

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Генотипирование образцов картофеля коллекции «ГенАгро» ИЦиГ СО РАН с применением ДНК-маркеров генов устойчивости к фитопатогенам

И.В. Тоцкий^{1, 2}✉, И.В. Розанова^{1, 3}, А.Д. Сафонова², А.С. Батов², Ю.А. Гуреева², Е.К. Хлесткина^{1, 3}, А.В. Кочетов¹

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции – филиал Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, пос. Краснообск, Новосибирская область, Россия

³ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия
✉ totsky@bionet.nsc.ru

Аннотация. Значительный ущерб урожаю картофеля наносят рак картофеля (болезнь, вызываемая патогенным грибом *Synchytrium endobioticum*) и золотистая картофельная нематода (*Globodera rostochiensis*), паразитирующая на корнях растения-хозяина. Оба этих фактора являются объектами внешнего и внутреннего карантина в Российской Федерации, и каждый сорт, регистрируемый в РФ, проходит проверку на устойчивость к наиболее распространенным их расам и патотипам. Основным методом борьбы с подобными заболеваниями – выведение устойчивых сортов. Важным этапом в этом процессе является отбор устойчивых генотипов из популяции и оценка устойчивости гибридов, полученных при скрещиваниях во время селекционного процесса. Проведение постоянной фенотипической оценки связано с рядом трудностей, а именно: не всегда есть возможность работать с патогенами, сама фенотипическая оценка очень затратная и трудоемкая. Однако применение ДНК-маркеров, сцепленных с генами устойчивости, может значительно ускорить и удешевить процесс. Целью исследования было проведение скрининга коллекции картофеля «ГенАгро» (ИЦиГ СО РАН) с использованием ПЦР-маркеров, разработанных для диагностики устойчивости к золотистой картофельной нематоде и раку картофеля. Семьдесят три образца из коллекции «ГенАгро» ИЦиГ СО РАН были генотипированы ДНК-маркерами 57R, CP113, Gro1-4, сцепленными с устойчивостью к нематоде, и маркером NL25 для устойчивости к раку. Результаты генотипирования сопоставлены с уровнем восприимчивости образцов к болезням. Высокий уровень корреляции (коэффициент корреляции Спирмена Spearman $R = 0.722008$, $p = 0.000000$, $p < 0.05$) между устойчивостью и наличием диагностического фрагмента был показан только для маркера 57R. Диагностическая эффективность маркера 57R составила 86.11 %. Данный маркер можно успешно использовать для поиска устойчивых генотипов и проведения маркер-ориентированной селекции. Для остальных маркеров достоверных корреляций не выявлено. Диагностическая эффективность применения маркера CP113 равнялась всего 44.44 %, а коэффициент корреляции Спирмена (Spearman $R = -0.109218$, $p = 0.361104$, $p < 0.05$) показывал отсутствие значимой корреляции между устойчивостью и ДНК-маркером. Диагностическая эффективность маркера NL25 составила 61.11 %. Значимой корреляции между маркером NL25 и устойчивостью не обнаружено (Spearman $R = -0.017946$, $p = 0.881061$, $p < 0.05$). Использование этих маркеров для поиска устойчивых образцов нецелесообразно. Ключевые слова: золотистая картофельная нематода; рак картофеля; картофель; ДНК-маркеры 57R; NL25; CP113; Gro1-4.

Для цитирования: Тоцкий И.В., Розанова И.В., Сафонова А.Д., Батов А.С., Гуреева Ю.А., Хлесткина Е.К., Кочетов А.В. Генотипирование образцов картофеля коллекции «ГенАгро» ИЦиГ СО РАН с применением ДНК-маркеров генов устойчивости к фитопатогенам. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(6):677-686. DOI 10.18699/VJ21.077

Genotyping of potato samples from the GenAgro ICG SB RAS collection using DNA markers of genes conferring resistance to phytopathogens

I.V. Totsky^{1, 2}✉, I.V. Rozanova^{1, 3}, A.D. Safonova², A.S. Batov², Yu.A. Gureeva², E.K. Khlestkina^{1, 3}, A.V. Kochetov¹

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Siberian Research Institute of Plant Production and Breeding – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

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

Abstract. Wart (a disease caused by *Synchytrium endobioticum*) and golden cyst potato nematode (*Globodera rostochiensis*), which parasitize the roots of the host plant, cause significant damage to potato crop. Both of these disease factors are quarantined in the Russian Federation, and each registered variety is tested for resistance to their most common races and pathotypes. The main method of opposing such diseases is by the development of resistant varie-

ties. An important step in this process is the selection of resistant genotypes from the population and the estimation of the resistance of hybrids obtained by crosses during the breeding process. Conducting a permanent phenotypic evaluation is associated with difficulties, for example, it is not always possible to work with pathogens, and phenotypic evaluation is very costly and time consuming. However, the use of DNA markers linked to resistance genes can significantly speed up and reduce the cost of the breeding process. The aim of the study was to screen the GenAgro potato collection of ICG SB RAS using known diagnostic PCR markers linked to golden potato cyst nematode and wart resistance. Genotyping was carried out on 73 potato samples using three DNA markers 57R, CP113, Gro1-4 associated with nematode resistance and one marker, NL25, associated with wart resistance. The genotyping data were compared with the data on the resistance of the collection samples. Only the 57R marker had a high level of correlation (Spearman $R = 0.722008$, $p = 0.000000$, $p < 0.05$) between resistance and the presence of a diagnostic fragment. The diagnostic efficiency of the 57R marker was 86.11 %. This marker can be successfully used for screening a collection, searching for resistant genotypes and marker-assisted selection. The other markers showed a low correlation between the presence of the DNA marker and resistance. The diagnostic efficiency of the CP113 marker was only 44.44 %. Spearman's correlation coefficient (Spearman $R = -0.109218$, $p = 0.361104$, $p < 0.05$) did not show significant correlation between resistance and the DNA marker. The diagnostic efficiency of the NL25 marker was 61.11 %. No significant correlation was found between the NL25 marker and resistance (Spearman $R = -0.017946$, $p = 0.881061$, $p < 0.05$). The use of these markers for the search for resistant samples is not advisable.

Key words: golden potato cyst nematode; wart; potato; DNA markers 57R; NL25; CP113; Gro1-4.

For citation: Totksy I.V., Rozanova I.V., Safonova A.D., Batov A.S., Gureeva Yu.A., Khlestkina E.K., Kochetov A.V. Genotyping of potato samples from the GenAgro ICG SB RAS collection using DNA markers of genes conferring resistance to phytopathogens. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(6):677-686. DOI 10.18699/VJ21.077

Введение

Картофель – одна из наиболее важных сельскохозяйственных культур, занимающая пятое место в мире по объему продукции среди основных продовольственных культур (FAO Statistical Pocketbook, 2019). Одной из причин, которые могут привести к снижению урожая, является поражение картофеля различными факторами. Особенно опасны золотистая картофельная цистообразующая нематода (*Globodera rostochiensis*) и рак картофеля (возбудитель – *Synchytrium endobioticum*). Они относятся к карантинным объектам в Российской Федерации. Данные об устойчивости к *G. rostochiensis* и *S. endobioticum* обязательны при регистрации сорта картофеля в «Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию» (Государственный реестр..., 2019; <https://gossortrf.ru/>).

