СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОЛОГИЯ, 2017, том 52, № 5, с. 964-975

УДК 633.491:631.527.51:577.21 doi: 10.15389/agrobiology.2017.5.964rus

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ *R* ГЕНОВ И ТИПОВ ЦИТОПЛАЗМЫ ПРИ ИНТРОГРЕССИВНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ ДИКИХ ПОЛИПЛОИДНЫХ МЕКСИКАНСКИХ ВИДОВ КАРТОФЕЛЯ*

Н.М. ЗОТЕЕВА[1], О.Ю. АНТОНОВА[1], Н.С. КЛИМЕНКО[1], О.В. АПАЛИКОВА[1], U. CARLSON-NILSSON[2, 3], Ю.И. КАРАБИЦИНА[1], Ю.В. УХАТОВА[1], Т.А. ГАВРИЛЕНКО[1, 4]

Задачи расширения генетического разнообразия селекционного материала и получения сортов картофеля, сочетающих высокую продуктивность с комплексной и групповой устойчивостью к патогенам, решаются на основе совместного использования межвидовой гибридизации и маркер-опосредованного отбора (MAS, marker-assisted selection). Нами выполнен молекулярный скрининг оригинальных гибридов от 11 комбинаций скрещиваний, полученных с участием мексиканских (*Solanum stoloniferum*, *S. guerreroense*) и южно-американских (*S. microdontum*, *S. tarijense*, *S. kurtzianum*) диких видов картофеля, и их потомств; *S. guerreroense* был вовлечен в селекционный процесс впервые. MAS существенно повышает эффективность работ по пирамидированию целевых генов устойчивости и, кроме того, позволяет контролировать распространение нежелательных генетических факторов, например интрогрессированного от *S. stoloniferum* митотипа γ (W/γ тип цитоплазмы), ассоциированного с мужской стерильностью сортов и гибридов. В настоящей работе показана возможность повысить эффективность интрогрессивной гибридизации культурного картофеля с мексиканскими полиплоидными видами *S. neoantipoviczii* (=*S. stoloniferum*) и *S. guerreroense* на основе использования в молекулярном скрининге ДНК-маркеров различных типов цитоплазмы и маркеров, ассоциированных с *R* генами устойчивости к наиболее вредоносным патогенам картофеля. По результатам молекулярного скрининга были отобраны генотипы с различным сочетанием маркеров генов, детерминирующих устойчивость к фитофторозу (*R2 like*, *R3a*, *Rpi-blb1*, *Rpi-sto1*), Y-вирусу картофеля (PVY) (Ry_{adg}, Ry_{sto}, $Ry\text{-}f_{sto}$) и золотистой картофельной нематоде (*H1*), и среди них выявлены клоны с высокой полевой устойчивостью к фитофторозу (7-8 баллов) и к YBK. Из 35 гибридных клонов, отобранных в разных комбинациях скрещиваний (исходными материнскими формами служили образцы полиплоидных мексиканских видов), 18 характеризовались мужской стерильностью и имели тип цитоплазмы W/γ, стабильно передающийся по материнской линии. Остальные гибриды с цитоплазмой W/α типа формировали фертильную пыльцу. Часть из них использовали в скрещиваниях в качестве опылителей, что позволило получить многовидовые гибриды, объединяющие в одном генотипе маркеры генов устойчивости от разных мексиканских полиплоидных видов. Можно полагать, что при поиске источников устойчивости к патогенам в популяциях полиплоидных мексиканских видов целесообразно одновременно проводить отбор против генотипов, которые служат донорами стерилизующего типа цитоплазмы W/γ, нежелательного для традиционной селекции. Отбор гибридных клонов с типом цитоплазмы W/α позволяет увеличить вероятность получения интрогрессивных форм с мужской фертильностью. Совместное использование двух систем молекулярных маркеров (ядерных, ассоциированных с *R* генами устойчивости, и цитоплазматических, детектирующих различные типы цитоплазмы) позволит повысить результативность подбора пар для скрещиваний, сокращая сроки и снижая затраты на перенос в один генотип целевых генов из разных источников.

Ключевые слова: *Solanum* spp., картофель, ДНК-маркеры, *R* гены, типы цитоплазмы, межвидовая гибридизация.

Благодаря изучению диких и культурных видов картофеля из коллекции ВИР (Всероссийский институт генетических ресурсов растений), формирование которой началось на основе экспедиционных сборов 1926-1933 годов (1-3), отечественные ученые создали теорию о центрах его происхождения и разнообразия (1, 2), впервые обосновав и начав реализовывать новое на тот момент направление в мировой селекции картофеля — интрогрессивную межвидовую гибридизацию (2-4). К концу XX века межвидовая гибридизация стала основным методом селекции этой культуры благодаря раз-

* Исследования по оценке устойчивости к фитофторозу в эпифитотийный сезон 2016 года, молекулярному скринингу и определению фертильности пыльцы (2016-2017 годы, ВИР, г. Санкт-Петербург, Россия) поддержаны грантом РНФ № 16-16-04125. Гибридизация, оценка устойчивости к фитофторозу и Y-вирусу картофеля (2012-2015 годы, Swedish University of Agricultural Sciences — SLU, Швеция) выполнены при поддержке фонда E. & I. Nilssons Foundation.

работке способов преодоления пре- и постзиготической межвидовой несовместимости, включающих планирование скрещиваний на основе значений эффективной плоидности (EBN — endosperm balance number) родительских видов, изменение плоидности скрещиваемых образцов, поиск видов-посредников, использование реципрокных скрещиваний для нивелирования ядерно-цитоплазматических конфликтов, что позволило привлечь в селекционный процесс дикие виды из вторичного и третичного генетических пулов (5-9).

