» согласно методике (Volovik et al., 1995). Уровень корреляции между присутствием/отсутствием маркера и фенотипическим проявлением устойчивости у анализируемых образцов картофеля определяли с помощью коэффициента знаков Фехнера по формуле:

$$K_{\phi} = (n_a - n_b) / (n_a + n_b) \times 100\%,$$

где  $n_a$  – число совпадений;  $n_b$  – число не- устойчивым теоретически ожидаемому совпадений. Для оценки соответствия расщеплению в потомстве использовали наблюдаемого в гибридных популяциях критерий хи-квадрат. соотношения устойчивых генотипов к не-

**Таблица 1. ДНК-маркеры генов устойчивости к картофельной цистообразующей нематоде (КЦН)**

**Table 1. DNA markers of potato cyst nematode (PCN) resistance genes**

ПЦР	Маркер (тип / ген)	Нуклеотидная последовательность праймеров (5' → 3')	Размер (пн)	Условия ПЦР
Мультиплексная ПЦР №1	TG689 (SCAR / ген <i>HI</i> )	F: TAAAACTCTTGGTTATAGCCTAT	141	3 мин – 94°C, далее 35 циклов: 45 с – 92°C, 45 с – 58°C, 1 мин – 72°C и финальная элонгация 10 мин – 72°C (Gebhardt et al., 2006)
		R: CAATAGAATGTGTTGTTTCACCAA		
	Gro1-4 (SCAR / ген <i>Gro1-4</i> )	F: TCTTTGGAGATACTGATTCTCA	602	
		R: CGACCTAAAATGAAAAGCATCT		
	BCH (SCAR / ген <i>BCH</i> )	F: CATGACATAGTTTGAATTTTGAGTC	290	
		R: GCTTTGGCGCTGCCGTAAGTT		
Мультиплексная ПЦР №2	57R (SCAR / ген <i>HI</i> )	F: TGCCTGCCTCTCCGATTTCT	450	10 мин – 95°C, далее 30 циклов: 45 с – 95°C, 45 с – 63°C, 45 с – 72°C и финальная элонгация 10 мин – 72°C (Schultz et al., 2012)
		R: GGTTCAGCAAAAAGCAAGGACGTG		
	BCH (SCAR / ген <i>BCH</i> )	F: CATGACATAGTTTGAATTTTGAGTC	290	
		R: GCTTTGGCGCTGCCGTAAGTT		
Мультиплексная ПЦР №3	N146 (SCAR / ген <i>HI</i> )	F: AAGCTCTTGCCTAGTGCTC	506	10 мин – 94°C, далее 35 циклов: 30 с – 94°C, 30 с – 60°C, 1 мин – 72°C и финальная элонгация 5 мин – 72°C (Asano et al., 2012)
		R: AGGCGGAACATGCCATG		
	N195 (SCAR / ген <i>HI</i> )	F: TGGAAATGGCACCCACTA	337	
		R: CATCATGGTTTCACTTGTCAC		
	Gro1-4-1 (STS / ген <i>Gro1-4</i> )	F: AAGCCACAACCTCTACTGGAG	602	
		R: GATATAGTACGTAATCATGCC		
	Gpa2-2 (STS / ген <i>Gpa2-2</i> )	F: GCACTTAGAGACTCATTCCA	452	
		R: ACAGATTGTTGGCAGCGAAA		
	GBSS1-3 (STS / ген <i>GBSS1</i> )	F: AAAGGAGGCTCTTCAAGCAG	853	
		R: TGCAAGAGCTCTAGCAACTG		

### Результаты и обсуждение

Ген *H1*, интрогрессированный в большинство сортов от формы CPC 1673 *S. andigenum* Juz. et Buk., по результатам молекулярного скрининга идентифицирован у 85% устойчивых к *G. rostochiensis* образцов картофеля. Высокая частота встречаемости SCAR-маркеров гена *H1* связана с широким использованием клона *S. andigenum* в селекции картофеля, а также его генетической близостью к *S. tuberosum* по генам хозяйственно-ценных признаков и легкой скрещиваемостью (Rogozina, Kiru, 2005).