Золотистая картофельная нематода (ЗКН) может нанести значительный ущерб урожаю картофеля (до 80–90 %) (Клименко и др., 2017; Хютти и др., 2017). В настоящее время в мире известно пять патотипов данного вредителя: Ro1, Ro2, Ro3, Ro4, Ro5 (Kort et al., 1977; Хютти и др., 2017), при этом на территории России на данный момент обнаружен только патотип Ro1 ЗКН (Limantseva et al., 2014).

Рак картофеля поражает от 35 (Корецкий, 1970) до 100 % (Hampson, 1993) урожая. В Европе сегодня насчитывается 43 патотипа возбудителя рака (Ваауен et al., 2006). В «Государственном реестре селекционных достижений...» зарегистрировано всего несколько сортов, поражаемых этой болезнью (Государственный реестр..., 2019; <https://gossortrf.ru/>).

Один из основных методов борьбы с данными вредителями – выведение устойчивых сортов картофеля. Соответственно, важно обнаружить гены, отвечающие за устойчивость к ЗКН, изучить их наследуемость, создать ДНК-маркеры, сцепленные с этими генами, и использовать гены в схемах маркер-ориентированной селекции.

У картофеля обнаружено семь локусов устойчивости к ЗКН на хромосомах III (*Gro1.4*-QTL (Kreike et al., 1996)), V (*Grp1*-QTL (Roupe van der Voort et al., 1998), *H1* (Gebhardt et al., 1993), *GroVI* (Pineda et al., 1993)), VII (*Gro1* (Barone et al., 1990; Leister et al., 1996)), X (*Gro1.2*-QTL (Kreike et al., 1993)) и XI (*Gro1.3*-QTL (Kreike et al., 1993)). Четыре локуса (*Gro1.4*, *Grp1*, *Gro1.2*, *Gro1.3*) обеспечивают частичное сопротивление, а три других (*H1*, *GroVI*, *Gro1*) – придают высокую устойчивость к одному или более патотипам (Gebhardt, Valkonen, 2001; Bakker et al., 2004; Ramakrishnan et al., 2015). ДНК-маркеры позволили идентифицировать сложные локусы, содержащие несколько *R*-генов, в том числе локус с двумя генами устойчивости к ЗКН (*H1*, *GroVI*), который у двух разных видов картофеля идентифицирован на хромосоме V (Gebhardt, Valkonen, 2001).

Ген устойчивости *H1* интрогрессирован в селекционные сорта из *Solanum tuberosum* ssp. *andigenum* и *S. vernei* (Тохорейс, Huijsman, 1953). Это доминантный ген, определяющий устойчивость к патотипам Ro1 и Ro4 *G. rostochiensis* (Jones et al., 1981; Gebhardt, Valkonen, 2001; Bakker et al., 2004). По другим данным, он определяет устойчивость к патотипам Ro5 и Ro6 (Pajerowska-Mukhtar et al., 2009; Milczarek et al., 2011; Lopez-Pardo et al., 2013; Ramakrishnan et al., 2015). Данный ген локализован на дистальном конце длинного плеча хромосомы V (Gebhardt et al., 1993; Pineda et al., 1993) и кодирует белок CC-NBS-LRR (coiled coil/nucleotide-binding/leucine-rich repeat). *H1* – единственный ген устойчивости к нематоде, для которого с помощью классического генетического анализа была подтверждена концепция Флора взаимодействия «ген-на-ген» (Flor, 1971; Janssen et al., 1991; Gebhardt, Valkonen, 2001). Гену устойчивости *H1* соответствовал ген *Avr* золотистой картофельной цистообразующей нематоды *G. rostochiensis*.

Ген *GroVI* происходит от дикого вида картофеля *S. vernei*, сцеплен с локусом *H1* (Jacobs et al., 1996) и отвечает

за устойчивость к патотипу Ro1 *G. rostochiensis* (Jacobs et al., 1996; Milczarek et al., 2011; Ramakrishnan et al., 2015).

Локус *Gro1* локализован на хромосоме VII и содержит целое семейство генов: *Gro1-1*, *Gro1-2*, *Gro1-3*, *Gro1-4*, *Gro1-5*, *Gro1-6*, *Gro1-8*, *Gro1-10*, *Gro1-11*, *Gro1-12* и *Gro1-14*, а также ряд псевдогенов (Barone et al., 1990; Leister et al., 1996; Paal et al., 2004). J. Paal с коллегами показали, что ген *Gro1-4* является моногенным доминантным геном, отвечающим за устойчивость к патотипу Ro1 *G. rostochiensis*, и кодирует белок, относящийся к классу TIR-NB-LRR белков. *Gro1-4* привнесен в *S. tuberosum* из дикого вида картофеля *S. spegazzinii* (Ballvora et al., 1995; Gebhardt, Valkonen, 2001; Gebhardt et al., 2004; Paal et al., 2004; Kuhl, 2011; Milczarek et al., 2011; Ramakrishnan et al., 2015).

Ряд локусов количественных признаков, ассоциированных с устойчивостью к цистообразующим нематодам, был картирован в геноме картофеля: *Gro1.2*, *Gro1.3* и *Gro1.4*, детерминирующие устойчивость к *G. rostochiensis*, были локализованы на хромосомах X, XI и III. Источником устойчивости в данном случае выступал *S. spegazzinii* (Kreike et al., 1993, 1996).

Обнаружен локус *Grp1*, обеспечивающий широкий спектр устойчивости к обоим видам цистообразующих нематод – *G. rostochiensis* и *G. pallida*. Он был картирован на хромосоме V (Roupe van der Voort et al., 1998, 2000) и обеспечивает устойчивость к патотипу Ro5 *G. rostochiensis* (Finkers-Tomczak et al., 2009; Milczarek et al., 2011; Ramakrishnan et al., 2015).

Значительное число диагностических ДНК-маркеров было создано для гена *H1*. Среди них маркеры CD78 (Pineda et al., 1993), TG689 (Milczarek et al., 2011; Lopez-Pardo et al., 2013), N146, N195 (Mori et al., 2011; Asano et al., 2012), CP113 (Gebhardt et al., 1993; Niewöhner et al., 1995; Skupinová et al., 2002; Milczarek et al., 2011), TG689/TG689indel12 (Galek et al., 2011), 239E4left (Bakker et al., 2004; Pajerowska-Mukhtar et al., 2009; Milczarek et al., 2011), EM15 (repulsion) и CMI (coupling) (Bakker et al., 2004), 57R (Finkers-Tomczak et al., 2011; Schultz et al., 2012; Milczarek et al., 2014). Для других генов и QTL также подобраны маркеры. Например, для гена *GroV1* разработаны маркеры TG69 (Pineda et al., 1993), SCAR-U14 и SCAR-X02 (Jacobs et al., 1996; Milczarek et al., 2011); для локуса *Gro1* подобраны маркеры CP56 и St3.3.2 (Barone et al., 1990; Leister et al., 1996), CP56, CP51(c), GP516(c) (Ballvora et al., 1995; Kuhl, 2011). Для гена *Gro1-4* созданы маркеры Gro1-4 (Gebhardt et al., 2004; Paal et al., 2004; Milczarek et al., 2011), Gro1-4-1 (Asano et al., 2012). Для *Grp1*-QTL разработаны маркеры GP21 и GP179 (Roupe van der Voort et al., 1998), TG432 (Finkers-Tomczak et al., 2009; Milczarek et al., 2011). Для *Gro1.2*-QTL подобран маркер TG63 (Kreike et al., 1993). Для *Gro1.3*-QTL созданы маркеры Ssp75 и TG30 (Kreike et al., 1993), а для *Gro1.4*-QTL-маркер Ssp8 (Kreike et al., 1996).