Современная селекция картофеля ориентирована на расширение генетического разнообразия источников и доноров хозяйственно ценных признаков и получение на их основе сортов, сочетающих высокую продуктивность с комплексной и групповой устойчивостью к патогенам. Эти задачи решаются на основе использования межвидовой гибридизации и маркер-опосредованного отбора (marker-assisted selection, MAS) (10-12), а также методов биотехнологии (13). Применение MAS кардинально повышает эффективность программ по пирамидированию целевых генов/QTL, детерминирующих устойчивость к патогенам, и позволяет контролировать распространение нежелательных генетических детерминант. Так, интрогрессия *R* генов устойчивости от мексиканских полиплоидных видов *Solanum stoloniferum* и *S. demissum* нередко сопровождается передачей гибридам признаков, осложняющих традиционный селекционный процесс (14, 15). Многие гибриды и сорта, обладающие иммунитетом к Y-вирусу картофеля (PVY), одновременно характеризуются мужской стерильностью — формированием полностью стерильных пыльцевых зерен аномальной морфологии (16, 17). Этот признак, затрудняющий подбор пар для скрещиваний, передается по материнской линии от образцов дикого вида *S. stoloniferum* — источников гена экстремальной устойчивости к YBK Ry_{sto} (16, 17). Разработаны маркеры, позволяющие идентифицировать митотипы α, β и γ, и установлена статистически значимая связь митотипа γ (тип цитоплазмы W/γ) с цитоплазматической мужской стерильностью сортов и гибридов, в родословных которых присутствует *S. stoloniferum* (18). Эти результаты нашли подтверждение в работах других исследователей (16, 17). В то же время устойчивые к PVY сорта с цитоплазмой W/α типа чаще всего фертильны (16). Другим примером совместной передачи целевых генов и мужской стерильности может служить наследование гибридами *R* генов расоспецифической устойчивости к фитофторозу и цитоплазматических детерминант мексиканского вида *S. demissum* (17, 19). Гибриды и сорта с цитоплазмой D (W/α) от *S. demissum* формируют пыльцевые зерна нормальной морфологии, которые, однако, функционально стерильны (17, 20). Очевидно, что при передаче различным интрогрессивным формам стерилизующих типов цитоплазмы программы по пирамидированию *R* генов могут иметь серьезные ограничения.

В настоящей работе на оригинальном гибридном материале продемонстрирована возможность повышения эффективности интрогрессивной гибридизации за счет использования ДНК-маркеров разных типов цитоплазмы вместе с маркерами *R* генов устойчивости к наиболее вредоносным патогенам картофеля. В MAS вовлекались гибридные клоны, отобранные по устойчивости к патогенам и по морфологическим характеристикам клубней из расщепляющихся популяций двувидовых (простых) и многовидовых гибридов мексиканских полиплоидных видов — *S. neoantipoviczii* (=*S. stoloniferum*) и *S. guerreroense* (привлечен в селекционный процесс впервые). Для *S. guerreroense* взаимосвязь мужской стерильности и W/γ типа цитоплазмы показана впервые.

Цель работы заключалась в получении потомств многовидовых гибридов на основе диких полиплоидных мексиканских видов картофеля и их

молекулярном скрининге с применением ДНК-маркеров типа цитоплазмы и устойчивости к наиболее вредоносным патогенам — *Phytophthora infestans*, Y вирусу картофеля и золотистой картофельной нематоде.

Методика. Исходными родительскими формами оригинальных межвидовых гибридов служили образцы мексиканских и южно-американских видов, селекционные клоны и сорта из коллекций ВИР и SLU (Swedish University of Agricultural Sciences, Швеция), выделенные по высокой устойчивости листьев и (или) клубней к фитофторозу и по устойчивости к PVY (21-23). Образцы ВИР были представлены клонами мексиканских диких видов *S. neoantipoviczii* (=*S. stoloniferum*) (к-8505) (nan) с высокой устойчивостью листьев к фитофторозу и устойчивостью к PVY (штаммы PVY^0, PVY^{N-Wi}, PVY^{NTN}), а также *S. guerreroense* (к-18407) (grr) с устойчивостью к PVY (штаммы PVY^0, PVY^{N-Wi}) и высокой устойчивостью листьев к фитофторозу (22). Весьма вероятно, что у *S. neoantipoviczii* к-8505 ген Ry_{sto} находится в гомозиготном состоянии, поскольку при индивидуальном анализе у каждого из сеянцев был обнаружен маркер YES3-3A гена Ry_{sto} (24). Южно-американские дикие виды представляли клоны образцов с высокой (*S. microdontum*, к-20320) (mcd) и частичной (*S. tarijense*, к-10712) (tar) устойчивостью листьев (22, 25), а также клубней (*S. kurtzianum*, к-12488) (ktz) к фитофторозу (22). Клоны *S. kurtzianum* (к-12488) и *S. tarijense* (к-10712) способны к клубнеобразованию в условиях продолжительного светового дня, их клубни имеют хорошие морфологические характеристики. У культурного андийского вида *S. tuberosum* subsp. *andigenum* (к-8077) (adg) у части растений отмечали устойчивость клубней к фитофторозу. Из коллекции SLU были получены следующие селекционные клоны: SW-0906512 — фертильный урожайный клон с хорошими агрономическими характеристиками, проявляет полевую устойчивость к PVY; SW93-1015 — клон неизвестного происхождения, характеризуется полевой устойчивостью к фитофторозу конститутивного типа (26), обусловленной геном *R2 like* (27), а также устойчивостью к PVY (23), недостаток этого клона — повышенное содержание α-чаконина в клубнях (23); клон NZ2010-10nb, полученный с участием *S. stoloniferum*, растения которого проявляют полевую устойчивость к фитофторозу и PVY. Селекционные сорта Campina, Desirée, Sarpo Mira и Superb (коллекция SLU) использовали в скрещиваниях с целью улучшения агрономических признаков клубней у межвидовых гибридов; сорт Sarpo Mira проявляет высокую устойчивость к фитофторозу. Межвидовые гибриды получены Н.М. Зотеевой; некоторые двувидовые (простые) гибриды ранее охарактеризованы в полевых и лабораторных фитопатологических тестах (28-30). Генотипы, отобранные по устойчивости к PVY и фитофторозу, вовлекались в последовательные скрещивания для создания многовидовых гибридов. Всего в настоящей работе были изучены 35 гибридных клонов (11 комбинаций скрещиваний), которые разделили на три группы, различающиеся исходными материнскими формами — донорами цитоплазматических детерминант.

ДНК выделяли из листьев полевых растений с использованием модифицированного нами CTAB-метода (31).

Праймеры для молекулярного скрининга гибридов на наличие маркеров генов устойчивости к PVY (16, 32, 33), фитофторозу (27, 34-37) и золотистой картофельной нематоде (38) были отобраны на основании выполненного ранее анализа исходных родительских форм диких мексиканских видов.

Тип цитоплазмы у гибридов определяли по системе K. Hosaka и R. Sanetomo (17) с использованием предложенного ими набора, включающего четыре маркера различных участков пластидной ДНК (локусы *ndhC/trnV*, *rpl32/trnL-UAG*, *cemA*, *rps16/trnQ*) и маркеры двух участков ми-

тохондриального генома (локусы *rps10* и *rps19*).

ПЦР проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10 нг тотальной ДНК, 1× реакционный буфер («Диалат Лтд», Россия), 2,5 мМ $MgCl_2$, 0,4 мМ каждого из dNTPs, по 0,2 мкМ прямого и обратного праймеров и 1 ед. Taq ДНК-полимеразы («Диалат Лтд», Россия). В случае праймеров ALM4/ALM5 концентрацию dNTPs увеличивали до 0,6 мМ. Реакцию осуществляли в амплификаторе Mastercycler® Nexus Gradient («Eppendorf», Германия) при температурах отжига, соответствующих указанным в литературе (см. раздел *Результаты*). Для всех маркеров, кроме CAPS, ПЦР повторяли не менее 3 раз, для праймеров ALM4/ALM5 — не менее 5 раз.