Наследование маркеров гена *H1* в поколении  $F_1$  изучено на примере гибридных

комбинаций 2652 [Малиновка (*H1*, *Gpa2*) × 93.20-12], 1647 [Feloх (*H1*) × Ягодка] и 4421 [Roko (*H1*, *Gro1-4*) × Русский сувенир], полученных от сортов картофеля устойчивых к *G. rostochiensis* (табл. 2). Несмотря на многочисленное число проанализированных генотипов, во всех гибридных комбинациях наблюдается расщепление 1:1 (при  $N = 1$ ,  $P = 0,05$ ). Это указывает на то, что используемые в качестве родительских форм сорта 'Малиновка', 'Feloх' и 'Roko' являются симплексами, т. е. содержат одну дозу или одну доминантную аллель гена *H1*. Достоверность соответствия результатов молекулярного скрининга теоретически ожидаемым данным подтверждается математически с помощью критерия хи-квадрат.

**Таблица 2. Расщепление по устойчивости к картофельной цистообразующей нематоды (КЦН) в поколении  $F_1$  различных родительских форм**

**Table 2. Segregation according to potato cyst nematode (PCN) resistance in  $F_1$  obtained from different parental forms**

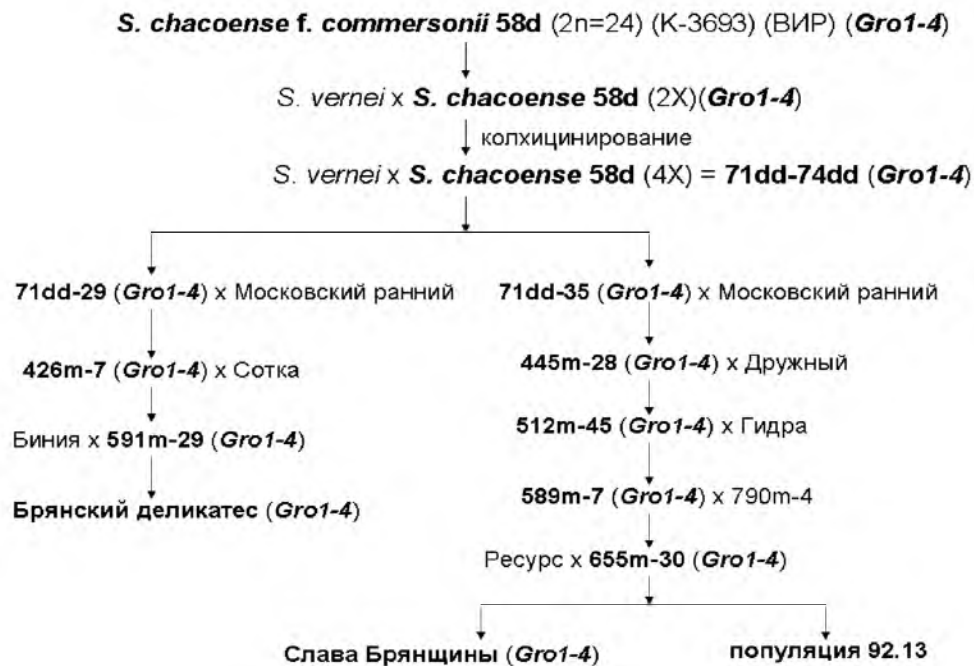
Происхождение популяции	N	Ген / Маркер		Отношение устойчивых генотипов к неустойчивым			
				по маркерам		по фенотипу	
				наблюдаемое	критерий хи-квадрат	наблюдаемое	критерий хи-квадрат
Малиновка ( <i>H1 Gpa2</i> ) × 93.20-12 (2652)	27	<i>H1</i>	TG689	15 : 12	0,3320	14 : 13	0,0027
			57R	14 : 13	0,0027	14 : 13	0,0027
			N195	14 : 13	0,0027	14 : 13	0,0027
			N146	14 : 13	0,0027	14 : 13	0,0027
		<i>Gpa2</i>	Gpa2-2	19 : 8	0,3090	-	-
Feloх ( <i>H1</i> ) × Ягодка (1647)	36	<i>H1</i>	TG689	21 : 15	1,0000	22 : 14	1,7700
			57R	22 : 14	1,7700	22 : 14	1,7700
			N195	23 : 13	1,8000	22 : 14	1,7700
			N146	22 : 14	1,7700	22 : 14	1,7700
Roko ( <i>H1 Gro1-4</i> ) × Русский сувенир (4421)	19	<i>H1</i>	TG689	10 : 9	0,5200	12 : 7	1,3200
			57R	11 : 8	0,4700	12 : 7	1,3200
			N195	11 : 8	0,4700	12 : 7	1,3200
			N146	11 : 8	0,4700	12 : 7	1,3200
	17	<i>Gro1-4</i>	Gro1-4	9 : 8	0,0590	10 : 7	0,5300
			Gro1-4-1	9 : 8	0,059	10 : 7	0,5300
Assia ( <i>Gro1-4</i> ) × 88.16/20 (101)	55	<i>Gro1-4</i>	Gro1-4	29 : 26	0,8	24 : 31	1,3400
			Gro1-4-1	29 : 26	0,8	24 : 31	1,3400