У картофеля обнаружен ряд генов устойчивости к раку (*S. endobioticum*), а именно: *Sen1*, расположенный на хромосоме XI (Hehl et al., 1999); ген *Sen1-4*, картированный на хромосоме IV (Brugmans et al., 2006); локус *Sen18-IX*, локализованный на хромосоме IX; локус *Sen2/6/18-I*,

находящийся на хромосоме I (Ballvora et al., 2011); локус *Xla-TNL* на хромосоме XI (Bartkiewicz et al., 2018); локус *Sen2*, который был картирован на хромосоме XI (Plich et al., 2018). Локус *Sen3* был картирован на хромосоме XI в том же регионе, что и ген *Sen1* (Prodhomme et al., 2019); авторы высказали мнение, что *Sen3* может быть как паралогом *Sen1* из того же кластера, так и аллельным вариантом гена *Sen1*.

QTL, отвечающие за устойчивость к расам 1, 2, 6 и 18 рака, найдены на других хромосомах: хромосома I (к расе 2), хромосома II (расы 6, 18), хромосома VI (расы 1, 2, 6, 18), хромосома VII (расы 2, 6, 18), хромосома VIII (расы 1, 2, 6, 18), хромосома X (расы 2, 6, 18), хромосома XI (расы 2, 6, 18) (Groth et al., 2013). J.E. Obidiegwu с коллегами обнаружили также на хромосомах I, IV, X, XI и XII дополнительные локусы устойчивости к раку, которые имели меньшее влияние, чем основные гены (Obidiegwu et al., 2015). На устойчивость к расе 18 рака дополнительно влияют второстепенные QTL, расположенные на хромосоме X (Bartkiewicz et al., 2018).

Гены *Sen1* и *Sen1-4* определяют устойчивость к расе 1 возбудителя рака картофеля, в обоих случаях устойчивость детерминирована доминантными аллелями генов. Ген *Sen1* локализован на дистальном конце длинного плеча хромосомы XI (Hehl et al., 1999; Obidiegwu et al., 2014). Однако следует отметить, что J.E. Obidiegwu с коллегами с использованием метода полногеномного анализа ассоциаций (genome-wide association studies – GWAS) идентифицировали мультиаллельный локус *Sen1/RSe-XIa* на хромосоме XI картофеля как главный фактор устойчивости к четырем расам *S. endobioticum* (расы 1, 2, 6 и 18) (Obidiegwu et al., 2015). Ген *Sen1-4* находится на длинном плече хромосомы IV на расстоянии 5 см от центромеры (Brugmans et al., 2006).

Локус *Xla-TNL* на хромосоме XI картофеля сцеплен с устойчивостью к расам 18 и 6 и может рассматриваться как один из главных факторов ракоустойчивости (Bartkiewicz et al., 2018).

Локус *Sen2* картирован на хромосоме XI и представляет собой доминантный моногенный локус, который обеспечивает высокий уровень устойчивости одновременно к восьми расам *S. endobioticum*: 1 (D1), 2 (G1), 6 (O1), 8 (F1), 18 (T1), 2 (Ch1), 3 (M1) и 39 (P1). Генетические и физические расстояния между локусами *Sen1* и *Sen2* были косвенно оценены в 63 см и 32 Мbp соответственно (Plich et al., 2018).

Sen3 описывается как доминантный моногенный локус устойчивости к расам 2, 6 и 18 (Prodhomme et al., 2019). Локус *Sen18-IX* (хромосома IX) определяет устойчивость к расе 18 *S. endobioticum*, а локус *Sen2/6/18-I* (хромосома I) – к расам 2, 6 и 18. A. Ballvora с коллегами (2011) отмечают, что устойчивости к расам 2, 6 и 18 коррелируют друг с другом, но наследуются независимо от устойчивости к расе 1.

Для обнаружения доминантного аллеля гена *Sen1* были разработаны несколько маркеров: CP58, GP125 (Hehl et al., 1999), NL25 (Hehl et al., 1999; Bormann et al., 2004; Gebhardt et al., 2006), Sti046, St_At5g16710, GP125 и GP259 (Ballvora et al., 2011). Также с помощью полногеномного

поиска ассоциаций был идентифицирован гаплотип-специфичный маркер PotVar0067008, связанный с *Sen1* (Prodhomme et al., 2020).

Для выявления локуса *Sen18-IX* можно использовать маркеры GP129, GP101 и STM3023b. Диагностику локуса *Sen2/6/18-I* можно проводить с помощью маркеров STM2030, SC176, GP192, GP124 и GP194 (Ballvora et al., 2011). Маркеры Kc8103 и RK36, расположенные на хромосоме XI и сцепленные с локусом *Xla-TNL*, показали потенциальную диагностическую ценность при определении устойчивости к расам 18 и 6 *S. endobioticum* (Bartkiewicz et al., 2018). Созданы три маркера 5450_3, 2502_1 и 2502_3, сцепленные с локусом *Sen2* (Plich et al., 2018). Для обнаружения *Sen3* возможно применять маркеры chr11_1259552 и chr11_1772869 (Prodhomme et al., 2019).

Целью исследования было проведение скрининга коллекции картофеля «ГенАгро» Института цитологии и генетики (ИЦиГ) СО РАН с использованием известных диагностических ПЦР-маркеров, сцепленных с устойчивостью к золотистой картофельной нематоде и раку картофеля.

Материалы и методы

Растительный материал. Материалом исследований послужили 73 сорта и гибрида картофеля (*Solanum tuberosum*) из коллекции «ГенАгро» ИЦиГ СО РАН (Приложение 1)¹. Растения выращивали в полевых условиях на территории пос. Мичуринский Новосибирской области с мая по август 2017 г.

Полевые испытания проводили по следующей схеме: количество рядков для каждого генотипа – 2; количество растений в рядке – 10 шт.; длина рядка – 3 м; расстояние между рядами – 0.75 м; расстояние между растениями в рядах – 0.30 м; способ посадки – вручную по бороздам, заделка борозд бородами; срок посадки – третья декада мая.

Агрохимическая характеристика почвы: содержание обменного калия 110.00 мг/кг; сумма обменных оснований 24.19 мг-экв/100 г; гидролитическая кислотность 3.23 мг-экв/100 г; обменная кислотность 5.60 мг-экв/100 г; содержание гумуса 2.67 %; содержание подвижного фосфора 5.14 мг/кг; степень насыщенности основаниями (V) 88.20 %.

Большая часть сведений по устойчивости к ЗКН и раку картофеля была взята из литературных источников, а именно из базы данных «Государственного реестра селекционных достижений, допущенных к использованию» (Государственный реестр..., 2019; <https://gossortrf.ru/>) и из Европейской базы данных культурного картофеля (<https://www.europotato.org/>). Образцы и гибриды, для которых отсутствовали опубликованные данные по устойчивости, были оценены в экспериментальных условиях. Определение устойчивости к ЗКН проводили в соответствии с методикой, рекомендованной ОЕПП/ЕРРО (2006), во Всероссийском НИИ защиты растений (ВИЗР). Устойчивость к раку картофеля оценивали по методу Глинна–Леммерцала, согласно Диагностическому протоколу ЕРРО для *S. endobioticum* (ОЕПП/ЕРРО, 2004), в Федеральном исследовательском центре картофеля им. А.Г. Лорха (ФИЦ картофеля им. А.Г. Лорха).