Рестрикцию проводили в 30 мкл реакционной смеси согласно протоколам фирмы-производителя (НПО «СибЭнзим», Россия; http://russia.sibenzyme.com). Электрофоретическое разделение осуществляли в буфере TBE в 2 % агарозном геле с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в УФ-свете. Стандартом служил маркер молекулярной массы 100 bp + 1500 bp + 3000 bp (НПО «СибЭнзим», Россия).

Фертильность гибридов определяли с использованием общепринятого метода окраски пыльцы ацетокармином и по результатам скрещиваний.

Полевую устойчивость листьев к фитофторозу оценивали в 2014-2015 годах в условиях сильного распространения инфекции (SLU, Швеция), а также в эпифитотийный сезон 2016 года (экспериментальное поле Пушкинских лабораторий ВИР, Ленинградская обл.). Каждый год оценку проводили в динамике с начала появления инфекции на контрольных неустойчивых сортах (Desire, Bintje; коллекция SLU) и до конца вегетации растений. Использовали шкалу от 1 (целиком пораженное растение) до 9 баллов (отсутствие симптомов болезни).

Полевую устойчивость гибридных генотипов к PVY оценивали в 2012-2014 годах (SLU) на высоком инфекционном фоне (при сильной инвазии тлей в 2012 и в 2014 годах) на необрабатываемых посадках растений. В тех же посадках восприимчивый сорт Magnum Bonum (коллекция SLU) ежегодно проявлял сильные симптомы болезни. Растения без видимых симптомов вирусного поражения оценивали методом иммуноферментного анализа ELISA (Ensyme-linked immunosorbent assay) с использованием набора фирмы «BIOREBA AG» (Швейцария) согласно инструкции производителя. Абсорбцию измеряли на спектрофотометре Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer («Thermo Fisher Scientific», США). Показатель абсорбции выше 0,1 учитывали как положительную реакцию (чувствительность растений к вирусной инфекции). Ежегодно тесты проводили дважды — в конце июня и в самом начале августа в соответствии с рекомендациями International Potato Center (http://www.cipotato.org), касающимися возраста растений разных групп спелости.

Результаты. Ранее было показано, что у образца *S. guerreroense* (к-18407) присутствует маркер гена *R3a* (24), а у *S. neoantipoviczii* (=*S. stoloniferum*) (к-8505) — маркер гена Ry_{sto} (24). Поскольку в скрещиваниях участвовали образцы аборигенных и селекционных сортов картофеля, устойчивые к PVY и ЗКН (патотип Ro1), в молекулярный скрининг также были привлечены маркеры генов Ry_{adg} и *H1*.

Условия ПЦР и праймеры, использованные при молекулярном скрининге полученных гибридов картофеля, приведены в таблице 1.

В таблице 2 представлены формулы межвидовых комбинаций, многие из них осуществлены впервые. Как известно, виды картофеля с одинаковыми значениями эффективной плоидности (EBN) относительно легко скрещиваются друг с другом, формируя жизнеспособные гибридные семена (39). К таким комбинациям можно отнести скрещивания тетраплоидного

культурного картофеля (EBN = 4) и дикого мексиканского гексаплоидного вида *S. guerreroense* (EBN = 4), который в классической систематике относят вместе с *S. demissum* к серии Demissa. Аналогичным образом в комбинации nan × (mcd × trj) у *S. neoantipoviczii* (=*S. stoloniferum*), *S. microdontum* и *S. tarijense*, то есть у всех участников скрещиваний, EBN = 2 (см. табл. 2). В более сложных комбинациях правило EBN не соблюдалось, что достаточно часто происходит при получении многовидовых гибридов (9).

1. ДНК-маркеры, ассоциированные с *R* генами

Ген	Хромосома	Маркер	Последовательность праймера (5′→3′)	T_m, °C	Размер диагностического фрагмента, п.н.	Ссылка
			Устойчивость к Y-вирусу картофеля			
Ry_{sto}	XII	GP122-406/EcoRV	F: CAATTGGCTCCCGACTATCTACAG R: ACAATTGCACCACCTTCTCTTCAG	52	406	(32)
$Ry\text{-}f_{sto}$		YES3-3A	F: TAACTCAAGCGGAATAACCC R: AATTCACCTGTTTACATGCTTCTTGTG	55	341	(16)
Ry_{adg}	XI	RYSC3	F: ATACACTCATCTAAATTTGATGG R: AGGATATACGGCATCATTTTTCCGA	60	321	(33)
			Устойчивость к фитофторозу			
Rpi-blb1	VIII	blb 1	F: AACCTGTATGGCAGTGGCATG R: GTCAGAAAAGGGCACTCGTG	58	821	(34)
Rpi-sto1	VIII	Rpi-sto1	F: ACCAAGGCCACAAGATTCTC R: CCTGCGGTTCGGTTAATACA	65	890	(35)
R 1	V	R1-1250	F: CACTCGTGACATATCCTCACTA R: GTAGTACCTATCTTATTTCTGCAA-GAATTCTTATTTCTGCAAGAAT	65	1205	(36)
R2-like	IV	R2area 1/2	F: AAGATCAAGTGGTAAAGGCTGATG R: ATCTTTCTAGCTTCCAAAGATCACG	60	1137	(27)
R3a	XI	RT-R3a	F: ATCGTTGTCATGCTATGAGATTGTT R: CTTCAAGGTAGTGGGCAGTATGCTT	56	982	(37)
			Устойчивость к золотистой картофельной нематоде			
H1	V	57 R	F: TGCCTGCCTCTCCGATTTCT R: GGTTCAGCAAAAGCAAGGACGTG	60	452	(38)

Примечание. T_m — температура отжига праймеров.

Молекулярный скрининг гибридов с использованием маркеров различных типов цитоплазмы и маркеров *R* генов. *Гибриды от скрещиваний селекционного клона SW93-1015.* Все изученные гибридные клоны из двух комбинаций скрещиваний, полученных на основе селекционного клона SW93-1015 (материнская форма), имели тип цитоплазмы W/γ и полностью стерильную пыльцу аномальной морфологии (см. табл. 2), что указывает на присутствие *S. stoloniferum* в родословной SW93-1015. В пользу такого предположения свидетельствует и наличие в этом материале характерных для *S. stoloniferum* маркеров $YES3\text{-}3A_{341}$ и $GP122\text{-}406/EcoRV_{406}$, сцепленных соответственно с генами *Ry_{sto}* и *$Ry\text{-}f_{sto}$*, которые локализованы на XII хромосоме. Эти маркеры отсутствуют у других родительских форм гибридов в комбинации № 1 — образца *S. tuberosum* subsp. *andigenum* к-8077 и сорта Desirée (16, 40). Кроме того, отобранные гибридные клоны имели маркеры гена устойчивости к фитофторозу *R2-like* и гена устойчивости к ЗКН *H1* (см. табл. 2). Гибриды этой серии могли использоваться в дальнейших скрещиваниях только в качестве материнских форм. По сравнению с исходным селекционным клоном SW93-1015 гибриды из комбинации № 1 (SW93-1015 × adg) × Desirée имели большее число клубней на растении, которые были более выравнены по размеру.