Известно, что ген *H1*, обеспечивает резистентность только к двум патотипам Ro1 и Ro4 *G. rostochiensis*, тогда как селекция на устойчивость направлена на защиту картофеля против всевозможных популяций нематоды. Поэтому интерес для селекционеров представляют образцы картофеля, у которых детектируются маркеры другого доминантного гена *Grol-4*, контролирующего устойчивость к пяти патотипам (Ro1–Ro5) *G. rostochiensis*. В результате молекулярного анализа с учетом родословных изученных генотипов картофеля установлено, что источником гена *Grol-4* среди образцов генетических коллекций ВНИИКХ является форма *S. chacoense* Bitter 58 d-22, полученная от самоопыления *S. chacoense* к-3693 (поступивший в ВИР как *S. commersonii* Dup.) (рисунок). С участием диплоидной формы дикого вида *S. chacoense* получен амфидиплоид *S. vernei* Bitt. et Wittm. (к-5428) × *S. chacoense* 58 d-22, от которого происходят нематодоустойчивые формы 591m-29 и 655 m-30 (см. рисунок), ставшие родоначальниками популяции 92.13 (Ресурс × 655m-30) и сортов ‘Брянский деликатес’, ‘Слава Брянщины’ (Yashina, 2003). Маркеры гена *Grol-4* обнаружены у форм видов *S. yungasense* Hawkes (к-2820), *S. dolichostigma* Buk. nom. nud. (к-7613), *S. × sucrense* Hawkes (к-23599), *S. vernei* Bitter et Wittm. ex Engl. (к-10554), *S. gourlayi* Hawkes (к-23342), *S. leptophyes* Bitter (к-5764) из коллекции ВИР (Chalaya et al., 2012), а также у сорта ‘Ли́ра’ селекции ВНИИКХ, содержащего генетический материал *S. acaule* Bitter, и иностранного сорта ‘Alwara’, широко используемого в качестве материнского компонента скрещивания в селекционных программах ВНИИКХ. Образцы *S. × doddsii* Cogn. (к-19817, ВИР) и *S. sparsipilum* (Bitter) Juz. et Buk. (к-20700, ВИР) содержат только *Grol-4*. Для изучения процесса интрогрессии маркеров гена *Grol-4* от устойчивых форм в поколении гибридов F<sub>1</sub> была получена модельная популяция от сорта ‘Assia’ (источник гена *Grol-4*) из коллекции ВИР и неустойчивого к нематоду гибрида 88.16/20. В целом, распределение устойчивых и неустойчивых к *G. rostochiensis* форм по фенотипу (24:31) и по ДНК-маркерам (29:26) значимо не раз-

личалось на уровне <5% по критерию хи-квадрат (см. табл. 2). Однако в результате молекулярного анализа были обнаружены восприимчивые к нематоду генотипы картофеля, содержащие маркеры *Grol-4* и *Grol-4-1* («ложноположительные» результаты). Для подтверждения специфичности маркеров гена *Grol-4* требуется проведение дополнительных исследований по их верификации. На территории РФ распространен патотип Ro1 *G. rostochiensis*, но из-за регулярного ввоза семенного картофеля из стран Западной Европы нельзя исключать возможность случайной интродукции более агрессивного вида *G. pallida*. Поэтому большое внимание уделяется созданию сортов резистентных к широкому спектру патотипов обоих видов нематоды. Частичная устойчивость к *G. pallida* (популяции Pa2 и Pa3) детерминируется доминантным геном *Gpa2*, источником которого, как и для гена *H1*, является *S. andigenum* (главным образом CPC 1673-20). Хотя селекция на устойчивость к бледной картофельной нематоду специально не проводится, STS-маркер *Gpa2* детектирован у 16% образцов генетических коллекций и перспективных гибридов ВНИИКХ и ВИР. Маркерные технологии позволяют идентифицировать устойчивые по фенотипу растения, у которых резистентность к КЦН, контролируется несколькими генами от разных источников, обеспечивающими более надежную и продолжительную защиту. Комбинация двух генов устойчивости выявлена у 10% генотипов картофеля (табл. 3). Среди сортов отечественной селекции комплексная устойчивость к нематоду отмечена у сорта ‘Кумач’ (ВНИИКХ). Гибриды 2646-11 – происхождение: 92.13-186 (*Grol-4*) × 91.30-66 [Россиянка (*H1*, *Gpa2*) × 88.34/14], и 1327-1 – происхождение: Ли́ра (*Grol-4*) × Ра́ја (*H1*, *Gpa2*), по результатам МОС, содержат гены *H1*, *Grol-4*, *Gpa2* и являются источниками устойчивости к нескольким патотипам КЦН. Использование различных SCAR-маркеров гена *H1* для изучения образцов генетических коллекций и перспективных гибридов позволило провести сравнительную оценку их диагностического потенциала как предикторов устойчивости к *G. rostochiensis*. Все четыре маркера