¹ Приложения 1–4 см. по адресу:
<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2021-25/appx11.pdf>

Выделение ДНК и проведение ПЦР-анализа. ДНК выделяли из кожуры клубней картофеля с использованием набора DNeasy Plant Mini (Qiagen, США) согласно протоколу. Концентрацию и чистоту тестируемых образцов определяли с помощью двух методов: гель-электрофореза и с применением аппарата Nanodrop 2000.

Для генотипирования выбрали несколько диагностических маркеров (табл. 1), наиболее часто применяемых в селекционных программах. Эти маркеры были ассоциированы с *R*-генами, обеспечивающими устойчивость к расе 1 рака картофеля (*S. endobioticum*) и к патотипу Ro1 золотистой картофельной цистообразующей нематоды (*G. rostochiensis*).

Для выявления генов устойчивости к ЗКН были выбраны маркеры 57R и CP113, ассоциированные с геном устойчивости *H1*, и маркер Gro1-4, ассоциированный с геном устойчивости *Gro1-4* (см. табл. 1). SCAR ПЦР-маркер CP113-5'2/CP113-3'2, созданный на основе RFLP-маркера CP113, описан в работе (Niewöhner et al., 1995). При амплификации ДНК резистентных генотипов с использованием этого маркера образуется продукт длиной 760 п. н. Маркер 57R предложен L. Schultz с коллегами (Schultz et al., 2012). При амплификации ДНК резистентных генотипов образуется продукт длиной 450 п. н. SCAR ПЦР-маркер Gro1-4 разработан на основе RFLP-маркера Gro1 (Paal et al., 2004). При амплификации ДНК резистентных генотипов образуется продукт длиной 602 п. н.

Маркер NL25, предложенный при картировании гена *Sen1* (Hehl et al., 1999), использовался для маркер-ориентированной селекции (Bormann et al., 2004; Gebhardt et al., 2006) (см. табл. 1). При амплификации образуются один или два фрагмента длиной 1200 или 1400 п. н. Наличие доминантного аллеля *Sen1* определяется присутствием фрагмента размером 1400 п. н.

ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 100 нг ДНК, 67 мМ трис-НСl (рН 8.8), 1.8 мМ MgCl₂, 0.01 % Tween 20, по 0.2 мМ каждого дНТФ, по 0.25 мкМ прямого и обратного специфических праймеров, 1 ед. ДНК-полимеразы Taq.

Температурно-временной профиль ПЦР был представлен двумя типами программ для амплификации: SSR55 и SSR60. SSR55: первый цикл: 94 °С – 2 мин; последующие 45 циклов: 94 °С – 1 мин, 55 °С – 1 мин, 72 °С – 2 мин; затем один цикл 5 мин при 72 °С (Gro1-4). SSR60: первый цикл: 94 °С – 2 мин; последующие 45 циклов: 94 °С – 1 мин, 60 °С – 1 мин, 72 °С – 2 мин; далее один цикл 5 мин при 72 °С (NL25, CP113, 57R).

Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 2%-м агарозном геле. Результаты документировали с помощью Molecular Imager Gel Doc XR System (BioRad) с использованием УФ-излучения.

Статистическую обработку данных проводили с применением коэффициента корреляции Спирмена, для расчетов использовали программу STATISTICA. Диагностическую эффективность, чувствительность и прогностическую ценность рассчитывали с помощью программы MedCalc (<https://www.medcalc.org/>). Диагностическую эффективность определяли как долю правильных результатов тестирования в общем количестве результатов (или же как сумму истинноположительных и истинноотрица-

Таблица 1. ДНК-маркеры, используемые для проведения скрининга коллекции

Ген	Признак	Название маркера и праймера	Последовательность нуклеотидов от 5' к 3' концу	Локализация гена	Размер диагностического фрагмента, п. н.	Литературный источник
<i>H1</i>	Устойчивость к золотистой картофельной нематоды (<i>G. rostochiensis</i>)	CP113F	GCGTTACAGTCGCCGTAT	Хромосома V	760	Niewöhner et al., 1995
		CP113R	GTTGAAGAAATATGGAATCAAA			
		57R-F	TGCCTGCCTCTCCGATTCT		450	Schultz et al., 2012
		57R-R	GGTTCAGCAAAGCAAGGACGTG			
<i>Gro1-4</i>		Gro1-4F	TCTTTGGAGATACTGATTCTCA	Хромосома VII	602	Paal et al., 2004
		Gro1-4R	CGACCTAAAATGAAAAGCATCT			
<i>Sen1</i>	Устойчивость к раку картофеля (возбудитель – <i>S. endobioticum</i>)	NL25F	TATTGTTAATCGTTACTCCCTC	Хромосома XI	1400	Hehl et al., 1999; Bormann et al., 2004; Gebhardt et al., 2006
		NL25R	AGAGTCGTTTACCGACTCC			

тельных результатов теста, деленную на общее количество результатов). Чувствительность рассчитывали как число устойчивых образцов, выявленных с помощью ДНК-маркера, деленное на общее число устойчивых образцов; специфичность – как число восприимчивых образцов, выявленных с помощью ДНК-маркера, деленное на общее число восприимчивых образцов. Прогностическую ценность положительного результата определяли как долю правильных положительных результатов диагностического теста.

Результаты

Среди 73 образцов, отобранных для генотипирования, 35 образцов были устойчивы к золотистой картофельной цистообразующей нематоды (ЗКН), 37 – восприимчивы, у одного образца устойчивость к нематоды была неизвестна (табл. 2). Устойчивыми к раку оказались 69 образцов, восприимчивыми к заболеванию – 3 образца, устойчивость одного образца была неизвестна (см. табл. 2).

Генотипирование сортов и гибридов с применением маркеров, разработанных для устойчивости к ЗКН

Маркер 57R встречается у 85.7 % устойчивых образцов, а также у 13.5 % восприимчивых (табл. 3; Приложение 2, рис. 1–6; Приложение 3). Некоторые несовпадения могут наблюдаться из-за отсутствия сцепления маркера 57R с геном устойчивости *H1* у ряда образцов либо из-за наличия других генов устойчивости у образцов, не несущих маркера 57R. Диагностическая эффективность маркера 57R, которая выражается процентным отношением истинных (и положительных, и отрицательных) результатов теста к общему числу полученных результатов, составила 86.11 %. Диагностическая чувствительность применяемого маркера, которая показывает число устойчивых образцов, выявленных с помощью ДНК-маркера, деленное на общее число устойчивых образцов, оказалась равна 85.71 %, а диагностическая специфичность, являющаяся числом восприимчивых образцов, выявленных с помощью ДНК-маркера, деленным на общее число восприимчивых образцов, составила 86.48 %. Прогностическая ценность

положительного результата, показывающая долю правильных положительных результатов диагностического теста, равнялась 85.71 %. Расчет коэффициента корреляции Спирмена (Spearman $R = 0.722008$, $p = 0.000000$, $p < 0.05$) показал, что наблюдается значимая корреляция между устойчивостью и маркером 57R.