Гибриды, полученные в скрещиваниях S. neoantipoviczii (=*S. stoloniferum*). Согласно данным литератуps, у *S. stoloniferum* встречаются образцы с типами цитоплазмы W/α и W/γ (41), причем с индукцией мужской стерильности у гибридов и сортов картофеля ассоциирован только второй из них (16-18, 41). Исходной материнской формой гибридов этой серии был образец *S. neoantipoviczii* (=*S. stoloniferum*) к-8505 с типом цитоплазмы W/α. Все полученные на его основе гибриды также обладали цитоплазмой W/α

типа и характеризовались разной степенью фертильности пыльцы (26,7-69,8 %). Гибрид [nan × (mcd × trj) × (grr × adg)] успешно использовался в качестве опылителя в дальнейших скрещиваниях, что указывает на функциональную фертильность его пыльцы (см. табл. 2).

2. Результаты молекулярного скрининга и фенотипирования гибридов картофеля в разных комбинациях скрещиваний с полиплоидными дикими мексиканскими видами (по группам в зависимости от исходной материнской формы)

Группа, вариант	Формула комбинаций	Тип цитоплазмы (число изученных сеянцев)	ФП, %	Наличие диагностических фрагментов маркеров *R* генов у отобранных генотипов									Устойчивость к фитофторозу в 2014-2016 годах, балл
				R1	*R2 like*	*R3a*	*blb1*	*Rpi-sto 1*	Ry_{adg}	Ry_{sto}	$Ry\text{-}f_{sto}$	***H1***	
I	SW93-1015 (♀)		0	–	+	–	–	–	–	+	+	+	8,0; 8,0; нд
1	(SW93-1015 × adg) × Desirée	W/γ (3)	0-1,0	–	+	–	–	–	–	+	+	–	нд; 7,0; 8,0
2	(SW93-1015 × adg) × {[nan × × (mcd × trj)] × (grr × adg)}	W/γ (3)	0-0,3	–	+	–	–	–	–	+	+	+	7,0; 6,0; 6,0
II	*S. neoantipoviczii* (♀)												
3.1	[nan × (mcd × trj)] × (grr × adg)	W/α (1)	69,8	–	+	–	+	+	+	+	–	–	7,0; 8,0; 7,0
3.2	[nan × (mcd × trj)] × (grr × adg)	W/α (1)	66,7	–	+	–	+	+	+	+	–	–	8,0; 8,0; 6,0
4	[{nan × (mcd ×tar)} × (grr × × adg)] × SW-0906512	W/α (1)	26,7	–	–	–	–	–	+	+	+	–	6,0; 6,0; 5,5
III	*S. guerreroense* (♀)												
5	grr × adg	W/α (6)	18,0-24,1	–	+	+	–	–	+	–	–	–	8,0; 8,0; 7,0
5.1	grr × Superb	W/α (4)	38,0-65,0	–	+	+			–	–	–	–	8,0; 7,0; 8,0
6	(grr × Superb) × Sarpo Mira	W/α (3)	16,0-16,8	–	+	+	–	–	+	–	–	–	8,0; 7,0; 8,0
7	(grr × Superb) × Desirée	W/α (1)	14,5	–	–	–	–	–	+	–	–	–	6,5; 6,5; 6,9
8.1	(grr × Superb) × NZ2010-10nb	W/γ (1)	0,2	–	–	–	+	+	–	+	+	–	6,5; 7,0; 6,0
8.2	(grr × Superb) × NZ2010-10nb	W/γ (1)	0	–	–	–	+	+	–	+	+	–	7,0; 7,0; 5,5
9	[(grr × Superb) × NZ2010-10nb] × ktz	W/γ (1)	1,0	–	+	+	–	–	+	–	–	–	нд; 6,5; 7,0
10	[(grr × Superb) × NZ2010-10nb] × {[nan × (mcd × tar) × × (grr × adg)] × SW-0906512}	W/γ (4)	0-0,7	–	–	+	+	+	+	+	+	–	нд; 7,0; 6,5
11.1	[(grr × Superb) × NZ2010-10nb] × cv. Campina	W/γ (1)	0	–	+	+	+	+	–	+	+	–	нд; 6,0; 5,0
11.2	[(grr × Superb) × NZ2010-10nb] × cv. Campina	W/γ (1)	0	–	+	+	–	–	–	+	+	+	нд; 7,0; 7,0
11.3	[(grr × Superb) × NZ2010-10nb] × cv. Campina	W/γ (1)	ОЦ	–	–	–	–	–	–	+	+	–	нд; 4,0; 1,0

Примечание. Выполнены три серии скрещиваний (группы в зависимости от использованных исходных материнских форм). Данные о маркерах *R* генов приведены для отдельных гибридных генотипов, отобранных из расщепляющихся популяций либо по устойчивости к патогенам и (или) морфологическим характеристикам клубней. ФП — фертильность пыльцы у проанализированных генотипов (min-max), ОЦ — отсутствие цветения у растений гибрида 11.3; «+» — маркер выявлен, «–» — маркер не выявлен, нд — нет данных (устойчивость не изучали). Аббревиатуры названий видов картофеля: grr — *Solanum guerreroense*, ktz — *S. kurtzianum,* mcd — *S. microdontum*, trj — *S. tarijense*, nan — *S. neoantipoviczii* (=*S. stoloniferum*), adg — *S. tuberosum* subsp. *andigenum*. Типы цитоплазмы указаны для всех проанализированных генотипов — от 1 до 6 на комбинацию.