TG689, 57R, N146 и N195 присутствовали у 78% генотипов картофеля, содержащих ген *H1*. Сопоставление данных о присутствии/отсутствии маркерных компонентов с фенотипической оценкой на устойчивость у разных форм картофеля выявило случаи с «ложноотрицательными» (когда есть устойчивость и нет маркера) и «ложноположительными» (есть маркер, но нет устойчивости) результатами исследований (табл.

4). По результатам предварительного испытания в лабораторных условиях, гибриды картофеля селекции ВНИИКС – 4644-26 (Любава × Felox), 4422-7 (Romanze × Русский сувенир), 4421-1 (Roko × Русский сувенир), и гибрид ВИР 99-6-6 (90-6-2 × Нерта) отнесены к числу «устойчивых» генотипов, однако молекулярные маркеры генов *H1* и *Gro1-4* у них не обнаружены.



**Использование *Solanum chacoense* f. *commersonii* 58d в селекции на устойчивость к *Globodera rostochiensis* (по: Яшина, 2003)**  
**Application of *Solanum chacoense* f. *commersonii* 58d in breeding for resistance to *Globodera rostochiensis* (from Yashina, 2003)**

Отсутствие специфических маркерных компонентов у таких форм картофеля, может быть связано с плохо состоявшимся процессом заражения, наибольшее влияние на который оказывает температурный фактор, а также группа спелости (возраст) и физиологическое состояние тестируемых генотипов. Зависимость фитопатологической оценки от условий среды снижает объективность уровня корреляции между наличием маркера и фенотипической устойчивостью к нематоду. Лабораторное тестирование проводится весной, когда при благоприятных условиях картофель начинает продуцировать стимулирующие корневые выделения, активирующие содержа-

ние цисты и способствующие вылуплению личинок. У средне- и позднеспелых сортов образцов и гибридов картофеля рост корней и световых ростков (прорастающих глазков) происходит медленнее, что сказывается на коэффициенте размножения нематоды, т. к. на более слабой корневой системе развивается лишь незначительное количество цист (Decker, 1972). Все вышеперечисленные генотипы картофеля являются среднеспелыми, что подтверждает возможность несостоявшегося процесса заражения нематодой. Для получения более объективных результатов лабораторно-полевую оценку на устойчивость к ЗКН проводят в течение нескольких лет и, как правило, при



повторном тестировании часть таких «устойчивых» образцов может поражаться *G. rostochiensis*. Наиболее высокий уровень ассоциации маркер-признак отмечен для маркера 57R, характеризующегося наименьшим количеством несовпадений с фенотипической устойчивостью генотипов картофеля. Молекулярные маркеры N146 и N195 являются ко-сегрегирующими (Mori et al., 2011) и детектируются совместно у большинства резистентных образцов картофеля. Исключением является гибрид 2646-5, у которого идентифицирован только N146. Уникальная комбинация из двух маркеров гена *H1* – TG689 и 57R выявлена у гибрида 1608-10 (2323-26 × Наяда).