Маркер CP113 встречается лишь у 48.6 % устойчивых образцов, при этом маркер присутствует у 62.9 % восприимчивых генотипов (см. табл. 3; Приложение 2, рис. 7; Приложение 3). Такие результаты можно расценивать как отсутствие сцепления маркера с геном устойчивости *H1* во многих образцах коллекции картофеля. Диагностическая эффективность применения маркера CP113 равнялась всего 44.44 %. Диагностическая чувствительность и диагностическая специфичность составляли 48.57 и 40.54 % соответственно. Прогностическая ценность положительного результата, показывающая вероятность наличия устойчивости при положительном результате теста с использованием маркера, оказалась равна 43.58 %. Коэффициент корреляции Спирмена (Spearman $R = -0.109218$, $p = 0.361104$, $p < 0.05$) в данном случае показывал отсутствие значимой корреляции между устойчивостью и ДНК-маркером. Использование такого маркера при скрининге популяции для поиска устойчивых образцов нецелесообразно.

Выборка из 29 образцов анализировалась с помощью маркера Gro1-4. Диагностический фрагмент амплифицировался только у 5 образцов. Соответствие наличия маркера у устойчивого образца наблюдалось лишь в одном случае из пяти. В остальных случаях маркер встречался у образцов, восприимчивых к заболеванию.

Полученные данные показывают, что при проведении скрининга популяций на устойчивость к ЗКН целесообразно использовать маркер 57R.

Генотипирование сортов и гибридов с применением маркеров, сцепленных с устойчивостью к раку картофеля

Маркер NL25 встречается у 62.3 % устойчивых образцов, однако при этом следует заметить, что маркер присутствует у двух из трех восприимчивых генотипов

Таблица 2. Устойчивость сортов и гибридов картофеля к болезням

№ п/п	Сорт/гибрид	Устойчивость		№ п/п	Сорт/гибрид	Устойчивость	
		к ЗКН	к раку			к ЗКН	к раку
1	Fregata	+ ²	+ ²	38	Ломоносовский	- ¹	+ ¹
2	Агата	+ ²	+ ²	39	Любава	- ¹	+ ¹
3	Алёна	- ¹	+ ¹	40	Люкс	+ ¹	+ ¹
4	Антонина	- ¹	+ ¹	41	Марет	+ ¹	NA
5	Ароза	+ ¹	+ ¹	42	Матушка	- ¹	+ ¹
6	Божедар	NA	+ ¹	43	Метеор	+ ¹	+ ¹
7	Браво	+ ¹	+ ¹	44	Монализа	- ¹	+ ¹
8	Василёк	- ¹	+ ¹	45	Накра	- ¹	+ ¹
9	Великан	- ¹	+ ¹	46	Наяда	+ ¹	+ ¹
10	Виращ	+ ¹	+ ¹	47	Невский	- ¹	+ ¹
11	Вымпел	+ ¹	+ ¹	48	Никулинский	- ¹	+ ¹
12	Гала	+ ¹	+ ¹	49	Памяти Осиповой	- ¹	+ ¹
13	Голубизна	- ¹	+ ¹	50	Памяти Рогачёва	- ¹	+ ¹
14	Горняк	- ¹	+ ¹	51	Пикассо	+ ¹	+ ¹
15	Гранат	- ²	+ ²	52	Регги	- ¹	+ ¹
16	Гранола	+ ²	- ²	53	Ред Скарлет	+ ¹	+ ¹
17	Гулливер	+ ¹	+ ¹	54	Сафо	+ ¹	+ ¹
18	Гусар	+ ¹	+ ¹	55	Фаворит	+ ¹	+ ¹
19	Дебрянск	- ¹	+ ¹	56	Фиолетовый	- ¹	+ ¹
20	Диамант	+ ²	+ ²	57	Фрителла	- ¹	+ ¹
21	Жигулёвский	- ¹	+ ¹	58	Юна	+ ¹	+ ¹
22	Жуковский ранний	+ ¹	+ ¹	59	1-7-5А	- ³	+ ⁴
23	Загадка	+ ¹	+ ¹	60	(1-9-2)	- ³	+ ⁴
24	Зекура	+ ¹	+ ¹	61	2-5-4Б	- ³	+ ⁴
25	Златка	- ¹	+ ¹	62	1-14-2А	+ ³	+ ⁴
26	Ильинский	- ¹	+ ¹	63	1014/3-1	+ ³	+ ⁴
27	Импала	+ ¹	+ ¹	64	821/1-5	+ ³	+ ⁴
28	Ирбитский	+ ¹	+ ¹	65	419/8-1	- ³	+ ⁴
29	Кемеровчанин	+ ¹	+ ¹	66	1014/8-1	+ ³	+ ⁴
30	Клада	- ²	+ ²	67	1013/3-1	+ ³	+ ⁴
31	Колдовская	- ³	- ⁴	68	790/1-5	- ³	+ ⁴
32	Колобок	- ¹	+ ¹	69	(2-5-2)	+ ³	+ ⁴
33	Кортни	+ ¹	+ ¹	70	785/8-5	- ³	+ ⁴
34	Крепыш	+ ¹	+ ¹	71	999/1-1	- ³	+ ⁴
35	Кузнечанка	- ¹	+ ¹	72	597/4-1	- ³	- ⁴
36	Ладожский	+ ¹	+ ¹	73	417/2	- ³	+ ⁴
37	Лина	- ¹	+ ¹				

Примечание. «+» и «-» – соответственно устойчивость и восприимчивость к заболеванию; NA – данные неизвестны. ¹ Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию; ² Европейская база данных культурного картофеля; ³ Всероссийский НИИ защиты растений; ⁴ ФИЦ картофеля им. А.Г. Лорха.

(см. табл. 3; Приложение 4). Вероятно, это обусловлено процессами кроссинговера и тем, что у ряда образцов не наблюдается сцепления маркера и гена устойчивости, тем не менее малое количество чувствительных образцов не позволяет в достаточной степени оценить применимость маркера для селекции. Маркер отсутствует у 27 образцов, и только один из них является неустойчивым, остальные 26 образцов относятся к устойчивым. Это можно объяс-

нить наличием другого гена устойчивости, который не сцеплен с маркером NL25.

Диагностическая эффективность оценки устойчивости с применением маркера NL25 составила 61.11 %. Диагностическая чувствительность маркера оказалась на уровне 62.31 %, тогда как диагностическая специфичность составила лишь 33.33 %. Однако прогностическая ценность положительного результата, показывающая

Таблица 3. Результаты скрининга коллекции сортов и гибридов картофеля на устойчивость к ЗКН с использованием маркера 57R и на устойчивость к раку с использованием маркера NL25

Устойчивость к заболеванию	Маркер присутствует	Маркер отсутствует	Диагностическая эффективность, %
Маркер 57R			
Устойчивый к ЗКН образец	30	5	86.11
Восприимчивый к ЗКН образец	5	32	
Маркер CP113			
Устойчивый к ЗКН образец	17	18	44.44
Восприимчивый к ЗКН образец	22	15	
Маркер NL25			
Устойчивый к раку образец	43	26	61.11
Восприимчивый к раку образец	2	1	

долю правильных положительных результатов диагностического теста, при применении маркера NL25 равнялась 95.55 %. Такие результаты связаны с тем, что в выборке присутствовали только три неустойчивых образца и у двух из них наблюдалось наличие маркера NL25. Коэффициент корреляции Спирмена (Spearman $R = -0.017946$, $p = 0.881061$, $p < 0.05$) в такой ситуации показывал отсутствие значимых корреляций.

Несмотря на то что маркер NL25 часто используется в скрининге и маркерной селекции, исследование на нашей выборке показало, что его применение не гарантирует надежного результата.