Все гибриды II группы имели маркеры *R* генов экстремальной устойчивости к PVY, а многовидовой гибрид № 4 — маркеры трех таких генов: Ry_{adg}, Ry_{sto}, $Ry\text{-}f_{sto}$ (см. табл. 2). Среди многовидовых гибридов этой группы были отобраны генотипы с маркерами генов устойчивости к фитофторозу *R2 like*, *Rpi-blb1, Rpi-sto1.*

Гибриды, полученные в скрещиваниях с S. guerreroense. Вид *S. guerreroense* был вовлечен в селекционный процесс впервые. Растения двувидовых гибридов из комбинаций (grr × adg) и (grr × Superb), как правило, имели фиолетовую окраску венчика, характерную для *S. guerreroense*, но в отличие от него формировали клубни в условиях длинного светового дня. Растения гибрида (grr × Superb) имели длинные столоны и клубни неправильной формы. В потомстве гибрида (grr × Superb) × Desirée наблюдали большую изменчивость по форме клубней и окраске их кожуры. Растения простых гибридов образовывали большое число ягод при самоопылении. У

этих гибридов доля фертильной пыльцы достигала 24 %, а растения гибрида (grr × adg) успешно использовались в качестве эффективных опылителей при получении многовидовых гибридов, что указывает на функциональную фертильность их пыльцы (см. табл. 2). Все двувидовые гибриды трех комбинаций — (grr × adg), (grr × Superb), [(grr × Superb) × Desirée] имели W/α тип цитоплазмы. Однако у многовидовых гибридов из III группы (*S. guerreroense* — исходная материнская форма) был детектирован митотип γ, причем все многовидовые гибриды комбинаций №№ 8-11 оказались стерильными (см. табл. 2). Отсутствие амплификации в межгенном спейсере мтДНК *rps10–cob* (тип цитоплазмы W/γ) у этих многовидовых гибридов может быть связано с перестройками последовательностей мтДНК, происходящими при многократной гибридизации.

Гибридные клоны из III группы, полученные на основе *S. guerreroense*, в разных сочетаниях несли до 4 маркеров генов устойчивости к фитофторозу и от 1 до 3 маркеров генов устойчивости к PVY (см. табл. 2). Донорами гена Ry_{adg} у отобранных гибридных клонов могли быть сорт Superb или образец *S. tuberosum* subsp. *andigenum* к-8077; у многовидовых гибридов в комбинациях №№ 8-11 донорами генов Ry_{sto} и $Ry\text{-}f_{sto}$ служили либо *S. neoantipoviczii* (=*S. stoloniferum*) (комбинация № 10), либо устойчивый к PVY селекционный клон NZ2010-10nb, в происхождении которого участвовал *S. stoloniferum* (комбинации №№ 8, 9, 11) (см. табл. 2).

Ни в одной из изученных комбинаций не выявили генотипов с маркером R1-1250 гена *R1* (см. табл. 2).

У гибридов из II и III групп при наличии маркера Rpi-sto1 одновременно во всех случаях был детектирован маркер blb1 (ген *Rpi-blb1*) (см. табл. 2). Известно, что гены *Rpi-blb1* и *Rpi-sto1* — ортологи, относятся к одному семейству *Rpi-blb1*, локализованы на VIII хромосоме возле маркера CT88, а их последовательности обладают высокой степенью гомологии (34, 42, 43); сообщается также о функциональной гомологии этих генов (43). Внутригенные маркеры, разработанные для гена *Rpi-blb1* диплоидного мексиканского вида *S. bulbocastanum*, выявлены у образцов мексиканских полиплоидных видов *S. stoloniferum* и *S. papita* (=*S. stoloniferum*) (34), а также у гибридов, полученных с участием *S. stoloniferum* (12). Поэтому в нашей работе оба маркера (Rpi-sto1 и blb1), по всей видимости, детектируют у изученных гибридов последовательности одного и того же гена *Rpi-sto1*.

Оценка устойчивости гибридов к фитофторозу и PVY. Растения восприимчивых стандартных сортов Bintje и Desirée сильно поражались фитофторой уже через 2,5 нед после появления инфекции в поле в 2014-2015 годах, а в эпифитотийный сезон 2016 года растения тех же сортов в те же сроки были поражены полностью. В этот же период проходили изучение гибридные клоны, отобранные ранее из расщепляющихся популяций. В условиях эпидемического распространения *Ph. infestans* в 2016 году была подтверждена устойчивость ряда клонов, полученных в сериях скрещиваний с исходными образцами SW93-1015, *S. neoantipoviczii* к-8505 и *S. guerreroense* к-18407 (см. табл. 2). Высокую полевую устойчивость (7-8 баллов) имели двувидовые (простые) межвидовые гибриды в комбинациях №№ 1, 5, 6 (см. табл. 2). В проведенных ранее лабораторных тестах с заражением листьев гибриды комбинации (grr × adg) проявляли реакцию сверхчувствительности, как и родительский образец *S. guerreroense* (24). Из расщепляющихся популяций гибрида grr × adg были отобраны генотипы с крайне высокой устойчивостью в тесте заражения листьев тремя разными изолятами *Ph. infestans* — SW058 (26), 88069 (44) и H7 (45) при концентрации инокулюма, трижды превышающей стандартную (30). На ос-

новании всех полученных данных можно заключить, что образец *S. guerreroense* к-18407 — ценный источник устойчивости к фитофторозу, эффективно передающий этот признак гибридным потомствам. Высокой устойчивостью к фитофторозу также выделялись клоны многовидового гибрида [nan × (mcd × trj) × (grr × adg)] (см. табл. 2). При сильном распространении инфекции *Ph. infestans* в 2017 году устойчивость гибридных клонов, выделившихся в сезоне 2016 года, полностью подтвердилась (данные не приведены).

В результате последовательных скрещиваний гибридов с сортами и (или) селекционными клонами улучшались их агрономические характеристики, но одновременно несколько снижалась устойчивость к фитофторозу. Так, у ряда клонов из комбинаций №№ 7, 8, 9, 10, 11 она составила от 6,0 до 7,0 баллов, а у гибридов № 4 и № 11.1 — от 5,5 до 6,0 баллов (см. табл. 2). Клон № 11.3 был отобран по хорошим агрономическим характеристикам (клубни культурного типа), но его растения полностью поражались фитофторой в 2016 году; у этого генотипа мы не выявили ни одного маркера генов устойчивости к фитофторозу *R2 like*, *R3a, Rpi-blb1, Rpi-sto1* (см. табл. 2).

По результатам молекулярного скрининга в I-III группах комбинаций выделились генотипы, которые в разных сочетаниях несли маркеры генов широкого спектра устойчивости к фитофторозу (*R2 like*, *Rpi-blb1, Rpi-sto1*) и расоспецифичной устойчивости (*R3a*). Однако наличие этих маркеров не всегда обусловливало фенотипическую устойчивость гибридов. Например, гибрид № 11.1 имел все четыре маркера генов устойчивости к фитофторозу (см. табл. 2), но демонстрировал среднюю устойчивость к патогену. Вероятно, использованные в анализе маркеры детектировали у подобных генотипов нефункциональные гомологи *R* генов. В то же время высокая полевая устойчивость к фитофторозу (7-8 баллов) при отсутствии некоторых из маркеров может быть следствием интрогрессии еще не идентифицированных генов/QTL от *S. guerreroense* (комбинации № 5 и № 7, см. табл. 2) или функционирования у гибридов других *R* генов (например, гибрид № 6 мог получить доминантные аллели генов *R4*, *R8*, *Rpi-Smira1* от сорта Sarpo Mira) (46, 47).