**Таблица 3. Генотипы с комплексом генов устойчивости к картофельной цистообразующей нематоде (КЦН) по результатам маркер-опосредованной селекции (МОС)**  
**Table 3. Genotypes with a set of potato cyst nematode (PCN) resistance genes identified in the marker-mediated breeding process**

Комбинация генов	Генотипы
<i>H1, Gro1-4, Gpa2</i>	1327-1 (Ли́ра × Ра́ја); 2646-11 (92.13-186 × 91.30-66)
<i>H1, Gro1-4</i>	2643-7, 2643-12 (Слава Брянщины × 92.4-75); 2513-5, 2513-53 (Ли́ра × Ау́сония); 93.13-213, 93.12-212 (Жуковский ранний × 655m-30); 2646-7 (92.13-186 × 91.30-66); сорт Кумач [Удача × Гранат (Белоруссия)]; 4421-12, 4704-61 (Роко × Русский сувенир); 4434-1 (Роко × Аврора); 1608-10 (2323-26 × Наяда); 1575-3, 1575-7, 1575-18 (А́роза × Наяда)
<i>H1, Gpa2</i>	134-6-2006 (создан в ВИР); 135-2-2006 (создан в ВИР); 1370-33 (Ли́ра × Ау́сония); 1604-2 (96.5-7 × Маэстро); 1658-5, 1658-10, 1658-20, 1658-23 (Каска́р × 1275-5); 4518-4 (Крепыш × Наяда); 4578-2 (Courage × Дубрава); 2658-3, 2658-8, 2658-10, 2658-12, 2658-15, 2658-16, 2658-19, 2658-30, 2658-31 (Малиновка × 93.20-12); 2607-94 (Елизавета × Пушкинец); 4062-2, 4062-5 (707-4 × Шурминский); 4738-5 (Никулинский × Ау́сония)
<i>Gro1-4, Gpa2</i>	2646-13 (92.13-186 × 91.30-66); 4707-38 (Альвара × 88.17/72)

Однако, сложно правильно интерпретировать наличие маркеров с результатами фитопатологической оценки для этого генотипа картофеля, поскольку вклад в его устойчивость кроме *H1* вносит другой ген – *Gro1-4*. Присутствие TG689 и N195 при отсутствии других маркеров у восприимчивых генотипов картофеля («ложноположительные» случаи) связано с их недостаточной специфичностью по отношению к гену *H1*. «Ложноположительные» результаты молекулярного анализа для гибрида картофеля 4609-14 (Колобок × Аврора) и сорта ‘Тулеевский’, содержащих по четыре и три маркера гена *H1*, соответственно, (табл. 5), связаны с несовершенством существующей в РФ шкалы оценки, согласно которой, устойчивыми являются формы с

полным отсутствием цист на корнях растений. Поэтому большинство слабопоражаемых сортов отечественной селекции, входящие в Госреестр, считаются неустойчивыми. Однако в процессе оценки при искусственном заражении часть гибридов отличается замедленной реакцией сверхчувствительности, в результате которой на корнях таких растений формируется от 1 до 10 цист на корневой ком. Причем скорость реакции сверхчувствительности зависит от условий проведения заражения и может варьировать год от года. В отдельные годы фитопатологических испытаний реакция быстрая, и цист на корнях не образуется совсем. В потомстве родителей, обладающих замедленной реакцией сверхчувствительности, могут появляться гибриды с бо-

лее быстрой реакцией, и наоборот, слабо-восприимчивые гибриды – в потомстве от устойчивых родителей. Возникает целесообразность внесения изменений в «Положение о порядке испытания картофеля на устойчивость к возбудителю рака картофеля (патотип I) и золотистой картофельной цистообразующей нематоды (патотип Ro1)» (Regulation..., 1993). Важно продолжать

исследование причин появления генотипов с замедленной реакцией сверхчувствительности. До настоящего времени еще не выяснено наличие или отсутствие корреляций между скоростью реакции и уровнем экспрессии доминантных генов, как это наблюдается в отношении сверхчувствительности R-генов к фитофторозу.

**Таблица 4. Наличие (присутствие/отсутствие) маркеров устойчивости к *Globodera rostochiensis* у генотипов картофеля**  
**Table 4. Presence/absence of *Globodera rostochiensis* resistance markers in potato genotypes**

Присутствие/отсутствие маркера (1/0)	Фенотип			N	Уровень ассоциации маркер-признак $K_{\phi}$
	R (SS)	S	R(SS) + S		
TG689 (ген <i>H1</i> )	1	164	12	349	64%
	0	50	123		
57R (ген <i>H1</i> )	1	202	1	349	96%
	0	12	134		
N146 (ген <i>H1</i> )	1	199	1	349	91%
	0	15	134		
N195 (ген <i>H1</i> )	1	200	4	349	90%
	0	14	131		
Gro1-4 (ген <i>Gro1-4</i> )	1	87	6	157	81%
	0	9	55		
Gro1-4-1 (ген <i>Gro1-4</i> )	1	85	6	157	78%
	0	11	55		

Условные обозначения: R – устойчивые генотипы, SS – слабовосприимчивые генотипы, S – восприимчивые генотипы; N – общее число проанализированных генотипов.