Обсуждение

В нашем исследовании встречается 13 устойчивых к золотистой картофельной нематоды образцов, имеющих оба маркера (57R и CP113), сцепленных с геном *HI* устойчивости к нематоды. Помимо этого, имеется 8 генотипов, устойчивых к нематоды и раку и несущих как маркеры 57R и CP113, сцепленные с геном *HI* устойчивости к нематоды, так и маркер NL25, сцепленный с геном *Sen1* устойчивости к раку. Также в популяции встречается один образец (Сафо), устойчивый к раку и нематоды и несущий все три маркера 57R, CP113, Gro1-4, сцепленные с устойчивостью к нематоды, и маркер NL25, сцепленный с устойчивостью к раку.

ДНК-маркеры устойчивости к раку

Маркер NL25, сцепленный с геном *Sen1*, обеспечивающим устойчивость к патотипу 1 рака картофеля, успешно применяют в практике маркер-ориентированной селекции. Так С. Gebhardt с коллегами, проведя скрининг 17 растений в двух семействах расщепляющихся популяций с использованием маркера NL25, идентифицировали 14 генотипов, имевших маркер. Все эти растения оказались устойчивы к патотипу 1 *S. endobioticum*. Некоторые были устойчивы также к патотипу 2 и/или патотипу 6 (Gebhardt et al., 2006).

Об эффективности данного маркера сообщают и О.Ю. Антонова с коллегами (2016), проанализировавшие 98 сортов с помощью маркера NL25. У 95 исследованных ракустойчивых сортов был выявлен диагностический компонент, а у трех восприимчивых сортов его не обна-

ружено. Это показывает высокий уровень корреляции наличия или отсутствия маркера и устойчивости/чувствительности генотипа к раку соответственно (Антонова и др., 2016).

Однако А. Khiutti с коллегами при скрининге 52 генотипов с использованием маркера NL25 обнаружили, что 39 образцов (как чувствительные, так и устойчивые генотипы) имели одинаковый недиагностический фрагмент, 12 генотипов не имели амплификации фрагментов маркера NL25. И только пять из 52 генотипов обладали диагностическим фрагментом, указывающим на наличие гена устойчивости. Четыре из этих пяти образцов были устойчивыми, а один генотип оказался чувствительным. Большинство устойчивых генотипов не имели диагностического фрагмента 1400 п. н., прогнозирующего устойчивый фенотип (Khiutti et al., 2012).

Проведенный нами анализ также не позволил говорить о надежности применения маркера NL25 для скрининга устойчивых сортов.

ДНК-маркеры устойчивости к ЗКН

Используя в расщепляющейся популяции маркер Gro1-4, С. Gebhardt с коллегами обнаружили, что все 45 растений, несущих данный маркер, сцепленный с геном *Gro1*, устойчивы к патотипу Ro1 *G. rostochiensis* (Gebhardt et al., 2006).

В более раннем исследовании расщепляющейся популяции маркер CP113 был сцеплен с геном *HI* настолько сильно, что имел нулевую рекомбинацию (Gebhardt et al., 1993). Однако D. Milczarek с коллегами сообщал, что маркер CP113 был амплифицирован для всех тестируемых сортов – устойчивых и чувствительных – и оказался непригодным для отбора устойчивых клонов (Milczarek et al., 2011). В нашей работе наблюдается схожая картина.

SCAR-маркер 57R был протестирован в картирующей популяции, где он показал сцепление с локусом *HI* и устойчивостью к нематоды (Finkers-Tomczak et al., 2011). Позже L. Schultz с коллегами (Schultz et al., 2012) сообщили, что провели анализ двух независимых популяций из 281 и 122 образцов картофеля с известной устойчивостью/чувствительностью с использованием SCAR-маркера 57R. При скрининге первой популяции маркер 57R выявил соответствие между генотипом и

фенотипом: 89 из 90 устойчивых сортов дали аллель, связанный с устойчивостью; исключением стал лишь один устойчивый сорт, у которого не наблюдалась амплификация маркера. Ни один из 191 восприимчивого к ЗКН сорта не имел аллеля, прогнозирующего устойчивость. Затем был проведен скрининг другой независимой популяции из 122 сортов. Все сорта продемонстрировали полное соответствие между устойчивостью к *G. rostochiensis* и наличием/отсутствием аллеля 57R, сцепленного с геном устойчивости (Schultz et al., 2012).

О.Ю. Антонова с коллегами (2016) выявили маркер 57R у 33 (30.3 %) из 109 исследуемых ими селекционных сортов. Большинство сортов с диагностированным фрагментом 57R были устойчивыми или слабо поражались нематодой. Соответствие между устойчивостью и присутствием диагностического фрагмента было высоким – 93.5 %. При этом выявлено всего четыре генотипа с маркером Gro1-4: два устойчивых сорта, один слабопоражаемый сорт и один восприимчивый. Все эти четыре сорта наряду с маркером Gro1-4 обладали и маркерами гена *H1* – 57R, TG689, N146, N195 (Антонова и др., 2016).

В работе Н.С. Клименко с коллегами (2017) маркер 57R выявлен у 24 из 103 образцов, при этом маркер встречался у 15 устойчивых и 2 неустойчивых образцов. Показано, что корреляция между наличием хотя бы одного маркера гена *H1* и данными о нематодоустойчивости сортов составила +0.92 (Клименко и др., 2017).

Т.А. Гавриленко с коллегами (2018) показали, что из 39 образцов исследуемой выборки у 15 образцов присутствовал доминантный аллель гена *H1* (на основе ряда ДНК-маркеров), а у двух сортов – доминантные аллели обоих генов, *H1* и *Gro1-4*. В то же время у оставшихся 22 генотипов ни один из маркеров не был выявлен. Сопоставление данных результатов с устойчивостью к *G. rostochiensis* (патотип Ro1) показало, что все образцы с маркерами гена *H1* относятся к нематодоустойчивым; у сортов, поражаемых *G. rostochiensis*, эти маркеры отсутствовали (Гавриленко и др., 2018). Такая высокая корреляция говорит о надежности примененных в исследовании маркеров, которые могут быть использованы для отбора устойчивых образцов.

Следует отметить, что насыщение генотипа генами устойчивости к нематоду не влияет на его хозяйственно ценные признаки. При этом сохраняется сильная связь между присутствием маркера и устойчивостью. Так, в исследовании (Milczarek et al., 2014) представлена взаимосвязь между наличием маркеров TG689 и 57R, сцепленных с геном *H1*, придающим устойчивость к нематоду *G. rostochiensis*, и ценными сельскохозяйственными признаками. Клоны с этими маркерами отличались более высоким общим выходом клубней и крахмала по сравнению с клонами без маркеров. Отрицательной связи между наличием маркера и качеством не наблюдалось. Все 347 проростков, полученных в ходе трех скрещиваний, были прогенотипированы с использованием обоих маркеров и прошли фенотипическую оценку устойчивости к патотипу Ro1 *G. rostochiensis*. Из них 316 (91 %) и 325 (94 %) клонов были устойчивы и несли маркеры TG689 или 57R (Milczarek et al., 2014).

Заключение

В целом полученные нами данные по маркеру 57R близки к описанным выше результатам и подтверждают высокую надежность работы этого маркера, что позволяет говорить о необходимости его применения при отборе устойчивых к ЗКН образцов.