Полевую устойчивость к PVY оценили у гибридов только в двух комбинациях — № 3 и № 5 и в их потомстве (по 10 сеянцев на комбинацию). В условиях высокого инфекционного фона растения многовидового гибрида [nan × (mcd × trj)] × (grr × adg)] не проявляли симптомов поражения PVY в течение всего периода изучения и, согласно данным ELISA, были свободны от вирусной инфекции (величина абсорбции в тесте — от 0 до 0,001). У этого гибрида были детектированы маркеры двух генов экстремальной устойчивости к PVY — Ry_{sto} и Ry_{adg} (см. табл. 2). Все изученные клоны в потомстве гибридов комбинации № 3 также характеризовались полевой устойчивостью к PVY в течение всего периода изучения. Растения восприимчивого сорта Magnum Bonum, росшие в тех же посадках, проявляли сильные симптомы болезни с величиной абсорбции в ELISA от 2,19 до 2,37. В комбинации № 5 (grr × adg) у гибридов был выявлен RYSC3 — маркер гена Ry_{adg}, определяющий экстремальную устойчивость к PVY. В потомстве этих гибридов около $^3/_4$ растений были свободны от вирусной инфекции.

Таким образом, как показали результаты проведенных исследований, из 35 изученных гибридных клонов 17 имели цитоплазму W/α типа, 18 — W/γ типа. Из 18 гибридных генотипов с типом цитоплазмы W/γ 17 формировали полностью стерильные пыльцевые зерна аномальной морфологии, а один генотип не цвел. Признак мужской стерильности и тип цитоплазмы W/γ передавались по материнской линии многовидовым ги-

бридам в разных комбинациях скрещиваний. У 17 гибридов с типом цитоплазмы W/α степень фертильности различалась, и некоторые из них использовались в качестве опылителей. Эта закономерность проявлялась как для материала, созданного на основе цитоплазмы *S. stoloniferum* (I и II группы), так и для гибридов III группы, полученных с участием *S. guerroense* (материнская форма); в последнем случае митотип γ мог возникнуть в процессе многовидовой гибридизации. Подобная взаимосвязь мужской стерильности и типа цитоплазмы W/γ у селекционных клонов и сортов, созданных с участием *S. stoloniferum*, продемонстрирована ранее (16, 17). Для *S. guerreroense* это явление было показано впервые. На основании полученных результатов и данных литературы можно полагать, что при поиске источников устойчивости к патогенам в популяциях *S. stoloniferum*, *S. guerreroense* (и, возможно, других мексиканских видов) целесообразно одновременно проводить отбор против доноров стерилизующего типа цитоплазмы W/γ, нежелательного для традиционного селекционного процесса. Напротив, отбор клонов с типом цитоплазмы W/α позволит увеличить вероятность получения интрогрессивных форм с мужской фертильностью. Не исключено, что в будущем вектор отбора изменится, поскольку фиксация в селекционном материале генотипов со стерилизующими типами цитоплазмы может оказаться перспективной для развития нового направления — гетерозисной гибридной селекции картофеля (48).

Итак, совместное использование двух систем ДНК-маркеров — ядерных, ассоциированных с *R* генами устойчивости, и цитоплазматических, детектирующих разные типы цитоплазмы, позволяет повысить результативность подбора пар для гибридизации, контролировать и заранее планировать направления скрещиваний, снижая затраты времени и средств при объединении в генотипе генов, детерминирующих один и тот же или разные хозяйственно ценные признаки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Юзепчук С.В., Букасов С.М. К вопросу о происхождении картофеля. Труды Всесоюзного съезда по генетике, селекции, семеноводству и племенному животноводству. Л., 1929, т. 3: 593-611.
2. Вавилов Н.И. Великие земледельческие культуры доколумбовой Америки и их взаимоотношения. Известия государственного географического общества, 1939, 10: 1487-1515.
3. Букасов С.М. Межвидовая гибридизация картофеля. Известия академии наук СССР, 1938, 13: 711-732.
4. Камераз А.Я. Дикие картофели как исходный материал для селекции. Вестник социалистического растениеводства. 1940, 4: 13-29.
5. Hermsen J.G.Th. Introgression of genes from wild species, including molecular and cellular approaches. In: Potato genetics /J.E. Bradshaw, G.R. Mackay (eds.). CABI, Wallingford, UK, 1994: 515-539.
6. Ortiz R. Potato breeding via ploidy manipulations. Plant Breeding Reviews, 1998, 16: 15-86 (doi: 10.1002/9780470650110.ch2).
7. Jansky S. Overcoming hybridization barriers in potato. Plant Breeding, 2006, 125: 1-12. (doi: 10.1111/j.1439-0523.2006.01178.x).
8. Watanabe K. Potato genetics, genomics, and applications. Breeding Science, 2015, 65(1): 53-68 (doi: 10.1270/jsbbs.65.53).
9. 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).
10. 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. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 112: 1458-1464 (doi: 10.1007/s00122-006-0248-8).
11. Tan M.Y.A., Hutten R.C.B., Visser R.G.F., van Eck H.J. The effect of pyramiding *Phytophthora infestans* resistance genes $R_{Pi\text{-}mcd1}$ and $R_{Pi\text{-}ber}$ in potato. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 121: 117-125 (doi: 10.1007/s00122-010-1295-8).
12. Фадина О.А., Бекетова М.П., Соколова Е.А., Кузнецова М.А., Смета-