### Выводы

Скрининг более 450 образцов генетических коллекций и перспективных гибридов ВНИИКХ и ВИР позволил выявить недостатки и преимущества использования молекулярных маркеров в селекции картофеля на устойчивость к картофельной цистообразующей нематоды (КЦН). Наиболее эффективным по результатам исследований

является маркер 57R гена *H1*, характеризующийся высоким уровнем корреляции маркер-признак. Установлено, что случаи несовпадения результатов молекулярного анализа с фенотипической устойчивостью образцов картофеля связаны не только со специфичностью используемых маркеров, но и с недостаточной объективностью лабораторно-полевого испытания, влияние на которое оказывают внешние факторы, а

также с несовершенством используемой в лекций ВНИИКХ и ВИР выделены новые РФ шкалы оценки на устойчивость к нематоде. В результате маркер опосредованной селекции среди образцов генетических кол-

лекций ВНИИКХ и ВИР выделены новые источники устойчивости к КЦН и генотипы с комплексом генов, представляющие интерес для дальнейшей селекции

**Таблица 5. Результаты оценки на устойчивость к *Globodera rostochiensis* для некоторых генотипов картофеля.**  
**Table 5. Results of the evaluation of some potato genotypes for their resistance to *Globodera rostochiensis***

название сорта или гибрида	оценка по фенотипу	число цист		присутствие ДНК-маркеров генов устойчивости
		I	5, 7, 10	
Тулеевский	<b>восприимчив</b>	II	0, 3, 0	57R, N146 и N195
	слабовосприимчив			57R, N146 и N195
Даренка	слабовосприимчив		0, 1, 1	TG689, 57R, N146 и N195
1604-22 (96.5-7 × Maestro)	слабовосприимчив		0, 0, 1, 2	TG689, 57R, N146 и N195
2643-1 (Слава Брянщины × 92.4-75)	слабовосприимчив		5, 0, 1	Gro1-4, Gro1-4-1
2747-19 (Вектор × Romanze)	слабовосприимчив		0, 3, 0	TG689, 57R, N146 и N195
2646-13 (92.13-186 × 91.30-66)	слабовосприимчив		3, 1, 0	Gro1-4, Gro1-4-1
4609-14 (Колобок × Аврора)	<b>восприимчив</b>		10, 0, 0	TG689, 57R, N146 и N195
2670-23 (2308-11 × Талисман)	слабовосприимчив		5, 6, 0	TG689, 57R, N146 и N195
4731-98 (Табор × Брянский надежный)	слабовосприимчив		7, 0, 0	TG689, 57R, N146 и N195
4738-11 (Никулинский × Ausonia)	слабовосприимчив		2, 5, 0	TG689, 57R, N146 и N195
4440-7 (Kaskar × Ausonia)	слабовосприимчив		0, 0, 2	TG689, 57R, N146 и N195

### References/Литература

- Asano K., Kobayashi A., Tsuda S., Nishinaka M., Tamiya S. DNA marker assisted evaluation of potato genotypes for potential resistance to potato cyst nematode pathotypes not yet invading into Japan // *Breed. Sci.*, 62, 2012, pp. 142–150.
- Biryukova V. A., Zhuravlev A. A., Abrosimova S. B., Kostina L. I., Khromova L. M., Shmyglya I. V., Morozova N. N., Kirsanova S. N. Use of molecular markers of potato golden nematode resistance genes *H1* and *Gro1*. // *Russ. Agric. Sci.* 34, 2008, pp. 365–368 [in Russian] (Бирюкова В. А., Журавлев А. А., Абросимова С. Б., Костина Л. И., Хромова Л. М., Шмыгля И. В., Морозова Н. Н., Кирсанова С. Н. Использование молекулярных маркеров генов *H1* и *Gro1* устойчивости к золотистой картофельной нематоде. // Российская сельскохозяйственная наука (Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук). 2008. № 6. С. 3–6).
- Chalaya N. A., Biryukova V. A., Kiru S. D. New sources of resistance to the golden potato cyst nematode (*G. rostochiensis* Woll.) from the collection of wild potato species of the VIR. // *Izvestiya of the St. Petersburg Agrarian University*, 2012, no. 26, pp. 45–50 [in Russian] (Чалая Н. А., Бирюкова В. А., Кирю С. Д. Новые источники устойчивости к золотистой картофельной нематоде (*G. rostochiensis* Woll.) из коллекции дикорастущих видов картофеля ВИР // Известия Санкт-Петербургского