Список литературы / References

- Антонова О.Ю., Швачко Н.А., Новикова Л.Ю., Шувалов О.Ю., Костина Л.И., Клименко Н.С., Шувалова А.Р., Гавриленко Т.А. Генетическое разнообразие сортов картофеля российской селекции и стран ближнего зарубежья по данным полиморфизма SSR-локусов и маркеров R-генов устойчивости. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016;20(5):596-606. DOI 10.18699/VJ16.181.
- [Antonova O.Y., Shvachko N.A., Novikova L.Y., Shvalov O.Y., Kostina L.I., Klimentko N.S., Shvalova A.R., Gavrilenko T.A. Genetic diversity of potato varieties bred in Russia and its neighboring countries based on the polymorphism of SSR-loci and markers associated with resistance R-genes. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2017; 7(5):489-500. DOI 10.1134/S2079059717050021.]
- Гавриленко Т.А., Клименко Н.С., Антонова О.Ю., Лебедева В.А., Евдокимова З.З., Гаджиев Н.М., Апаликова О.В., Алпатьева Н.В., Костина Л.И., Зотева Н.М., Мамадобкирова Ф.Т., Егорова К.В. Молекулярный скрининг сортов и гибридов картофеля северо-западной зоны Российской Федерации. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(1):35-45. DOI 10.18699/VJ18.329.
- [Gavrilenko T.A., Klimentko N.S., Antonova O.Yu., Lebedeva V.A., Evdokimova Z.Z., Gadjiyev N.M., Apalikova O.V., Alpatyeva N.V., Kostina L.I., Zoteyeva N.M., Mamadbokirova F.T., Egorova K.V. Molecular screening of potato varieties bred in the northwestern zone of the Russian Federation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(1):35-45. DOI 10.18699/VJ18.329. (in Russian)]
- Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т. 1. Сорта растений (офиц. изд.). М.: Росинформагротех, 2019.
- [State Register of Selection Achievements Authorized for Use for Production Purposes. Vol. 1. Plant Varieties (official publication). Moscow: Rosinformagrotech Publ., 2019. (in Russian)]
- Клименко Н.С., Антонова О.Ю., Костина Л.И., Мамадобкирова Ф.Т., Гавриленко Т.А. Маркер-опосредованная селекция отечественных сортов картофеля с маркерами генов устойчивости к золотистой картофельной нематоду (патотип Ro1). *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 2017;178(4):66-75. DOI 10.30901/2227-8834-2017-4-66-75.
- [Klimentko N.S., Antonova O.Yu., Kostina L.I., Mamadbokirova F.T., Gavrilenko T.A. Marker-assisted selection of Russian potato varieties with markers of genes for resistance to potato golden nematode (pathotype Ro1). *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Selekcii* = *Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2017;178(4):66-75. DOI 10.30901/2227-8834-2017-4-66-75. (in Russian)]
- Корецкий П.М. Вредоносность рака картофеля на приусадебных участках в районах широкого распространения болезни на Украине. *Микология и фитопатология*. 1970;4(4):366-369.
- [Koretsky P.M. Harmfulness of potato wart in household plots in areas of widespread of the disease in Ukraine. *Mikologiya i Fitopatologiya* = *Mycology and Phytopathology*. 1970;4(4):366-369. (in Russian)]
- Хюйти 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.
- [Khiutti A.V., Antonova O.Yu., Mironenko N.V., Gavrilenko T.A., Afanasenko O.S. Potato resistance to quarantine diseases. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2017;7(8):833-844. DOI 10.1134/S2079059717050094.]

- Asano K., Kobayashi A., Tsuda S., Nishinaka M., Tamiya S. DNA marker-assisted evaluation of potato genotypes for potential resistance to potato cyst nematode pathotypes not yet invading into Japan. *Breed. Sci.* 2012;62(2):142-150. DOI 10.1270/jsbbs.62.142.
- 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 Pathol.* 2006;116(1):21-31. DOI 10.1007/s10658-006-9039-y.
- Bakker E., 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., Govere A. A high-resolution map of the *H1* locus harbouring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Theor. Appl. Genet.* 2004;109(1):146-152. DOI 10.1007/s00122-004-1606-z. Epub 2004 Feb 25.
- Ballvora A., Flath K., Lubeck J., Strahwald J., Tacke E., Hofferbert 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(8):1281-1292. DOI 10.1007/s00122-011-1666-9. Epub 2011 Aug 6.
- Ballvora A., Hesselbach J., Niewöhner J., Leister D., Salamini F., Gebhardt C. Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harbouring the nematode resistance gene *Gro1*. *Mol. General Genet.* 1995;249:82-90. DOI 10.1007/BF00290239.
- Barone A., Ritter E., Schachtschabel 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. General Genet.* 1990;224(2):177-182. DOI 10.1007/BF00271550.
- Bartkiewicz A., Chilla F., Terefe-Ayana D., Lübeck J., Strahwald J., Tacke E., Hoferbert H.-R., Flath K., Linde M., Debener T. Improved genetic resolution for linkage mapping of resistance to potato wart in monoparental dihaploids with potential diagnostic value in tetraploid potato varieties. *Theor. Appl. Genet.* 2018;131:2555-2566. DOI 10.1007/s00122-018-3172-9.
- Bormann C.A., Rickert A.M., Ruiz R.A.C., Paal J., Lübeck J., Strahwald J., Buhr K., Gebhardt C. Tagging quantitative trait loci for maturity-corrected late blight resistance in tetraploid potato with PCR-based candidate gene markers. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2004;17(10):1126-1138. DOI 10.1094/MPMI.2004.17.10.1126.
- 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.
- Finkers-Tomczak A., Bakker E., Boer J., Vossen E., Achenbach U., Golas T., Suryaningrat S., Smant G., Bakker J., Govere 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., Govere A., Bakker J., Bakker E. A high-resolution map of the *Gro1* 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.
- Flor H.H. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1971;9:275-296. DOI 10.1146/annurev.py.09.090171.001423.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Food and Agriculture – Statistical pocketbook 2019. Rome: FAO, 2019. Available at: <http://www.fao.org/3/ca6463en/ca6463en.pdf>.
- 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. Genet.* 2011;52(4):407-411. DOI 10.1007/s13353-011-0056-y.
- Gebhardt C., Ballvora A., Walkemeier B., Oberhagemann P., Schüler 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. Breed.* 2004;13:93-102. DOI 10.1023/B:MOLB.0000012878.89855.df.
- 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. Epub 2006 Mar 15.
- 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.
- Gebhardt C., Valkonen J.P.T. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2001;39:79-102. DOI 10.1146/annurev.phyto.39.1.79.
- Groth J., Song Y., Kellermann A., Schwarzfischer A. Molecular characterisation of resistance against potato wart races 1, 2, 6 and 18 in a tetraploid population of potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*). *J. Appl. Genet.* 2013;54(2):169-178. DOI 10.1007/s13353-013-0141-5. Epub 2013 Feb 24.
- Hampson M.C. History, biology and control of potato wart disease in Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 1993;15(4):223-244. DOI 10.1080/07060669309501918.
- Hehl R., Faurie E., Hesselbach J., Salamini F., Whitham 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., 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. Breed.* 1996;2:51-60. DOI 10.1007/BF00171351.
- Janssen R., Bakker J., Gommers F.J. Mendelian proof for a gene-for-gene relationship between virulence of *Globodera rostochiensis* and the *H1* resistance gene in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* CPC 1673. *Rev. de Nematol.* 1991;14(2):207-211.
- Jones F.G.W., Parrott D.M., Perry J.N. The gene-for-gene relationship and its significance for potato cyst nematodes and their solanaceous hosts. In: Zuckerman B.M., Rohde R.A. (Eds.). Plant Parasitic Nematodes. Vol. 3. New York: Acad. Press, 1981;23-36.
- 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 Breed.* 2012;131(6):744-750. DOI 10.1111/j.1439-0523.2012.02005.x.
- Kort J., Stone A.R., Rumpfenhorst H.J., Ross H. An international scheme for identifying and classifying pathotypes of potato cyst-nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Nematologica.* 1977;23(3):333-339. DOI 10.1163/187529277x00057.
- Kreike C.M., De Koning J.R.A., Vinke J.H., Van Ooijen J.W., 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. DOI 10.1007/BF00215092.
- 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. *Theor. Appl. Genet.* 1996;92:463-470. DOI 10.1007/BF00223694.
- Kuhl J.C. Mapping and tagging of simply inherited traits. In: Braeden J.M., Chittaranjan K. (Eds.). Genetics, Genomics and Breeding of Potato. Enfield, New Hampshire: Sci. Publishers, 2011;90-112.
- Leister D., Ballvora A., Salamini F., Gebhardt C. A PCR based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nat. Genet.* 1996;14:421-429. DOI 10.1038/ng1296-421.
- Limantseva L., Mironenko N., Shuvalov O., Antonova O., Khiutti A., Novikova L., Afanasenko O., Spooner D., Gavrilenko T. Charac-