нина Т.И., Рогозина Е.В., Хавкин Э.Е. Упреждающая селекция: использование молекулярных маркеров при создании доноров устойчивости картофеля (*Solanum tuberosum* L.) к фитофторозу на основе сложных межвидовых гибридов. Сельскохозяйственная биология, 2017, 52(1): 84-94 (doi: 10.15389/agrobiology.2017.1.84rus).
13. 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 Research, 2009, 52: 249-264 (doi: 10.1007/s11540-009-9136-3).
14. Ross H. Potato breeding — problems and perspectives. Advances in Plant Breeding (Supplements to Journal of Plant Breeding). V. 13. Paul Parey, Berlin-Hamburg, 1986.
15. Dionne L.A. Sterility in *Solanum demissum*. American Potato Journal, 1961, 38: 117-120 (doi: 10.1007/s11540-011-9196-z).
16. Song Y.S., Schwarzfischer A. Development of STS markers for selection of extreme resistance (Ry_{sto}) to PVY and maternal pedigree analysis of extremely resistant cultivars. American Journal of Potato Research, 2008, 85: 159-170 (doi: 10.1007/s12230-008-9012-8).
17. Hosaka K., Sanetomo R. Development of a rapid identification method for potato cytoplasm and its use for evaluating Japanese collections. Theoretical and Applied Genetics, 2012, 125: 1237-1251 (doi: 10.1007/s00122-012-1909-4)
18. Loessl A., Götz M., Brbaun 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).
19. 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).
20. Sanetomo R, Hosaka K. A maternally inherited DNA marker, descended from *Solanum demissum* ($2n$ = 6x = 72) to *S. tuberosum* ($2n$ = 4× = 48). Breeding Science, 2011, 61: 426-434 (doi: 10.1270/jsbbs.61.426).
21. Зотеева Н.М., Хжановска М., Евстратова Л.П., Фасулати С.Р., Юсупов Т.М. Устойчивость образцов диких видов картофеля к болезням и вредителям. Каталог мировой коллекции ВИР /Под ред. Л.И. Костиной. СПб, 2004.
22. Zoteyeva N., Chrzanowska M., Flis B., Zimnoch-Guzowska E. Resistance to pathogens of the potato accessions from the collection of N.I. Vavilov Institute of Plant Industry (VIR). American Journal of Potato Research, 2012, 89: 277-293 (doi: 10.1007/s12230-012-9252-5).
23. Zoteyeva N., Carlson-Nilsson U., Bengtsson T., Olsson K., Ortiz R. Late blight and virus host-plant resistances, crossing ability and glycoalkaloids in Nordic potato germplasm. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B, Soil and Plant Science, 2017, 67(7): 628-636 (doi: 10.1080/09064710.2017.1324042).
24. Zoteyeva N., Mezaka I., Vilcâne 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. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B, 2014, 68(3/4): 133-141 (doi: 10.2478/prolas-2014-0015).
25. Zoteyeva N.M. Expression of resistance to *Phytophthora infestans* in climatic chamber-, screenhouse- and field-grown wild potato species in a detached leaflet assay. Plant Breeding and Seed Science, 2004, 50: 129-135.
26. Ali A., Moushib L.I., Lenman M., Levander F., Olsson K., Carlson-Nilson U., Zoteyeva N., Liljeroth E., Andreasson E. Paranoid potato: phytophthora-resistant genotype shows constitutively activated defense. Plant Signaling & Behavior, 2012, 7(3): 1-9 (doi: 10.4161/psb.19149).
27. Lenman M., Ali A., Muhlenbock P., Carlson-Nilsson U., Liljeroth E., Champouret N., Vleeshouwers V.G., Andreasson E. Effector-driven marker development and cloning of resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato breeding clone SW93-1015. Theoretical and Applied Genetics, 2016, 129(1): 105-115 (doi: 10.1007/s00122-015-2613-y).
28. Zoteyeva N.M. Wild potato species from the VIR collection as source of resistance to late blight. In: Potato global research and development. V. 1 /S.M. Khurana, G.S. Shekhewat, B.P. Singh, S.K. Pandey (eds.). Indian Potato Association, Shimla, 2000: 556-560.
29. Zoteyeva N.M., Carlson-Nilsson U.B. Pre-breeding focused on late blight resistance utilizing a diverse potato germplasm. Proc. European Plant Genetic Resources Conference «Prebreeding — fishing in the gene pool» /R. Ortiz (ed.). NordGen, SLU, Alnarp, Sweden, 2013.
30. Зотеева Н.М. Фитофтороустойчивость образцов мексиканских диких видов картофеля и их гибридов к трем изолятам *Phytophthora infestans*. Вестник защиты растений, 2016, 3(89): 72-73.
31. 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. Genetic Resources and Crop Evolution, 2013, 60(7): 1997-2015 (doi: 10.1007/s10722-013-9968-1).
32. Valkonen J.T.P., Wiegmann K., Hämäläinen J.H., Marczewaski W., Watanabe K.N. Evidence for utility of the same PCR-base markers for selection of extreme

resistance to Potato virus Y controlled by *Rysto* of *Solanum stoloniferum* derived from different sources. Annals of Applied Biology, 2008, 152: 121-130 (doi: 10.1111/j.1744-7348.2007.00194.x).
33. Kasai K., Morikawa Y., Sorri V.A., Valkonen J.P.T., Gebhardt C., Watanabe K.N. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene Ry_{adg} based on a common feature of plant disease resistance genes. Genome, 2000, 43: 1-8 (doi: 10.1139/g99-092).
34. Wang M., Allefs S., van der Berg R., Vleeshouwers V.G.A.A., van der Vossen E.A.G., Vosman B. Allele mining in *Solanum*: conserved homologues of *Rpi-blb1* are identified in *Solanum stoloniferum*. Theoretical and Applied Genetics, 2008, 116: 933-943 (doi: 10.1007/s00122-008-0725-3).
35. Zhu S., Li Y., Vossen J., Visser R.F., Jacobsen E. Functional stacking of three resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato. Transgenic Research, 2012, 21: 89-99 (doi: 10.1007/s11248-011-9510-1).
36. Sokolova E., Pankin A., Beketova M., Kuznetsova M., Spiglazova S., Rogozina E., Yashina I., Khavkin E. SCAR markers of the *R*-genes and germplasm of wild *Solanum* species for breeding late blight-resistant potato cultivars. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization, 2011, 9(2): 309-312 (doi: 10.1017/S1479262111000347).
37. Huang S., van der Vossen E.A.G., Kuang H., Vleeshouwers V.G.A.A., Zhang N., Borm T.J.A., van Eck H.J., Baker B., Jacobsen E., Visser R.G.F. Comparative genomics enabled the isolation of the *R3a* late blight resistance gene in potato. The Plant Journal, 2005, 42: 251-261 (doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02365.x).
38. Schultz L., Cogan N.O.I., McLean K., Dale M.F.B., Bryan G.J., Forster J.N.W., Slater A.T. Evaluation and implementation of a potential diagnostic molecular marker for *H1*-conferred potato cyst nematode resistance in potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Breeding, 2012, 131: 315-321 (doi: 10.1111/j.1439-0523.2012.01949.x).
39. Johnston S.A., den Nijs T.P.M., Peloquin S.J., Hanneman R.E. Jr. The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. Theoretical and Applied Genetics, 1980, 57: 5-9 (doi: 10.1007/BF00276002).
40. Heldák J., Bežo M., Štefúnová V., Galliková A. Selection of DNA markers for detection of extreme resistance to Potato virus Y in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) F_1 progenies. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 2007, 43(4): 125-134.
41. Loessl A., Adler N., Horn R., Frei U., Wenzel G. Chondriome-type characterization of potato: mt alpha, beta, gamma, delta, epsilon and novel plastid-mitochondrial configurations in somatic hybrids. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 99: 1-10.
42. van der Vossen E., Sikkema A., Hekkert B.L., Gros J., Stevens P., Muskens M., Wouters D., Pereira A., Stiekema W., Allefs S. An ancient *R* gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. Plant Journal, 2003, 36: 867-882 (doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01934.x).
43. Vleeshouwers V.G.A.A., Rietman H., Krenek P., Champouret N., Young C., Oh S.K., Wang M., Bouwmeester K., Vosman B., Visser R.G.F., Jacobsen E., Govers F., Kamoun S., van der Vossen E.A.G. Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes. PLoS ONE, 2008, 3(8): e2875 (doi: 10.1371/journal.pone.0002875).
44. Alpizar L.G., Carbone I., Ristaino J.B. An Andean origin of *Phytophthora infestans* inferred from mitochondrial and nuclear gene genealogies. PNAS, 2007, 104(9): 3306-3311 (doi: 10.1073/pnas.0611479104).
45. Esman A.K.M., Vetukuri R.R., Jahan S.N., Fogelqvist J., Orcoran P., Avrova A.O., Whisson S.C., Dixelius C. Fragmentation of tRNA in *Phytophthora infestans* asexual life cycle stages and during host plant infection. BMC Microbiology, 2014, 14: 308 (doi: 10.1186/s12866-014-0308-1).
46. 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. MPMI, 2012, 25(7): 910-919 (doi: 10.1094/MPMI -01-12-0010-R).
47. Vossen J.H., van Arkel G., Bergervoet M., Jo K.R., Jacobsen E., Visser R.G.F. The *Solanum demissum* R8 late blight resistance gene is a *Sw-5* homologue that has been deployed worldwide in late blight resistant varieties. Theoretical and Applied Genetics, 2016, 129(9): 1785-1796 (doi: 10.1007/s00122-016-2740-0).
48. 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).