- аграрного университета. 2012. № 26. С. 45–50).
- Dalamu Bhardwaj V., Umamaheshwari R., Sharma R., Kaushik S. K., Joseph T. A., Singh B. P., Gebhardt C.* Potato cyst nematode (PCN) resistance: genes, genotypes and markers – an update. // *SABRAO Journal of Breeding and Genetics*, 2012, 44 (2), pp. 202–228.
- Decker H.* Plant nematodes and their control. Moscow: «Kolos», 1972, 444 p. [in Russian] (Деккер Х. Нематоды растений и борьба с ними. М.: «Колос», 1972. 444 с.).
- Finkers-Tomczak A. M., Bakker E., de Boer J., van der Vossen E., Achenbach U., Golas T., Suryanigrat S., Smart 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, pp. 595–608.
- Galek R., Rurek M., De Jong W. S., Pietkiewicz G., Augustyniak H. C., Sienkiewicz E. S.* Application of DNA markers linked to the potato *H1* gene conferring resistance to pathotype Ro1 of *Globodera rostochiensis*. // *J. Appl. Genet.*, 2011, 52, pp. 407–411.
- Gebhardt C., Bellin D., Henselewski H., Lehmann W., Schwarzfischer J., Valkonen J. P.* Marker assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato // *Theor. Appl. Genet.*, 2006, 112, pp. 1458–1464.
- Milczarek D. A.* Multiplex PCR Method of Detecting Markers Linked to Genes Conferring Resistance to *Globodera rostochiensis* // *Am. J. Potato Res.*, 2012, 88, pp. 245–255.
- Milczarek D., Flis B., Przetakiewicz A.* Suitability of molecular markers for selection of potatoes resistant to *Globodera* ssp. // *Am. J. Potato Res.*, 2011, 88, pp. 245–255.
- Mori K., Sakamoto Y., Mukojima N., Tamiya S., Nakao 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* 180, 2011, pp. 347–355.
- Rogozina E. V., Kiru S. D.* Donors potato resistance to pathogens and product quality // In: Identified plant gene pool and breeding. St. Petersburg, 2005, pp. 443–470 [in Russian] (Рогозина Е. В., Кирю С. Д. Доноры устойчивости картофеля к патогенам и качеству продукции // В кн.: Идентифицированный генофонд растений и селекция. СПб., 2005. С. 443–470).
- Sagai-Marroof M. A., Soliman K. M., Jorgensen R. A., Allard R. W.* Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, pp. 8014–8018.
- 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 Breed.*, 2012, 131, pp. 315–321.
- Volovik A. S., Trofimets L. N., Dolyagin A. B., Glez V. M.* Methods for the research of potato protection on diseases, pests, weeds and immunity. Moscow: VNIKH, 1995, 105 p. [in Russian] (Воловик А. С., Трофимец Л. Н., Долягин А. Б., Глез В. М. Методика исследований по защите картофеля от болезней, вредителей, сорняков и иммунитету. М.: ВНИИКХ, 1995. 105 с.).
- Yashina I. M.* Methodological instructions for process control technology introgression of genes from wild potato species in breeding varieties and hybrids. Moscow: Academy of Agricultural Sciences, 2003. 32 p. [in Russian] (Яшина И. М. Методические указания по технологии управления процессом интрогрессии ценных генов от диких видов картофеля в селекционные сорта и гибриды. М.: РАСХН, 2003. 32 с.).
- Regulation on the procedure of testing of genotypes for resistance to the wart of potato (patotype I) and Golden potato cyst nematode (patotype I): utv. M-vom sel. khoz-va RF 17.03.1993.* Moscow, 1993, 10 p. [in Russian] (Положение о порядке испытания картофеля на устойчивость к возбудителю рака картофеля (патотип I) и золотистой картофельной нематоды (патотип I): утв. М-вом сел. хоз-ва РФ 17.03.1993. М., 1993. 10 с.)