- terization of resistance to *Globodera rostochiensis* pathotype Ro1 in cultivated and wild potato species accessions from the Vavilov Institute of Plant Industry. *Plant Breed.* 2014;133(5):660-665. DOI 10.1111/pbr.12195.
- Lopez-Pardo R., Barandalla L., Ritter E., de Galarreta J.I.R. Validation of molecular markers for pathogen resistance in potato. *Plant Breed.* 2013;132:246-251. DOI 10.1111/pbr.12062.
- 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 Breed.* 2014;50(4):278-284. DOI 10.17221/114/2014-CJGPB.
- 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.* 2011;180:347-355. DOI 10.1007/s10681-011-0381-6.
- 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. Breed.* 1995;1:65-78. DOI 10.1007/BF01682090.
- 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. DOI 10.1007/s00122-014-2268-0.
- Obidiegwu J.E., Sanetomo R., Flath K., Tacke E., Hoferbert H.-R., Hofmann A., Walkemeier B., Gebhardt C. Genomic architecture of potato resistance to *Synchytrium endobioticum* disentangled using SSR markers and the 8.3 k SolCAP SNP genotyping array. *BMC Genet.* 2015;16:38. DOI 10.1186/s12863-015-0195-y.
- OEPP/EPPO Standards PM 7/28. Diagnostic protocols for regulated pests: *Synchytrium endobioticum*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin.* 2004;34:213-218. DOI 10.1111/j.1365-2338.2004.00722.x.
- OEPP/EPPO Testing of potato varieties to assess resistance to *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin.* 2006;36:419-420. DOI 10.1111/j.1365-2338.2006.01032.x.
- 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 Ro1 of the root cyst nematode *Globodera rostochiensis*, based on a candidate gene approach. *Plant J.* 2004;38(2):285-297. DOI 10.1111/j.1365-313X.2004.02047.x.
- Pajerowska-Mukhtar K., Stich B., Achenbach U., Ballvora A., Lübeck J., Strahwald J., Tacke E., Hoferbert H.-R., Ilarionova E., Bellin D., Walkemeier B., Basekow R., Kersten B., Gebhardt C. Single nucleotide polymorphisms in the allene oxide synthase 2 gene are associated with field resistance to late blight in populations of tetraploid potato cultivars. *Genetics.* 2009;181(3):1115-1127. DOI 10.1534/genetics.108.094268.
- Pineda O., Bonnierbale 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. DOI 10.1139/g93-019.
- Plich J., Przetakiewicz J., Śliwka J., Flis B., Wasilewicz-Flis I., Zimnoch-Guzowska E. Novel gene *Sen2* conferring broad-spectrum resistance to *Synchytrium endobioticum* mapped to potato chromosome XI. *Theor. Appl. Genet.* 2018;131:2321-2331. DOI 10.1007/s00122-018-3154-y.
- Prodhomme C., Esselink D., Borm T., Visser R.G.F., van Eck H.J., Vossen J.H. Comparative Subsequence Sets Analysis (CoSSA) is a robust approach to identify haplotype specific SNPs; mapping and pedigree analysis of a potato wart disease resistance gene *Sen3*. *Plant Methods.* 2019;15:60. DOI 10.1186/s13007-019-0445-5.
- Prodhomme C., Peter G.V., Paulo M.J., Visser R.G.F., Vossen J.H., van Eck J.H. Distribution of P1(D1) wart disease resistance in potato germplasm and GWAS identification of haplotype-specific SNP markers. *Theor. Appl. Genet.* 2020;133:1859-1871. DOI 10.1007/s00122-020-03559-3.
- 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.
- Roupe van der Voort J., Lindeman W., Folkertsma R., Hutten R., Overmars H., van der Vossen E., Jacobsen E., Bakker J. A QTL for broad-spectrum resistance to cyst nematode species (*Globodera* spp.) maps to a resistance gene cluster in potato. *Theor. Appl. Genet.* 1998;96:654-661. DOI 10.1007/s001220050785.
- Roupe van der Voort J., van der Vossen E., Bakker E., Overmars H., van Zandvoort P., Hutten R., Klein Lankhorst R., Bakker J. Two additive QTLs conferring broad-spectrum resistance in potato to *Globodera pallida* are localized on resistance gene clusters. *Theor. Appl. Genet.* 2000;101:1122-1130. DOI 10.1007/s001220051588.
- 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;131:315-321. DOI 10.1111/j.1439-0523.2012.01949.x.
- Skupinová S., Vejl P., Sedlák P., Domkářová J. Segregation of DNA markers of potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* L.) resistance against Ro1 pathotype *Globodera rostochiensis* in selected F₁ progeny. *Rostlinná Výroba.* 2002;48(11):480-485. DOI 10.17221/4399-PSE.
- 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.

ORCID ID

I.V. Totsky orcid.org/0000-0001-5565-9097
E.K. Khlestkina orcid.org/0000-0002-8470-8254
A.V. Kochetov orcid.org/0000-0003-3151-5181

Благодарности. Изучение биоресурсной коллекции картофеля на наличие генов устойчивости к *Globodera rostochiensis* проводилось в рамках работ по гранту РНФ 16-16-04073П. Изучение биоресурсной коллекции картофеля на наличие генов устойчивости к *Synchytrium endobioticum* выполнено в рамках Комплексного плана научных исследований «Развитие селекции и семеноводства картофеля». Размножение и поддержание коллекции сортов и гибридов картофеля осуществлялись в рамках государственного задания ИЦиГ СО РАН (проект № 0259-2019-0011).

Выражаем благодарность сотрудникам лаборатории иммунитета растений к болезням ВИЗР Ольге Сильвестровне Афанасенко и Александру Валерьевичу Хютти за определение устойчивости гибридов картофеля к ЗКН и заведующему Всероссийским пунктом по испытанию картофеля на устойчивость к раку и нематоды ФИЦ картофеля им. А.Г. Лорха Владимиру Вячеславовичу Мананкову.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 27.11.2020. После доработки 25.06.2021. Принята к публикации 25.06.2021.