[1]ФГБНУ ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова,
190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42-44,

Поступила в редакцию 27 июня 2017 года

e-mail: tatjana9972@yandex.ru;
[2]*The Nordic Genetic Resource Centre (NordGen),*
P.O. Box 41, SE-230 53 Alnarp, Sweden;
[3]*Swedish University of Agricultural Sciences (SLU),*
P.O. Box 7070, SE-750 07 Uppsala, Sweden;
[4]*ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Биологический факультет,*
199034 Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [*Agricultural Biology*], 2017, V. 52, № 5, pp. 964-975

FACILITATION OF INTROGRESSIVE HYBRIDIZATION OF WILD POLYPLOID MEXICAN POTATO SPECIES USING DNA MARKERS OF *R* GENES AND OF DIFFERENT CYTOPLASMIC TYPES

N.M. Zoteyeva[1], O.Yu. Antonova[1], N.S. Klimenko[1], O.V. Apalikova[1], U. Carlson-Nilsson[2, 3], Yu.I. Karabitsina[1], Yu.V. Ukhatova[1], T.A. Gavrilenko[1, 4]

[1]*Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources,* Federal Agency of Scientific Organizations, 42-44, ul. Bol'shaya Morskaya, St. Petersburg, 190000 Russia, e-mail tatjana9972@yandex.ru (corresponding author);
[2]*The Nordic Genetic Resource Centre (NordGen),* P.O. Box 41, SE-230 53 Alnarp, Sweden;
[3]*Swedish University of Agricultural Sciences (SLU),* P.O. Box 7070, SE-750 07 Uppsala, Sweden;
[4]*Saint-Petersburg State University, Biological Department,* 7/9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034 Russia
ORCID:
Zoteyeva N.M. orcid.org/0000-0003-2266-0467
Antonova O.Yu. orcid.org/0000-0001-8334-8069
Klimenko N.S. orcid.org/0000-0002-6213-4421
Apalikova O.V. orcid.org/0000-0002-1188-2446
Carlson-Nilsson U. orcid.org/0000-0002-6467-2215
Karabitsina Yu.I. orcid.org/0000-0002-8384-5134
Ukhatova Yu.V. orcid.org/0000-0001-9366-0216
Gavrilenko T.A. orcid.org/0000-0002-2605-6569
The authors declare no conflict of interests
Acknowledgements:
Studies of plant resistance to late blight in the epiphytotic 2016, pollen fertility and molecular screening in 2016-2017 (VIR, St. Petersburg, Russia) were supported by Russian Science Foundation (grant № 16-16-04125). Hybridization and assessment of plant resistance to late blight and Potato virus Y were carried out in 2012-2015 (Swedish University of Agricultural Sciences — SLU, Sweden) with the financial support from the E. & I. Nilssons Foundation
Received June 27, 2017 doi: 10.15389/agrobiology.2017.5.964eng

Abstract

Nowadays potato breeding is targeting to develop genetically divers high yielding varieties with multiple pathogen resistance traits. Interspecific hybridization jointed with marker-assistant-selection (MAS) can effectively combine the *R* genes from different resistance sources. Additionally to effective pyramiding the target genes, MAS allows to restrict introgression of genetic factors conferring the undesirable traits, for example, male sterility of interspecific hybrids associated with *Solanum stoloniferum*-derived W/gamma cytoplasm that complicate the traditional breeding. Current study is targeting to search for the opportunities to improve the efficiency of introgressive hybridization between common potato and Mexican polyploid species *Solanum. neoantipoviczii* (=*S. stoloniferum*) and *S. guerreroense* using MAS with DNA markers for different cytoplasmic types and markers associated with major *R*-genes to the most harmful potato pathogens. DNA-based markers of genes for late blight resistance (*R2 like*, *R3a*, *Rpi-blb1*, *Rpi-sto1*), for extreme resistance to Potato virus Y (PVY) (*Ryadg*, *Rysto*, *Ry-fsto*) and for *H1* gene for resistance to the root cyst nematode (*Globodera rostochiensis*, pathotype Ro1) were used in this study. Based on the MAS, hybrid genotypes with different combinations of these markers were selected. Among them, there were the clones with high field resistance to late blight and to PVY. Of 29 hybrid clones from different combinations of crossing with polyploid Mexican species used as the maternal forms, 15 had a W/γ cytoplasmic type and were male sterile; both these traits were maternally inherited. The remaining hybrids with W/α cytoplasm produced fertile pollen and were used in interspecific crosses as pollinators. Selection of resistant clones with W/alpha cytoplasm and elimination of genotypes with sterile W/γ cytoplasm among wild species germplasm could increase the probability of obtaining male fertile introgressive lines. This approach allows to obtain the multi-species hybrid genotypes that combine *R* genes for resistance to pathogens from different Mexican species and to avoid various types of male sterility in breeding. The joint use of two systems of DNA markers, i.e. nuclear markers associated to *R* genes, and cytoplasmic markers for male sterility factors, could reduce costs and increase efficiency of target gene pyramiding programs.

Keywords: *Solanum* spp., potato, DNA markers, *R* genes, cytoplasmic types, interspecific hybridization.